

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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**

Rozmaringosav-tartalmú gyógynövénykivonatok előállítás és táplálékkiegészítőként, valamint funkcionális élelmiszerként való felhasználása

**Írta:
SIK BEATRIX**

**Készült a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer- tudományi Multidiszciplináris
Doktori Iskola
Pulay Gábor Élelmiszertudományi Doktori Programja keretében**

Témavezető: Dr. Ajtony Zsolt, Dr. Kapcsándi Viktória

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton.....%-ot ért el,

Mosonmagyaróvár,

.....
a Szigorlati Bizottság Elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Esetleg harmadik bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár,

A Bírálóbizottság elnöke

Doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Az EDT elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	8
KIVONAT	10
ABSTRACT	12
1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	14
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	17
2.1 Lamiaceae növénycsalád rövid bemutatása.....	17
2.1.1 Borsosmenta (<i>Mentha x piperita</i> L.)	18
2.1.2 Citromfű (<i>Melissa officinalis</i> L.).....	20
2.1.3 Kerti kakukkfű (<i>Thymus vulgaris</i> L.).....	22
2.1.4 Orvosi zsálya (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	23
2.1.5 Rozmaring (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	25
2.1.6 Szurokfű (<i>Origanum vulgare</i> L.)	26
2.2 Gyógynövények felhasználási formái és jogi szabályozásuk...	28
2.3 Gyógynövénykivonatok.....	33
2.3.1 Folyékony kivonatok/tinktúrák	33
2.3.2 Száraz kivonatok	36
2.4 Étsokoládé, mint funkcionális élelmiszer	38
2.5 Polifenolok rövid bemutatása	41
2.5.1 Rozmaringsav jellemzése	44
2.5.2 Rozmaringsav emberi egészségi hatása	47
2.6 Extrakció.....	51
2.6.1 Szilárd-folyadék extrakció	51
2.6.2 Diffúziót befolyásoló tényezők	54
2.7 Extrakciós eljárások.....	60
2.7.1 Macerálás, macerálás-kevertetéssel	60
2.7.2 Perkolálás, forralás visszafolyóztatással (refluxálás).....	61
2.7.3 Mikrohullámmal segített extrakció	62
2.8 Extrakciós módszerek optimalizálása.....	66

2.9	Fenolos savak meghatározására szolgáló analitikai eljárások ..	68
2.9.1	Rozmaringsav vizsgálata folyadékkromatográfias módszerekkel.....	69
2.9.2	Spektrofotometriás módszerek alkalmazása rozmaringsav-tartalmú kivonatok esetében.....	73
2.9.2.1	Összes polifenol-tartalom meghatározás Folin-Ciocalteu reagenssel.....	74
2.9.2.2	2,2-difenil-1-pikrilhidarzil (DPPH) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés	75
3	ANYAG ÉS MÓDSZER	77
3.1	Felhasznált vegyszerek, reagensek	77
3.2	Vizsgált növények, termékek	77
3.3	Alkalmazott készülékek.....	78
3.4	Extrakciós módszer fejlesztése folyékony kivonatok előállításához.....	79
3.5	Extrakciós módszer fejlesztése adalékolt csokoládé HPLC elemzéséhez.....	81
3.6	Mintaelőkészítés	81
3.6.1	Folyékony kivonatok, tinktúrák	81
3.6.2	Csokoládétermékek	82
3.7	HPLC mérési feltételek	83
3.7.1	Folyékony kivonatok, tinktúrák	83
3.7.2	Csokoládétermékek	83
3.8	HPLC módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása....	84
3.8.1	Folyékony kivonatok, tinktúrák	84
3.8.2	Csokoládétermékek	85
3.9	Spektrofotometriás vizsgálatok	86
3.9.1	Összes polifenol-tartalom meghatározás.....	86
3.9.2	Összantioxidáns kapacitás vizsgálata.....	87
3.10	Termékfejlesztés.....	88
3.10.1	Étrend-kiegészítő készítmény (tinktúra)	88
3.10.2	Funkcionális élelmiszer (adalékolt csokoládé)	88

3.11	Stabilitási vizsgálatok	89
3.11.1	Tinktúra	89
3.11.2	Csokoládétermékek	90
3.12	Alkalmazott statisztikai módszerek	90
4	EREDMÉNYEK.....	91
4.1	Extrakciós módszerfejlesztés folyékony gyógynövény- kivonatokban lévő rozmaringsav kinyerésére	91
4.1.1	Rozmaringsav kvalitatív és kvantitatív elemzése.....	91
4.1.2	Diffúziót befolyásoló paraméterek.....	94
4.1.2.1	Kivonószer savassága	97
4.1.2.2	Alkalmazott kivonószer típusa.....	99
4.1.2.3	Extrakció időtartama és hőmérséklete	103
4.2	Tinktúrák	106
4.2.1	Kvalitatív és kvantitatív elemzés.....	106
4.2.2	Termékfejlesztés.....	109
4.2.3	Eltarthatósági vizsgálat	110
4.2.3.1	A rozmaringsav és a kávésav stabilitása.....	110
4.2.3.2	Összes polifenol és antioxidáns tulajdonságok.....	114
4.3	Adalékolt étcsokoládé.....	118
4.3.1	Termékfejlesztés.....	118
4.3.2	Extrakciós módszerfejlesztés adalékolt étcsokoládé rozmaringsav-tartalmának kinyerésére	119
4.3.2.1	Alkalmazott kivonószer típusa.....	119
4.3.2.2	Kivonás időtartamának hatása	121
4.3.3	Folyadékkromatográfias módszerfejlesztés	122
4.3.4	Eltarthatósági vizsgálat a rozmaringsav függvényében ..	126
5	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	128
5.1	Extrakciós módszerfejlesztés folyékony gyógynövény- kivonatokban lévő rozmaringsav kinyerésére	128
5.2	Tinktúrák eltarthatósága	132

5.3	Rozmaringssavat tartalmazó étcsokoládék elemzéseivel kapcsolatos eredmények.....	135
6	ÖSSZEFOGLALÁS	139
7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	142
8	PUBLIKÁCIÓ	144
8.1	Értekezés alapjául szolgáló közlemények	144
8.2	Értekezés témájával kapcsolatban megjelent közlemények ...	145
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	146
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	189

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉS	ANGOL MEGNEVEZÉS	MAGYAR MEGNEVEZÉS
AAE	Ascorbic acid equivalent	Aszkorbinsav-egyenérték
ADI	Acceptable daily intake	Elfogadható napi beviteli mennyiség
ANOVA	Analysis of variance	Varianciaanalízis
Av	Average	Átlag
DAD	Diode array detector	Diódasoros detektor
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-difenil-1-pikrilhidarzil
EMA	European Medicines Agency	Európai Gyógyszerügynökség
EtOH	Ethanol	Etanol
GAE	Gallic acid equivalent	Galluszsav-egyenérték
HCl	Hydrochloric acid	Sósav
HMPC	Herbal Medicinal Products Committee	Növénygyógyszer Bizottság
HPLC	High performance liquid chromatography	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HRE	Heat-reflux extraction	Forralás visszafolyóztatással
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration	50%-os inhibitor koncentráció

RÖVIDÍTÉS	ANGOL MEGNEVEZÉS	MAGYAR MEGNEVEZÉS
ICH	International Conference on Harmonisation	Nemzetközi Harmonizációs Konferencia
LOQ	Limit of quantification	Meghatározási határ
MACs	Maceration with stirring	Macerálás kevertetéssel
MAE	Microwave-assisted extraction	Mikrohullámmal segített extrakció
MeOH	Methanol	Metanol
MS	Mass spectrometry	Tömegspektrometria
OFAT	One-factor-at-a-time	Egy faktor egy időben
Ph.Hg.VIII.	Pharmacopoeia Hungarica	Magyar Gyógyszerkönyv
pK_a	Acid dissociation constant	Savi disszociációs állandó
R²	Coefficient of Determination of a linear regression	Determinációs együttható
RP	Reversed-phase	Fordított fázisú
RSD	Relative standard deviation	Relatív szórás
SD	Standard deviation	Tapasztalati szórás
SLE	Solid-liquid extraction	Szilárd-folyadék extrakció
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroecetsav
UV	Ultraviolet	Ultraibolya

KIVONAT

Rozmaringsav-tartalmú gyógynövénykivonatok előállítására és táplálékkiegészítőként, valamint funkcionális élelmiszerként való felhasználása

A dolgozat a Lamiaceae család Nepetoideae alcsaládjába tartozó növények terápiás hatással bíró marker vegyületének vizsgálatával, a rozmaringsavval foglalkozik.

A szerző az egy faktor egy időben elv (OFAT) alkalmazásával maximalizálta a növényekből kinyerhető rozmaringsav mennyiségét. A kivonatot hagyományos (macerálás kevertetéssel, MAC_S; forralásos visszafolyóztatással, HRE) és új (mikrohullámmal segített extrakció, MAE) kivonatos eljárásokkal valósította meg. A rozmaringsav mennyiségét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) mérte diódasoros detektálással (DAD). A mérési adatok felhasználásával nagy rozmaringsav-tartalmú tinktúrákat állított elő. A disszertáció tartalmazza továbbá ezen készítmények stabilitási vizsgálatát, amely során a szerző kritikus paraméterekre mutat rá és fontos megállapításokat tesz a tinktúrák eltarthatóságára vonatkozóan.

A disszertáció céljai között szerepelt továbbá egy olyan új és innovatív funkcionális élelmiszernek a kifejlesztése, mely csökkentheti a krónikus betegségek kialakulásának kockázatát. A cél elérése érdekében a szerző citromfű szárazkivonatnak a hozzáadásával növelte az étcsokoládé funkcionális tulajdonságait. Tekintettel az alkalmazott élelmiszer mátrix jellegére, a disszertáció kiegészült egy fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszerrel a kidolgozásával. A szerző az RP-HPLC módszer érvényességét a rendszer alkalmazásának,

linearitásának, pontosságának és kimutatási határának meghatározásával bizonyította. A növényi szárazkivonattal adalékolt étcsokoládéban lévő rozmaringsav kinyeréséhez alkalmazott MAC_s és MAE módszert két független paraméter (kivonószer típusa, extrakció időtartama) segítségével optimalizálta. A szerző ismerteti továbbá az adalékolt étcsokoládéban lévő rozmaringsav kiváló stabilitását rávilágítva arra, hogy komponens számára a csokoládé megfelelő hordozó mátrixot jelenthet a közeljövőben.

ABSTRACT**Production and application of herbal extracts containing rosmarinic acid for dietary supplement and functional food**

The aim of the dissertation was to examine a marker compound (rosmarinic acid) in six plants belonging to the Nepetoideae subfamily of the Lamiaceae family.

In the present study, a one-factor-at-a-time (OFAT) methodology was used to study the maximization of rosmarinic acid extraction efficiency. Extraction yields for rosmarinic acid from different alcoholic extracts of Lamiaceae plants were investigated through conventional (maceration with stirring, MACs; heat reflux, HRE) and non-conventional techniques (microwave-assisted extraction, MAE). The rosmarinic acid content was measured by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD). After taking into account the obtained results, the author prepared tinctures with high rosmarinic acid content. The dissertation also discusses the stability characteristics of these products. The author points to the critical parameters of storage and makes important findings regarding the preservation of tinctures.

In addition, the author presents a new and innovative functional food idea that could reduce the risk of developing chronic diseases. The functional properties of dark chocolate were enhanced by addition of a freeze-dried lemon balm extract. Given the food matrix used, it was necessary to develop an innovative analytical and extraction method for rosmarinic acid determination in fortified chocolate. A simple and efficient reversed-phase high-performance liquid chromatography method (RP - HPLC) has been developed for the estimation of rosmarinic acid in

dark chocolate. The validity of the method was demonstrated by evaluating the system suitability, linearity, precision, accuracy, and limit of quantification. The extraction of rosmarinic acid from dark chocolate was optimized using MAC_s and MAE. In each case, an OFAT methodology was used to define the best extraction condition considering two factors (independent variables): extraction time and solvent type. The author also examined the stability characteristics of the newly developed chocolate. The results indicated that the chocolate sample constituted a feasible matrix for addition of a lemon balm extract as the bioactive compound (rosmarinic acid) of freeze-dried lemon balm extract was not affected.

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az utóbbi években jelentős mértékben megnövekedett a gyógynövényekből készült természetes termékek iránti kereslet, melyet az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2019-es adatai is alátámasztanak. E szerint ugyanis a világ lakosságának 88%-a használ gyógynövényes készítményeket. Ezen termékek használatára- és fogyasztására vonatkozó attitűdökről ugyanakkor általánosan elmondható, hogy pozitív kapcsolatban állnak azon téves egészséghittel, miszerint a gyógynövény alapú gyógyszerek és étrend-kiegészítők teljesen ártalmatlanok ezáltal használatuk is kockázatmentes (Polereczki és mtsai, 2019). Természetesen azonban ez közel sincs így, hiszen lehetnek mellékhatásaik, sőt előfordulhat összeférhetlenség más gyógynövény hatásával, ráadásul gyártásuk és forgalmazásuk mellett a minőségbiztosításukra fordított figyelem sem oly mértékű, mint a szintetikus gyógyszerkészítmények esetében. Ebből adódóan fogyasztói szempontból való biztonságosságuk és hatékonyságuk is kérdéseket vet fel (Petri, 2006; Gafner és Bergeron, 2015).

A gyógynövények nem csodaszerek, azonban, ha megfelelő időben és módon használjuk őket, akkor számos kedvező élettani hatást eredményezhetnek (Petri, 2006). Napjainkban a nagy rozmaringsav-tartalmú gyógynövénykivonatok egyre nagyobb figyelemnek örvendenek farmakológiai hatásaiknak köszönhetően. A komponens a fenolos-savak csoportjába tartozó növények által termelt másodlagos metabolit, melyet gyakran alkalmaznak marker vegyületként a Lamiaceae család Nepetoideae alcsaládjában (Mishra és mtsai, 2020). Mindemellett számos kutatás kimutatta, hogy jelentős szerepet tölt be a neurodegeneratív rendellenességek (Fachel és mtsai, 2019), a diabetes mellitus (Runtuwene

és mtsai, 2016) vagy a rákos megbetegedések (Swamy és mtsai, 2018) prevenciójában és kiegészítő terápiájában.

Kutatásom során céлом volt a kiválasztott *Melissa*, *Mentha*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia* és *Thymus* nemzetségekbe tartozó Lamiaceae fajok rozmaringsav komponensének meghatározása és olyan extraktumainak előállítása, mely kedvező hatóanyag tartalmának köszönhetően alkalmas lehet tinktúra formájában étrend-kiegészítőként, illetve szárazkivonat formájában funkcionális élelmiszer összetevőként. Ezen szemlélet alapján a doktori képzésben végzett kutatómunkám során elsőként célul tűztem ki, hogy a citromfű, a borsosmenta, a szurokfű, a rozmaring, az orvosi zsálya és a kerti kakukkfű hagyományos (macerálás kevertetéssel, forralás visszafolyóztatással) és mikrohullámmal segített extrakciója során meghatározzam azon paraméterek hatását melyek jelentősen befolyásolják a hatóanyag diffúzióját. További céljaim között szerepelt olyan tinktúrák előállítása, melyek bizonyítottan nagy rozmaringsav-tartalommal rendelkeznek. Ennek igazolására elvégeztem a tinktúrák kvalitatív és kvantitatív vizsgálatát, továbbá elemzéseket végeztem a rozmaringsav stabilitására vonatkozóan. Mindemellett célul tűztem ki az alkalmazott antioxidáns kapacitás mérő módszerek (összes polifenol-tartalom, DPPH) és a mennyiségileg meghatározott rozmaringsav közti összefüggések feltárását is. Kutatómunkám utolsó szakaszában különböző betegségek kiegészítő terápiájában alkalmazható egészségvédő hatású, teljesen új, innovatív funkcionális élelmiszernek (növényi száraz extraktummal adalékolt étcsokoládé) a kifejlesztését tűztem ki célul. Ezen irányú vizsgálataim során az RP-HPLC, az extrakciós módszerek fejlesztése, valamint az étcsokoládéban lévő

rozmaringsav kvalitatív és kvantitatív elemzése mellett, a termék eltarthatósági vizsgálatával is foglalkoztam.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Lamiaceae növénycsalád rövid bemutatása

Az árvacsalánfélék vagy ajakosok családjába (Lamiaceae) több mint 200 nemzetség és 7000 faj tartozik, mellyel a hatodik legnagyobb család a növények országán belül (Bekut és mtsai, 2018). Növényfajai viszonylag könnyen felismerhetők négyszögletes száraikról, valamint keresztben átellenes leveleikről. Lehetnek lágyszárúak vagy félcserjék. Virágjaik zigomorfak, ajakos felépítésűek, melyek levélhóralji álörvökben, bogas virágzatokban állnak. Kétfőporzósak, vagyis négy porzójukból kettő rövidebb, kettő hosszabb. Termésük hasadó makkocskára, mely 4 makkocskára esik szét. Virágképletük: $\downarrow K_{(5)} C_{(5)} A_{2+2}$ vagy $2 G_{(2)}$ (Turcsányi, 1995; Sim és mtsai, 2019).

A Lamiaceae család felosztásáról 1876-ban Benthman számolt be elsőként, akinek munkája mind a mai napig nagy jelentőséggel bír. Briquet mintegy 20 évvel később (1895-1897) Benthman munkájára alapozva a Lamiaceae családot a következő 8 alcsaládra osztotta: Ajugoideae, Prostantheroideae, Prasioideae, Scutellarioideae, Lavanduloideae, Stachyoideae, Ocimoideae, Catopherioidea. Erdtman 1945-ben a pollen morfológia alapján a családba tartozó növényeknek a következő két alcsaládba való sorolását javasolta: Lamioideae, valamint Nepetoideae (Sharma, 2009; Moon és mtsai; 2010, Gul és mtsai, 2019). Ez utóbbit Harley és mtsai (2004) további 3 törzsre (Elsholtzieae, Mentheae, Ocimmeae) osztották. A két alcsalád között számos morfológiai és kémiai különbség mutatkozik. Míg például a Nepetoideae alcsaládra nagy illóolaj és rozmaringsav-tartalom ($\geq 0,5\%$ szárazanyagra vonatkoztatva) jellemző, addig a Lamioideae alcsaládba tartozó növények esetében épp az

ellenkezőjéről számoltak be (Makri és Kintzios; 2004, Gonçalves és Romano, 2018). Kutatások ugyanis kimutatták, hogy a Nepetoideae alcsalád 36 nemzetségéből 32 tartalmazta a rozmaringsavat, míg a Lamioideae alcsaládba tartozó 25 nemzetség egyikéből sem sikerült azonosítani (Janicsák és mtsai, 1999). Ezen tulajdonságából eredendően tartják a rozmaringsavat a Lamiaceae család kemotaxonómiai markerének (Makri és Kintzios, 2004). A családba tartozó fajok továbbá számos olyan bioaktív anyagot is tartalmaznak, mint mono-, di-, triterpenoidok, iridoidok, flavonoidok, szteroidok, fenolos vegyületek, szaponinok, kumarinok, alkaloidok, valamint tanninok (Ciocarlan, 2016).

A következőkben a kísérletekbe bevont; Lamiaceae családba, Nepetoideae alcsaládba azon belül pedig a Mentheae törzsbe tartozó növényeket magyar elnevezésük szerint alfabetikus sorrendben mutatom be.

2.1.1 Borsosmenta (*Mentha x piperita* L.)

A borsosmenta a fodormenta (*Mentha spicata* L.) és a vízi menta (*Mentha aquatica*) fajokból kialakult hibrid. Európában őshonos 50-90 cm magasságúra növő évelő gyógynövény, melyet a világ számos részén termesztnek. A sötét vagy világoszöld leveleinek nyele rövid, lemeze 4-9 cm hosszú, 1,5-4 cm széles, alakja ovális vagy lándzsás, széle fűrészelt. Virágai ibolya- vagy rózsaszínűek, melyek a szárok csúcsán egymás feletti örvökbe tömörülve füzérszerű virágzatot képeznek. Júniustól szeptemberig virágzik, ritkán köt magot (Rita és Animesh, 2011; Rácz és mtsai, 2012; Singh és mtsai, 2015).

Drogot száraz kivonata (*Menthae piperitae folii extractum siccum*, Ph.Hg.VIII., 2017), valamint a megszáritott egész vagy aprított levele (*Menthae piperitae folium*, Ph.Hg.VIII., 2010a) és az abból

vízgőzdesztillációval nyert illóolaja (*Menthae piperitae aetheroleum*) szolgált (Ph.Hg.VIII., 2012a).

Az első században élt görög orvos, Dioszkoridész (Kr.u. 40-90) a növény használatát gyomorbántalmak esetén javasolta (Mahendran és Rahman, 2020). Noha a borsosmentát hivatalosan csak a 17. században ismerték el, a különféle menta fajokat, különösen a fodormentát (*Mentha spicata* L.) a népi gyógyászatban évezredek óta használják. A történelmi feljegyzések szerint, míg a fodormentát fürdőkhöz adták, valamint a nemi úton terjedő betegségek kezelésére, a fogak fehéritésére és a szájfekélyek gyógyítására, addig a borsosmentát emésztési zavarok, hányinger, megfázás, láz és fejfájás esetén használták (Murray, 2020; Mahboubi, 2021). A tradicionális kínai orvoslásban „Bo He” néven influenza, fejfájás, láz és torokfájás ellen mind a mai napig alkalmazzák (Mahendran és Rahman, 2020).

A borsosmenta biológiai aktivitása (antibakteriális, vírusellenes, központi idegrendszer stimuláló, stb.) elsősorban illóolaj tartalmának köszönhető, melynek fő alkotóelemei a monoterpének közé tartozó mentol (30,0-55,0%), menton (14,0-32,0%) és mentil-acetát (2,8-10,0%) (Olennikov és Tankhaeva, 2010; Ph.Hg.VIII, 2012a). Ennek ellenére a legfrissebb kutatások kimutatták, hogy a borsosmenta fenolos vegyületei (flavonoidok, fenolos savak) antioxidáns, allergiaellenes, gyulladásgátló, tumorelles és egyéb farmakológiai hatást is mutatnak. A növény leveleiből eddig mintegy 40 fenolos vegyületet izoláltak, majd HPLC-vel végzett vizsgálatok alapján kimutatták, hogy fő hatóanyag komponense, a rozmaringsav mellett – melynek mennyisége a kvantitatív adatok alapján 2,8-51,8 mg/g között változik – az eriocitrin, a heszperidin és a luteolin-7-rutinozid található meg benne nagyobb mennyiségben (Olennikov és

Tankhaeva, 2010; Mekinić és mtsai, 2014; Oliveira és mtsai, 2018). Míg leveleit, virágait és szárait hagyományosan forrázat (gyógytea) formájában, addig nyers kivonatait, valamint illóolaj komponenseit aroma és ízesítőanyagként alkalmazza az élelmiszeripar rágógumikban, édességekben és italokban (Salehi és mtsai, 2018).

2.1.2 Citromfű (*Melissa officinalis* L.)

A citromfű a keleti mediterrán és a nyugat-ázsiai régióból származó évelő, bokros növény, melynek magassága elérheti az 1 métert. Napjainkban számos országban termesztik és honosítják. Puha, szőrös levelei 2-8 cm hosszúak és szív alakúak. Levélfelülete durva, mélyen erezett, széle fogazott vagy fűrészkes. Virágai fehér, illetve halvány rózsaszínűek, melyek nyáron 4-12 virágból álló kis fürtökből állnak (Moradkhani és mtsai, 2010; Chizzola és mtsai, 2018).

Drogot a leveléből készített száraz kivonata (*Melissae folii extractum siccum*, Ph.Hg.VIII., 2010b), valamint szárított leve (*Melissae folium*) szolgáltató, melynek a szárított drogra vonatkoztatva legalább 1% rozmaringsavat kell tartalmaznia a jelenleg hatályban lévő VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásai alapján (Ph.Hg.VIII., 2009).

A citromfű gyógyászati felhasználása több mint 2000 évvel ezelőttre nyúlik vissza. Dioszkoridész, akit a farmakológia atyjaként is tekintenek „*De Materia Medica*” c. művében megemlíti, hogy a növény leveleiből készített forrázat kiváló a skorpiócsípés és a kutyaharapás kezelésére, de hatékonyan alkalmazható az elmaradt menstruáció, a vérhas, a bélfekélyek, a nehézlégzés, kisebb daganatok és ízületi fájdalmak gyógyításánál is. A középkorban fogfájás, fülfájás, reggeli rosszullét, valamint a kopaszság kezelésére alkalmazták. Paracelsus (1493-1541) arról írt, hogy a citromfűtől élénkebb lesz a memória és enyhíti az

idegrendszeri megbetegedéseket (Shakeri és mtsai, 2016). Ezt a jelenkor orvostudománya is bizonyította, sőt mi több, számos újabb hatásokat is tulajdonítanak a növények. A citromfű és fő hatóanyaga, a rozmaringsav ugyanis neuroprotektív hatással rendelkezik, aminek köszönhetően számottevő kutatást végeznek annak érdekében, hogy bizonyítsák a növényből készített kivonatok hatását az agyat érintő betegségek kezelésében (Ramanauskienė és mtsai, 2016). Legújabb kutatási eredmények kimutatták, hogy az enyhe és közepesen súlyos Alzheimer-kórra is hatással van azáltal, hogy kivonatai gátolják az acetil-kolin lebontását az emberi agysejtkultúrában (Ozarowski és mtsai, 2016). Vizes és alkoholos kivonatai légzőszervi problémák, különböző rákos daganatok, valamint memória problémák kezelésére és megelőzésére használatosak (Arceusz és Wesolowski, 2013; Binello és mtsai, 2017). Néhány közelmúltbéli tanulmány azt is kimutatta, hogy a fagyasztva szárított citromfűkivonat gátolta a Basedow-kór kialakulásáért felelős thyreoida-stimuláló immunglobulin kötődését a pajzsmirigyhez, ami arra utal, hogy a citromfűből készített kivonatok a pajzsmirigybetegségek kezelésében is hasznosak lehetnek (Basar és Zaman, 2013). A kivonatait tartalmazó krémek pedig bizonyítottan hatásosak a *herpes simplex* vírus kezelésére, melyet *in vitro* és klinikai vizsgálatokkal is alátámasztottak (Duke, 2002). Az élelmiszeriparban leveleit zselék, likőrök, gyümölcssaláták és hideg italok ízesítésére használják (Bahtiyarca Bağdat és Coşge, 2006). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a citromfű számos jótékony hatása nem köthető kizárólag a rozmaringsavhoz, hiszen a komponens mellett további hidroxifahéjsavak (p-kumársav, kávésav), flavonoidok (luteolin, apigenin, kaempferol, kvercetin), tanninok és

triterpének (oleanol és urzolsav) is megtalálhatók (Arceusz és Wesolowski, 2013).

2.1.3 Kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris* L.)

A Mediterrán térségből származó kerti kakukkfű körülbelül 40 cm magasra növe, talajtakaró, elágazó évelő cserje. Levelei keresztben átellenesek, általában 2,5-5 mm hosszúak, ovális, négyszögletes alakúak (Dauqan és Abdullah, 2017). Virágai fehér vagy lila színűek, melyek májustól szeptemberig virágznak (Javed és mtsai, 2013).

Drogot szárított levele és hajtása (*Thymi herba*, Ph.Hg.VIII., 2014), valamint vízgőzdesztillációval előállított illóolaja (*Thymi aetheroleum*) szolgáltat (Ph.Hg.VIII., 2002a).

A *Thymus* nemzetségbe tartozó fajok felhasználása az ókori Egyiptomig nyúlik vissza, ahol illatosított balzsamok készítésére és a mumifikálás során használták őket. Dioszkoridész írásából idézve „*a kakukkfüvet mindenki ismeri*”. Alkalmazását elsősorban asztma, torok és gyomorproblémák esetén javasolta. A 15-16. századi kéziratokban, mint köhögéscsillapító szerepel, valamint használatát megfázás, gégegyulladás, migrénes fejfájás esetén javasolták. A reneszánsz időszakban (16. és 17. század) a malária kezelésére és az epilepszia ellen alkalmazták (Jarić és mtsai, 2015). A kerti kakukkfűnek manapság leginkább a benne található illóolajok miatt tulajdonítanak nagyobb jelentőséget, ennek köszönheti ugyanis sajátos, fűszeres aromáját. Ebből adódóan a növényvel kapcsolatos korábbi vizsgálódások nagy része is az illékony vegyületeinek elemzésére összpontosítanak (Kindl és mtsai, 2015). Illóolajában legnagyobb mennyiségben a monoterpének közé tartozó timol (36,0-55,0%) fordul elő (Ph.Hg.VIII., 2002a), mely a karvakrollal együtt a növény antioxidáns és antimikrobiális hatásához járul hozzá (Gedikoglu

és mtsai, 2019). A nem illékony alkotóiról rendelkezésre álló információk hiányosak, éppen ezért számos megválaszolatlan kérdés merül fel a növényből készített kivonatok által közvetített bioaktivitással kapcsolatban (Alu'datt és mtsai, 2015). Fenolos komponensei közül legnagyobb mennyiségben eddig a rozmaringsav (2,4-23,5 mg/g) és a luteolin jelenlétét mutatták ki, melyek erős antioxidáns hatással bírnak, továbbá gátolják a sejtburjánzást és a rákos daganatok kialakulását (Hou és mtsai, 2009; Shekarchi és mtsai, 2012; Benedec és mtsai, 2017; Leal és mtsai, 2017). Az élelmiszeriparban, mint kulináris összetevő ősidők óta használatos. Elsősorban sajtok, likőrök, saláták, levesek, mártások, illetve húsok ízesítésére alkalmazzák (Pereira és mtsai, 2013; Satyal és mtsai, 2016).

2.1.4 Orvosi zsálya (*Salvia officinalis* L.)

Az orvosi zsálya Dél-Európából és a Földközi-tenger térségéből származó népszerű fűszer- és gyógynövény, melyet manapság világszerte termesztnek (Craft és mtsai, 2017). Legfeljebb 60 cm magasra növő örökzöld illatos félcserje, melynek hosszúkás levelei keresztben átellenesek, 4-6 cm hosszúak, szélük csipkézett, végük lekerített, erezetük finoman kiemelkedő, hálózatos. A levéllemez alsó oldala fehér, míg a felső felülete zöldes vagy zöldesszürke színű az ereken látható szörképletek miatt. Kétajkú rózsaszín, ibolyás kék, ritkábban fehér virágjai a szár csúcsán, a levelek fölötti részen örvösen csoportosulnak. Az éghajlati viszonyoktól függően márciustól júliusig virágzik (Devansh, 2012; Rác és mtsai, 2012; Grdiša és mtsai, 2015).

Drogot a szárított egész vagy aprított levele (*Salviae officinalis folium*, Ph.Hg.VIII., 2015), valamint tinktúrája (*Salviae tinctura*)

szolgált (Ph.Hg.VIII., 2002b). Illóolajára vonatkozó követelményeit az ISO 9909:1997 Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis*) tartalmazza.

A rómaiak által „szent növénynek” tartott orvosi zsálya az ókorban az egyik legfontosabb gyógynövény volt. Dioszkoridész vizelethajtásra, vérzéscsillapításra és menstruációs problémákra ajánlotta. A középkori természettudós és apátnő, Bingeni Szent Hildegárd (1098-1179) fejfájásra, köhögés ellen, és sebgyógyító szerként javasolta használatát. John Gerard (1545-1612) angol gyógynövénykutató, valamint Nicholas Culpeper (1616-1654) orvos és gyógynövénygyógyász egyaránt állította, hogy jót tesz a fejnek és javítja a memóriát (Grdiša és mtsai, 2015). Míg Ázsia és Latin-Amerika népi gyógyászatában fekélyek, köszvény, reumás megbetegedések kezelésénél, addig Európában enyhe emésztési zavarok, túlzott izzadás, valamint a torok és a bőr gyulladással eredetű megbetegedéseinél használták. Az utóbbi években számos kutatást végeztek biológiai aktivitásának felkutatására, melynek következtében széleskörű farmakológiai hatását fedezték fel. Ezen nagyszámú vizsgálatoknak köszönhetően eddig több mint 120 illóolaj komponens (Ghorbani és Esmaeilizadeh, 2017) és mintegy 160 polifenolos alkotót, többek között fenolos savakat és flavonoidokat azonosítottak a növényből (Lopresti, 2017). Az orvosi zsályában található polifenolos alkotóknak, valamint fő fenolos vegyületének a rozmaringsav nagy mennyiségének (15,0-39,3 mg/g) köszönhetően a növénynek neuroprotektív, antioxidáns, rákellenes, immunmoduláló és gyulladásgátló hatást tulajdonítanak (Shekarchi és mtsai, 2012; de Oliveira és de Oliveira, 2013; Fotovvat és mtsai, 2019). Az élelmiszeriparban leginkább forrázat formájában használják (Walch és mtsai, 2011), ugyanakkor egyes kutatások kimutatták, hogy kivonatai természetes tartósítószerként is alkalmazhatók

azáltal, hogy késleltetik a lipidek oxidatív lebomlását (Sharifi-Rad és mtsai, 2018). Számos pozitív élettani hatása ellenére azonban fel kell hívni a figyelmet arra, hogy illóolaja α -tujont tartalmaz, mely nagy dózisban blokkolja az γ -aminovajsav (GABA) kloridcsatornák gátlását, aminek következtében krónikus neurotoxicitást és karcinogenitást okozhat (Craft és mtsai, 2017). Az Európai Parlament és Tanács 1334/2008/EK rendelete deregulálta a tujontartalmú növények élelmiszerekben való alkalmazását, aminek következtében csak az üröm nemzetségből (*Artemisia*) előállított italok kerültek szabályozásra. A rendelet továbbá a tujonnak (α , β) az élelmiszerekhez történő hozzáadását is tiltja.

2.1.5 Rozmaring (*Rosmarinus officinalis* L.)

A rozmaring a Földközi-tenger térségéből származó, elágazó, bokros, örökzöld, csaknem 1 méter magasra növekvő évelő cserje, melyet Spanyolországban, Marokkóban, Tunéziában és Európa délkeleti részén is természetesen. Levelei 1-4 cm hosszúak, 2-4 mm szélesek, színi oldaluk sötétzöld színűek, fonáki oldaluk szürke, bolyhos, széleik hátra göngyöltek. Fő erezetük erőteljesen kiemelkedik. Kalász formájú virágjai fehér vagy kék színűek (Begum és mtsai, 2013; Wollinger és mtsai, 2016; Andrade és mtsai, 2018).

Drogot egész vagy aprított szárított levele (*Rosmarini Folium*, Ph.Hg.VIII, 2002c), valamint illóolaja (*Rosmarini aetheroleum*) szolgáltat (Ph.Hg.VIII., 2002d).

A rozmaring az ókor óta az egyik legismertebb gyógynövény, melyet Dioszkoridész idején a szobák illatosítására és rovarölőszerként használtak. Az évszázadok során a népi gyógyászatban gutaütés, gyomorfájdalom, fejfájás, étvágytalanság és ízületi fájdalmak kezelésére használták. Mindezek mellett vizelethajtó, epilepszia elleni, sebgyógyító

és köptetőszerként volt ismeretes. A növényből készített rozmaringszesz, „*Magyar Királyné Vize*” (Aqua Reginae Hungariae) néven vált igazán ismertté, melyet a köszvényes betegek kezelésére és hajhullás ellen használtak (Korkes, 2004; González-Minero és mtsai, 2020).

A növénynek számos élettani hatást tulajdonítanak, melyek közül kiemelkednek antibakteriális, antidiabetikus, gyulladásgátló, és antidiuretikus tulajdonságai (Habtemariam, 2016). Kimutatták továbbá, hogy kivonatai gátló hatást fejtenek ki az emlő, a máj, a prosztata és a tüdő karcinóma, valamint a leukémia rákos sejtjeire (Borrás-Linares, 2014). Mindezek mellett pedig kiváló antioxidáns hatással rendelkezik, melyet az is alátámaszt, hogy az Európai Unió (EU) jóváhagyta, hogy kivonatát az élelmiszeripar, mint természetes antioxidáns (E392) alkalmazza azáltal, hogy javítja a romlandó élelmiszerek eltarthatóságát (Andrade és mtsai, 2018). A szervezetre gyakorolt jótékony hatásait elsősorban a benne található diterpenoidoknak (karnozinsav, karnozol) köszönheti (Mena és mtsai, 2016). Fontos megjegyezni, hogy nevéből adódóan számos országban tévesen az egyik legfontosabb rozmaringsav forrásnak tekintik. Több kutató ugyanis munkájával igazolta, hogy rozmaringsav-tartalma (2,2-9,7 mg/g) sok esetben kevesebb a többi Lamiaceae családba tartozó gyógynövényekéhez képest (Luis és Johnson, 2005; Shekarchi és mtsai, 2012; Skendi és mtsai, 2017; Sik és mtsai, 2020).

2.1.6 Szurokfű (*Origanum vulgare* L.)

A szurokfű vagy más néven oregánó a Földközi-tenger térségéből származó 20-80 cm magasra növő aromás, fás gyökértörzsszel rendelkező évelő növény, melyet manapság már a legtöbb kontinensen termesztenek. Levelei átellenesen helyezkednek el a száron, melyek tojásdad alakúak, 10-44 mm hosszúak és 5-25 mm szélesek. A levél szélek simák, csúcsuk

hegyes vagy kerek. Virágai májustól októberig nyílnak, melyek fehéres lila színűek, pártájuk 5-8 mm hosszú (Singletary, 2010; Singh és mtsai, 2018).

Drogot a szárrészekről mentes, szárított levele és virága (*Origanum herba*) szolgáltat. A jelenleg hatályban lévő VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásai alapján a növénynek a vízmentes drogra vonatkoztatott illóolajtartalma legalább 25 mL/kg kell, hogy legyen, valamint 1,5% karvakrolt és timolt kell tartalmaznia (Ph.Hg.VIII., 2008a).

Míg az ókori Rómában a növényt sebek borogatására és izomfájdalmak esetén alkalmazták, addig Görögországban skorpió és pókcspés esetén javasolták. A növényrel kapcsolatos legelső írásos emlék Theophrasztosz (Kr.e. 380-287) nevéhez köthető, aki „*Inquiry Into Plants*” c. művében az „*origanos*” és „*origanon*” kifejezéseket használta (Calpouzios, 1954). Manapság fűszernövényként az élelmiszeriparban levelét és virágát különböző ételek és italok ízesítésére (Davidenco és mtsai, 2014), gyógynövényként pedig a hagyományos népi gyógyászatban légúti megbetegedések (asztma, hörghurut, köhögés), menstruációs zavarok és gyomorfájdalmak enyhítésére alkalmazzák. Mindezek mellett azonban a növény antimikrobiális, vírusellenes, antioxidáns, karminatív és emmenagógiai tulajdonságokkal is rendelkezik (Gutiérrez-Grijalva és mtsai, 2018; Oniga és mtsai, 2018). Ezen pozitív hatásait a legtöbb esetben a benne található illóolajoknak tulajdonítják, melyből adódóan a szurokfűben található hatóanyagok elemzéséről szóló cikkek nagy része is ezen vegyületeinek vizsgálatára korlátozódik annak ellenére, hogy a növény fenolos komponensekben is gazdag. A fenolos savak közül alkoholos kivonataiban legnagyobb mennyiségben a rozmaringsav található meg, melynek mennyisége 4,2-25,0 mg/g között változik az irodalomban. Továbbá kivonataiból kimutatták a klorogénsavat, a

kávésavat, a vanillinsavat, a p-kumársavat és a protokatekinsavat is. A flavonoid komponensek közül pedig a hiperozid, a rutin, a luteonin és az apigenin fordul elő benne leggyakrabban (Radušienė és mtsai, 2008; Shekarchi és mtsai, 2012; Benedec és mtsai, 2015; Oniga és mtsai, 2018).

2.2 Gyógynövények felhasználási formái és jogi szabályozásuk

Napjainkra a növényi készítmények iránti kereslet jelentősen megnövekedett köszönhetően a bennük található másodlagos vegyületek kedvező hatásainak. A 450/2017. (XII.27.) Korm. rendelet értelmében növényi készítményeknek a növényi anyagokon végzett kezelések, például extrakció, desztilláció, sajtolás, frakcionálás, tisztítás, koncentráció vagy fermentálás révén nyert készítményeket nevezzük. Ezek közé tartoznak a növényekből származó aprított vagy porított anyagok, tinktúrák, kivonatok, illóolajok, kisajtolt levek, szuperkritikus kivonatok, olajok és feldolgozott vialadékok. Az így előállított termékeket számos iparág alkalmazza, melyek közül legnagyobb múlttal a gyógyszeripar rendelkezik köszönhetően annak, hogy a gyógynövények gyógyászati célú felhasználása szinte egyidős az emberiséggel. A legrégebbi írásos emléket egy Nagpurból származó közel 5000 éves sumér, mintegy 250 különféle gyógynövényre vonatkozó, 12 gyógyszerkészítési receptet magába foglaló agyagtáblán találták. Noha még számos írásos emléket lehetne említeni a történelem folyamán; gyógyászati szempontból a gyógynövények ismeretében és felhasználásában a 19. század eleje jelentette a fordulópontot, amikor is felfedezték az alkaloidokat, majd izolálták mákból (1806), ipekakuánából (1817), farkasmaszlagból (1817), gránátalmából (1878) és más növényekből. A későbbiekben a kémiai módszerek fejlődése elvezetett további hatóanyagok (glikozidok, tanninok, vitaminok, hormonok) megismeréséhez, izolálásához,

szerkezetvizsgálásához, majd még hatékonyabb vegyületekké történő átalakításához (Petri, 2006; Sasidharan és mtsai, 2011; Petrovska, 2012; Leja és Czaczyk, 2016). Az elmúlt században a növényi gyógyszerkutatás számos területre koncentrált, beleértve a farmakognóziát, a minőség-ellenőrzést, valamint a laboratóriumi és a klinikai tesztek. Mindezeknek köszönhetően számos áttörést sikerült elérni a növényekből előállítható gyógyszerekre. Erre egyik példa a kínai hagyományos orvoslásban alkalmazott artemisinin nevezetű gyógyszer, mely nem más, mint az egynyári üröm (*Artemisia annua* L.) hatóanyaga. További két másik jelentős példa a tumoros megbetegedéseknél alkalmazott vinkrisztin és taxol. Míg az előbbi a rózsameténg (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) alkaloidja, addig az utóbbit a tiszafából (*Taxus baccata* L.) izolálták (Chau és mtsai, 2011). A növényi gyógyszerkészítmények a 2001/83/EK irányelv hatálya alá tartoznak. Ezen irányelv kiegészítéseként terjesztették elő a 2004/24/EK irányelvet miután felismerték, hogy a vállalatok nehezen tudják teljesíteni a növényi készítmények forgalomba hozatalához szükséges követelményeket, különösen a hatékonyság szempontjából (Verma, 2016). Az irányelv hazai végrehajtásáról az 52/2005. (XI. 18.) EüM rendelet rendelkezik. Noha hazánkban a természetes anyagok (növényi szerek) szabályozására az EU csatlakozását megelőzően is volt precedens (10/1987. (VIII.19.) EüM rendelet), a csatlakozást követően a jogharmonizáció révén a gyártók és forgalmazók 2011. március 31-ig kérhették a gyógytermék kategóriába tartozó kizárólag növényi összetevőket vagy növényi összetevőt is tartalmazó készítmények gyógyszerre vagy más terméké (étrend-kiegészítő, kozmetikum, hagyományos növényi gyógyszer stb.) történő átminősítését. Az új szabályozás értelmében ugyanis növényi gyógyszernek csak az nevezhető,

mely hatóanyagként kizárólag egy vagy több növényi anyagot, illetve növényi készítményt vagy ezek kombinációját tartalmazza. Hagyományos növényi gyógyszernek pedig a növényi gyógyszerek azon alcsoportjába tartozó készítmények minősülnek, melyek a kérelem időpontját megelőzően legalább 30 éves időtartamon keresztül gyógyászati használatban voltak, ebből legalább 15 évig az EU területén, továbbá amelyek orvosi diagnózis, felügyelet és rendelvény nélkül szájon át, külsőleg vagy belélegezve használandók.

Bár számos növényi készítmény található a piacon, felhasználásuk és jogi szabályozásuk szempontjából a fentebb bemutatott gyógyszerjellegű készítményeken kívül az élelmiszerjellegű különböztetjük meg, mint két fő felhasználási irányt. A növekvő fogyasztói egészségtudatosság, valamint a rendelkezésre álló információk a különféle étrendek hasznosságáról és annak az emberi egészségre gyakorolt hatásáról ösztönözte az ipart az egészségesebb és táplálódóbb élelmiszerek kutatására és fejlesztésére. Ezekre gyakran, mint funkcionális élelmiszer vagy étrend-kiegészítő hivatkoznak. Noha a funkcionális élelmiszerek fogalmának definiálására máig nem található jogilag egy általánosan elfogadott meghatározás, olyan élelmiszereket vagy élelmiszer-összetevőket értünk alattuk, melyek jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségére és/vagy csökkentik a krónikus betegségek kockázatát az alapvető táplálkozási funkciókon túl (Leja és Czaczyk, 2016; Santos-Buelga és mtsai, 2019). A Nemzetközi Élelmezési Információs Tanács Alapítványa a következő csoportokra különítette a funkcionális komponenseket: karotionidok, fenolos savak, flavonoidok, növényi sztanolok/szterinek, élelmi rostok, zsírsavak, izotiocianátok, ásványi anyagok, poliolok, pre- és probiotikumok, fitoösztorgének,

szójafehérjék, szulfidok/tiolok és vitaminok (Carović-Stanko és mtsai, 2016). Az elmúlt években számos kutatás jelent meg ezen növényi összetevők funkcionalitásával, toxicitásával és az élelmiszerekben történő alkalmazhatóságával kapcsolatban. Mindezek ellenére fontos megjegyezni, hogy a növényi anyagoknak az élelmiszerekhez való hozzáadása funkcionális termékek létrehozása érdekében számos kérdést vet fel, beleértve a megfelelő szabályozást, a biztonságot, a stabilitást és a hatékonyságot (Percival és Turner, 2001). Az egyik fő problémának a gyógy- és fűszernövények mikrobiális instabilitását tartják az élelmiszerekben való alkalmazásukkor. A különböző termékekben való „viselkedésük” továbbá függ az alkalmazott gyógynövény típusától és mennyiségétől is, melyek egyúttal összefüggésben állnak az organoleptikus tulajdonságokkal is azáltal, hogy befolyásolják a termékek színét, aromáját és textúráját. Ráadásul a gyógynövények, illetve a gyógynövény hatóanyagok élelmiszerekben való alkalmazása technológiai módosításokat vagy átalakításokat is igényelhet annak érdekében, hogy az adott élelmiszer érzékszervi minősége változatlan maradjon. Fontos megjegyezni, hogy a feldolgozási körülményekről, különösen a hőkezelésnek a gyógynövények funkcionális alkotóelemeire gyakorolt hatásáról rendelkezésre álló irodalmi adatok csekélyek. Éppen ezért javasolt ezen irányú kutatásokat a feldolgozási körülményeknek, például a hőkezelésnek, fagyasztásnak, a pH-nak és a savnak a gyógynövények funkcionális összetevőire gyakorolt hatására irányítani annak érdekében, hogy az ilyen típusú termékek előállításánál során a növényekben lévő funkcionális komponensek kevésbé vagy egyáltalán ne sérüljenek, ezáltal megtartva biológiai aktivitásukat. Mindezen felül szintén nagyon kevés információ áll rendelkezésre ezen funkcionális

összetevők maradványszintjeinek bemutatására a különféle élelmiszerekben. Nem kétséges, hogy a különféle gyógynövényekkel dúsított/adalékolt élelmiszerek száma rohamosan növekszik, ugyanakkor belátható, hogy tudományos szempontból alkalmazásuknak megfelelősége még számos kérdést vet fel, hiszen mindamelllett, hogy elsődleges szempont a biztonságos használatuk, fontos, hogy kellő hatékonysággal is rendelkezzenek ezáltal elősegítve a funkcionalitást (Hussain és mtsai, 2015).

Ellentétben a funkcionális élelmiszerekkel az étrend-kiegészítők jogi szabályozása megoldott. Hazánkban az étrend-kiegészítőkre vonatkozó követelményeket a 37/2004. (IV.26.) ESzCsM rendelet tartalmazza a 2002/46/EK irányelv előírásainak megfelelően. E szabályozások értelmében étrend-kiegészítőnek olyan élelmiszereket nevezhetünk, melyek a hagyományos étrend kiegészítését szolgálják és koncentrált formában tartalmaznak tápanyagokat (vitaminok, ásványi anyagok) vagy egyéb élettani hatással rendelkező anyagokat (növények, rostok, gyógynövénykivonatok, aminosavak, stb.) egyenként vagy kombináltan. Forgalomba adagolt vagy adagolható formába kerülnek, megjelenési formájuk pedig lehet kapszula, pasztilla, tablettá, port/szirupot tartalmazó tasak, folyadékot tartalmazó ampulla, csepegtető üveg vagy más hasonló forma, amely por, illetve folyadék kis mennyiségben történő adagolására alkalmas. A rendelet hatályba lépésével egyúttal megszűnt az előzetes kötelező engedélyezés is, helyette pedig csak az ún. bejelentési kötelezettségnek kell eleget tenni, melyet legkésőbb a termék első forgalomba hozataláig szükséges benyújtani az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet (OGYÉI) felé.

2.3 Gyógynövénykivonatok

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv értelmében kivonatoknak a száraz állapotú növényi drogból vagy állati eredetű anyagokból előállított folyadékokat (folyékony kivonatok, tinktúrák), félszilárd (sűrű kivonatok, olajos gyanták) vagy szilárd (száraz kivonatok) halmazállapotú készítményeket nevezük (Ph.Hg.VIII., 2008b). Dolgozatom témájából adódóan a következőkben a folyékony halmazállapotú készítményeket, valamint a szilárd kivonatokot kívánom röviden összefoglalni.

2.3.1 Folyékony kivonatok/tinktúrák

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv értelmében folyékony kivonatokon (*Extracta fluida*) olyan cseppfolyós halmazállapotú készítményeket értünk, melyeknek 1 tömeg- vagy térfogatrésze általában egyenértékű a szárított növényi drog vagy az állati eredetű anyag 1 tömeg- vagy térfogatrészeivel. Amennyiben szükséges, az oldószer, illetve összetevő-tartalmukat a követelményeknek megfelelően állítják be (Ph.Hg.VIII., 2008b). Leggyakoribb megjelenési formájuk a vizes- (forrázat, főzet), az alkoholos- és a glicerines kivonatok. Az így előállított készítmények előnyei közé tartozik például, hogy további műveletekkel (koncentráció, kötőanyagok hozzáadása) egyéb termékek (tabletta, szirup) alakíthatók. De ugyanígy megemlíthető például a vizes kivonatok esetében az olcsó előállíthatóság vagy az alkoholos készítmények esetében a kis mennyiségben elegendő alkalmazás azáltal, hogy koncentrált formában tartalmazzák a kedvező hatással bíró hatóanyagokat. Előnyeik mellett azonban hátrányaikról sem szabad megfeledkezni. A vizes kivonatok például rövid eltarthatósági idővel és kis hatóanyag tartalommal rendelkeznek azáltal, hogy csak vízben oldható komponenseket

tartalmaznak. Az alkoholos kivonatok előállítása pedig viszonylag drága mindamelllett, hogy a nagy alkoholtartalom denaturálhatja az egyes bioaktív összetevőket (Romm és mtsai, 2010; Moini, 2015).

Tinktúrákon (*Tincturae*) a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírása alapján olyan folyékony készítményeket értünk, melyeket ötszörös vagy tízszeres mennyiségű extrahálószer segítségével nyernek áztatással vagy perkolálással növényi drogból vagy állati eredetű anyagból (Ph.Hg.VIII., 2008b). A tinktúrák tulajdonképpen víz-etanolos kivonatok. Attól függően, hogy mely hatóanyag kivonása a cél, alkoholtartalmuk 20 és 95 v/v% között változik. Míg például a vízben oldódó tanninok, valamint egyes flavonoidok és szaponinok esetében a 25 v/v% etanol koncentráció alkalmazása ajánlott, addig az alkaloidok, a polifenolok és egyes glikozidok kinyeréséhez 45-60 v/v%-os etanol koncentráció szükséges (Kumadoh és Ofori-Kwakye, 2017).

A növényi készítmények, így a tinktúrák minőségének maximalizálása szempontjából is fontos a megfelelő etanol-koncentráció használata. A kész kivonat etanol tartalma legalább 20 v/v% kell, hogy legyen a megfelelő eltarthatóság érdekében, mely a kereskedelemben kapható termékek esetében általában minimum 1 év. Mindezek ellenére, egyes kutatások azt mutatják, hogy a tinktúrákban lévő hatóanyagok 3-6 hónap elteltével jelentősen lebomlanak szobahőmérsékleten való tárolás során (Bilia és mtsai, 2002; Prosen és Pendry, 2016). Ezen vizsgálati eredményekből adódóan következik, hogy a különböző növényi kivonatok optimális tárolási körülményeinek, valamint eltarthatóságának meghatározásához további vizsgálatok szükségesek, ezáltal hozzájárulva ezen készítmények hatékonyságának maximalizálásához és biztosítva a fogyasztók számára a megfelelő minőséget (Romm és mtsai, 2010;

Kumadoh és Ofori-Kwakye, 2017). A stabilitási tesztek protokolljait az International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) írja elő. A gyógynövénykészítmények esetében a stabilitási tesztek csak nemrégiben kerültek a figyelem középpontjába az alacsony minőségű növényi termékek közegészségügyi kockázatainak növekvő bizonyítékai miatt. Ezen tesztek iránymutatásait az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) növényi eredetű gyógyszerekkel foglalkozó bizottsága (HMPC) adaptálta. Az ICH Q1A (R2) Guideline előírása szerint a termékben az ismert terápiás hatással rendelkező alkotórészt vagy a termékre jellemző hatóanyag markert meg kell határozni és a közbenső ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ relatív páratartalom (RH)), illetve a gyorsított ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75 \pm 5\%$ RH) típusú stabilitásvizsgálatok esetében legalább 6 hónapig nyomon követni. Hosszú időtartamú vizsgálatok esetében ez legalább 12 hónapra változik a következő tárolási körülményekkel: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH vagy $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $65 \pm 5\%$ RH. Jelenleg a gyógynövényes tinktúrák és más készítmények stabilitási vizsgálatát elsősorban az aktív vagy marker hatóanyag komponensek mennyiségi meghatározásával végzik kromatográfiás eljárással. Az azonosítási teszteknek kifejezetten a növényi készítményre kell vonatkozniuk, hogy a hamisítások elkerülhetővé váljanak. Éppen ezért csak a retenciós idő alapján történő azonosítás nem elfogadható. Ezen irányú vizsgálatok elvégzéséhez specifikusnak a kromatográfiás módszereknek (HPLC, GC) a tömegspektrometriával (MS) vagy a HPLC eljárás UV-VIS technikával való kombinációja tekinthető az EMA/HMPC/162241/2005 Rev.3 monográfiája értelmében, mely azt is előírja, hogy a megengedhető hatóanyagbomlás mindössze 5-10% lehet a kezdeti értékhez képest.

2.3.2 Száraz kivonatok

A száraz (szárított) kivonatok (*Extracta sicca*) csoportjába azon készítmények tartoznak, melyeket úgy nyernek, hogy az előállításukhoz használt kivonószert elpárologtatják. Ehhez ipari körülmények között leggyakrabban porlasztva szárító berendezéseket vesznek igénybe. Elterjedt továbbá még a forgótányéros-, a gejzír-, a fluidizációs és a vákuum szárítóberendezések használata is. Az alkalmazott növényi résztől és az extrahálási eljárástól függően lehetnek viszkózusosak (lágú, sűrűn folyós) vagy porszerűek (Runha és mtsai, 2001; Pakowski és Mujudar, 2007; Ph.Hg.VIII., 2008b; Davis, 2017). Az előbbi esetben azonban a szilárd adagolási forma megvalósítása jelentősen akadályozott melynek oka, hogy a víz-alkohol keverékekben olyan alkotóelemek is oldódnak melyek lehetetlenné teszik a növényi kivonat teljesen szárazra, amorf formává történő bepárlását. Ezek közül kiemelkednek például a szénhidrátok, azon belül is a legtöbb növényben nagy mennyiségben megtalálható egyszerű cukrok (glükóz, fruktóz). Az ilyen szilárd extraktumok ugyanis az alkotóik nagy kémiai aktivitásukból eredő nedvszívó hatásuk következtében kölcsönhatásba lépnek a környezetükben található vízgőzzel és ezért ragacsossá válnak (Kumar, 2016). Mivel a viszkózus állagú kivonatok szárazanyagtartalma mintegy 70%, további eljárásokra van szükség ahhoz, hogy porszerű készítményt kapjunk. Erre egyik példa, amikor a kivonat nedvességtartalmát hordozó-szubsztráttal, például kalcium-foszfáttal, keményítővel vagy maltodextrinnel helyettesítik. A lágú kivonatok ugyanis a hordozó-szubsztrátokkal szuszpenzióba keverhetők, majd további szárítási műveletekkel (általában vákuum szárítással) szilárd halmazállapotúvá alakíthatók és a kívánt állagig poríthatók (Ashurst, 2016). Másik megoldás

lehet a fagyasztva szárítás vagy más néven liofilezés, melyet leginkább az instabil és könnyen oxidálódó anyagok, valamint az antibiotikumok, a kemoterápiás gyógyszerek és bizonyos vitaminok esetében alkalmaznak. Fontos azonban megjegyezni, hogy a fagyasztva szárított anyagok hidrofil tulajdonságokkal rendelkeznek. Ennek ellenére nem áll rendelkezésre információ arról, hogy ez a tulajdonság hosszabb távon befolyásolja-e az így előállított száraz kivonatok eltarthatóságát, valamint hatásosságát a fogyasztói csomagolás felbontása után. Az eljárás során a szárítandó oldatot vagy szuszpenziót fagyasztják, majd a víztartalmat szublimálással eltávolítják (Wang és mtsai, 2006).

Papoti és mtsai (2019) munkájuk során fagyasztva szárított vizes és alkoholos citromfűkivonatok kémiai összetételét (összes polifenoltartalom, hidroxifahéjsav-származék és flavonoid tartalom, ásványi anyag összetétel) és antioxidáns hatását vizsgálták. A vizes extraktumokat közvetlenül fagyasztva szárították, míg az alkoholos kivonatok esetében az etanol eltávolításához rotációs vákuumbepárlót használtak, majd ezt követően a kapott viszkózus anyagot liofilezték. Vizsgálataik szerint a vizes citromfűkivonatok erősebb antioxidáns aktivitást mutattak mindamelllett, hogy összes polifenol és ásványi anyag tartalmuk is nagyobb volt az etanos kivonatokhoz képest.

Kutatásaik során szintén fagyasztva szárított vizes citromfűkivonatot vizsgáltak de Ciriano és mtsai (2010). Tanulmányuk célja annak felmérése volt, hogy a liofilizált citromfűkivonat antioxidáns hatása révén képes-e az algákból és lenmagból származó olajokat tartalmazó olaj-víz emulziók többszörösen telítetlen ω -3 zsírsavait „megvédeni” az oxidációtól olyan mértékben, hogy ezen emulziók felhasználhatók legyenek húskészítmények funkcionális összetevőjeként.

Vizsgálataik során fő fenolos vegyületként a rozmaringsavat mutatták ki, melynek mennyisége 67 mg/g volt a szárított tömegre vonatkoztatva. Továbbá megállapították, hogy a liofilizált vizes citromfűkivonat erős antioxidáns hatással és meglehetősen nagy összes polifenol-tartalommal rendelkezik, ezáltal elősegítve a tiobarbitursav-reaktív anyagok képződésének szabályozását.

Összességében elmondható, hogy a megfelelő módon előállított száraz extraktumok számos előnnyel bírnak a folyékony készítményekhez képest. Ezek közül kiemelendő például a hatóanyagoknak a nagyobb stabilitása és koncentrációja, valamint az egyszerűbb minőség-ellenőrzés és szabványosítás (Runha és mtsai, 2001).

2.4 Étcsokoládé, mint funkcionális élelmiszer

A társadalmi-gazdasági változások tendenciái, valamint a népesség demográfiai jellemzői egyre inkább azt mutatják, hogy olyan élelmiszerekre van szüksége a társadalomnak, melyek a táplálkozástani funkciókon túlmenően további egészségügyi előnyökkel is járnak. Éppen ezért a kutatók célja minél több olyan élelmiszer kifejlesztése, melyek funkcionalitásukból adódóan javíthatják az egészséget és a jólétet, csökkenthetik a betegségek kockázatát vagy késleltethetik annak kialakulását. Jelenleg 42 funkcionális élelmiszert ismerünk, ezek egyike a csokoládé (Rogovská és Čukanová, 2015).

Étcsokoládénak az MÉ 1-3-2000/36 előírása szerint az a termék nevezhető, amely kakaótermékekből, illetve cukrokból készül és legalább 35% összes kakaó szárazanyagot tartalmaz, amelyből legalább 18% a kakaóvaj és legalább 14% a zsírmentes kakaó szárazanyag. Ma a világon az egyik legkeresettebb édesipari termék, köszönhetően élvezeti értékének és kedvező élettani hatásainak. Az elmúlt évtized vizsgálatai ugyanis

kimutatták, hogy a csokoládétermékek ezen kedvező tulajdonságait a kakaóbab flavonoid (katekinek, epikatekinek, procianidok), metilxantin (teobromin, koffein), valamint ásványi anyag tartalma (magnézium, vas, cink) okozza. Noha e vegyületeknek megkülönböztetett és egymástól független hatása van az emberi szervezetre, a kutatók abban egyetértenek, hogy az étcsokoládé által közvetített kedvező hatások leginkább a flavonoidoknak tulajdoníthatók (Petyaev és Bashmakov, 2017). Jótékony hatásai elsősorban a szív és érrendszeri megbetegedésekhez kapcsolódnak (Allgrove és Davison, 2014), melyet az EFSA is megerősített 2012-ben (Urbańska és mtsai, 2019). Mindezek mellett mérsékelt fogyasztása többek között kedvező hatással bír a vér koleszterinszintjére, a vércukorszintre és a mentális egészségre is (Montagna és mtsai, 2019). A csokoládé a fentebb említett bioaktív összetevőkön túlmenően olyan tápanyagokat is tartalmaz, mint a fehérje, a zsír vagy a szénhidrát. Ezeknek a vegyületeknek *in vivo* mind pozitív mind negatív hatása is lehet. Bár a közétett tudományos eredmények arra utalnak, hogy a csokoládé kedvező hatással lehet az egészségre, nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy cukor- és zsírtartalma viszonylag nagy, melyből adódóan túlzott fogyasztása testtömeg növekedéshez vezethet; éppen ezért az egészséges táplálkozás szempontjából javasolt a mérsékelt (20-25 g/nap) fogyasztása (Urbańska és mtsai, 2019).

Manapság a kutatók egyre több dúsított illetve adalékolt csokoládéterméket állítanak elő azzal a céllal, hogy növeljék a csokoládé funkcionális tulajdonságait ezáltal biztosítva a még kedvezőbb élettani hatásokat. Del Ben és mtsai (2020) például oleuropeinnel adalékolt csokoládé hatását vizsgálták a vércukor- és inzulinszint szempontjából 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő, illetve egészséges alanyok

bevonásával. Vizsgálataik során 40 g dúsított és kontroll csokoládé elfogyasztását követően 2 órával, illetve azt megelőzően a következőket követték nyomon: szérum glükóz, inzulin, glükagon-szerű peptid (GLP1) és dipeptidil-peptidáz-4 (DPP4). Kutatásaik során megfigyelték, hogy az adalékolt csokoládé elfogyasztása után a vércukorszint és a DPP4 aktivitása nem változott, szemben az inzulin és a GLP1 szintjével. Ezzel szemben a kontroll csokoládét fogyasztó alanyok esetében csak a GLP1 szintje nem mutatott növekedést.

Albak és Tekin (2014) az étcsokoládé funkcionalitását antimikrobiális hatással bíró fűszerek (ánizs, gyömbér, citromhéj, fahéj) hozzáadásával növelték. Vizsgálataik során a csokoládék nedvességtartalmát, színét, olvadáspontját és összes polifenol-tartalmát analizálták. Míg a nedvességtartalmat leginkább az ánizs befolyásolta, addig a többi vizsgált paraméter esetében a fahéj okozott szignifikáns változást.

Carvalho és mtsai (2018) liofilizált kelkáposztával és szőlővel adalékolt tejsokoládét vizsgáltak. Eredményeik alapján elmondható, hogy az így készített csokoládék nagyobb rost és ásványi anyag tartalommal rendelkeztek. HPLC-s vizsgálataikkal pedig igazolták, hogy a kelkáposzta és a szőlő fenolos vegyületei átjutnak a csokoládéba.

Manapság egyre több kísérlet igazolja a probiotikus csokoládék előnyeit, melyet az is alátámaszt, hogy ilyen jellegű készítményekkel már a boltok polcain is találkozhatunk. Számos tanulmány igazolja ugyanis azt a megállapítást, miszerint a mikro-kapszulázott probiotikus baktériumok (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) számára a csokoládé kiváló hordozó (Mandal és mtsai, 2012; Possemiers és mtsai, 2010), ráadásul a kakaóvaj

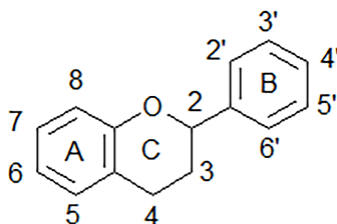
lipidfrakciója hozzájárul a bifidobaktériumok védelméhez is (Lahtinen és mtsai, 2007; Gadhiya és mtsai, 2015).

2.5 Polifenolok rövid bemutatása

A különféle növényekből eddig több mint 8000 polifenolos alkotót azonosítottak (Pandey és Rizvi, 2009). Többségében vízben jól oldódó vegyületek, melyeket a növények a pentóz-foszfát-, a sikimisav-, valamint a fenil-propanoid útvonalon aromás aminosavakból (tirozin, triptofán) szintetizálnak (Randhir és mtsai, 2004; Lin és mtsai, 2016). Közös kémiai tulajdonságuk, hogy egy vagy több hidroxil szubsztituenssel rendelkező aromás gyűrűt tartalmaznak (Xu és mtsai, 2017).

A polifenolok sokfélesége és széleskörű előfordulása a növényekben különböző módokat eredményezett ezeknek a természetben előforduló vegyületeknek a kategorizálásához. Osztályozásuk történhet származási forrásuk, biológiai funkciójuk és kémiai szerkezetük alapján (Tsao, 2010). A fenolgyűrűk számának és a gyűrűket egymáshoz kötő szerkezeti elemeknek megfelelően flavonoidok, fenolos savak, sztilbénak és lignánok csoportjára oszthatók (Pandey és Rizvi, 2009).

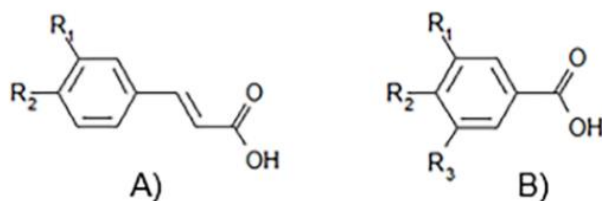
A *flavonoidok* (1. ábra) $C_6-C_3-C_6$ alapvázal rendelkeznek, melyben a két aromás gyűrűt (A és B) egy heterociklusos pirángyűrű (C) kapcsol össze.



1. ábra Flavonoid alapváz

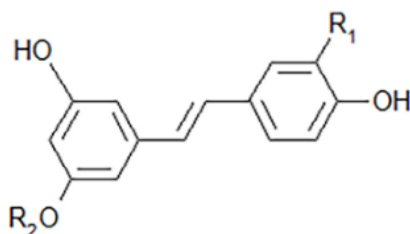
A heterociklus típusának variánsa alapján az alábbi hat alosztályba sorolhatók: flavonok, flavanonok, izoflavonok, flavonolok, flavanonolok, flavanolok és antocianidinek. Az egyes csoportokon belüli egyedi különbségek a hidroxilcsoportok számától és elrendezésétől, valamint az alkilezés és/vagy a glikozilezés mértékétől függenek. Eddig több, mint 4000 flavonoidot azonosítottak, melyek közül sok felelős a virágok, a gyümölcsök és a levelek vonzó színéért. Leggyakoribb képviselőik a kvercetin, a katekinek és a miricetin (Padey és Rizvi, 2009; Tsao, 2010; Kumar és Pandey, 2013).

A fenolos savak (2. ábra) vagy más néven fenolkarbonsavak fenolgyűrűt és legalább egy szerves karbonsavat tartalmaznak. A fenolgyűrűhöz kapcsolt oldallánc szénegységeitől függően C₆-C₃, C₆-C₂ és C₆-C₁ csoportokra oszthatók. Legfontosabb közülük a hidroxifahéjsavból származó (C₆-C₃), illetve a hidroxibenzooesav szerkezettel (C₆-C₁) rendelkező vegyületek (Goleniowski és mtsai, 2013). Míg az utóbbiak közé tartozik például a galluszsav, a p-hidroxibenzooesav, a protokatekinsav, a vanillinsav és a sziringasav, addig az előbbieket fő képviselői a kávéssav, a ferulasav, a p-kumársav és a szinapinsav (Ozcan és mtsai, 2014).



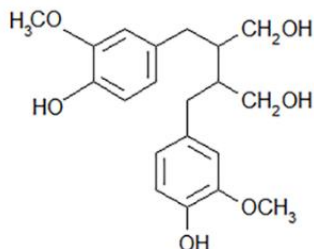
2. ábra Fenolos savak általános szerkezeti képlete. A) Hidroxifahéjsav alapváz, B) Hidroxibenzooesav alapváz

A *sztilbének* alapváza (3. ábra) két aromás gyűrű melyet egy etilén híd kapcsol össze (Temsamani és mtsai, 2015). Szerkezetileg 1,2-difenil-etilén mag jellemzi őket. Monomer és oligomer sztilbének csoportjára oszthatók (Shen és mtsai, 2009). Noha több, mint 400 sztilbén vegyület ismert, előfordulásuk korlátozott mivel a sztilbén-szintáz nevezetű enzim nem minden növényben fordul elő. Legfőbb képviselőjük a borban található rezveratrol (Sirerol és mtsai, 2016).



3. ábra Sztilbén alapváz

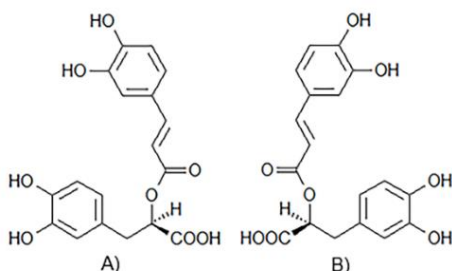
A *lignánok* (4. ábra) két C₆-C₃ egységből állnak, melyeket egy β, β' kötés kapcsol össze (Moss, 2000). Az oxigénatom vázon belüli elhelyezkedése és a gyűrűk kialakulása szerint az alábbi 8 fő csoportba sorolhatók: furofurán, furán, dibenzil-bután, dibenzil-butirolakton, ariltetralin, arilnaftalin, dibenzociklooktadién és dibenzil-butirolaktol. Továbbá az egyes alcsoportokon belül a C₉(C_{9'}) pozíciók oxidációs állapotától függően a következő három kategóriába oszthatók: lignánok-9(9')-oxigénnel, lignánok-9(9')-oxigén nélkül és dikarbonsav lignánok (Suzuki és Umezawa, 2007). Legfőbb forrásuk a lenmag, de megtalálhatók egyéb olajos magvakban és gabonákban is (Xu és mtsai, 2017).



4. ábra Lignán alapváz

2.5.1 Rozmaringsav jellemzése

A rozmaringsav a Lamiaceae családba, azon belül is a Nepetoideae alcsaládba tartozó növények leggyakoribb fenolos vegyülete (Trivellini és mtsai, 2016). Kémiai szempontból a kávésav és a 3,4-dihidroxi-feniltejsav észtere. Két aromás aminosavat (fenilalanin, tirozin) tartalmaz, melyek észterkötésen keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Királis centrummal rendelkező, enantiomer (5. ábra), optikailag aktív molekula, mely vízben kevésbé, szerves oldószerben jól oldódik. Sárgásfehér színnel, $C_{18}H_{16}O_8$ összegképlettel, 360,3 g/mol molekulatömeggel, 174 - 177°C-os forrásponttal és $[\alpha]_D^{20} = +140^\circ$ -os fajlagos forgatóképességgel jellemezhető (Parnham, 1985; Trute és Nahrstedt, 1996; Poștaru és mtsai, 2014; Benedec és mtsai, 2015).

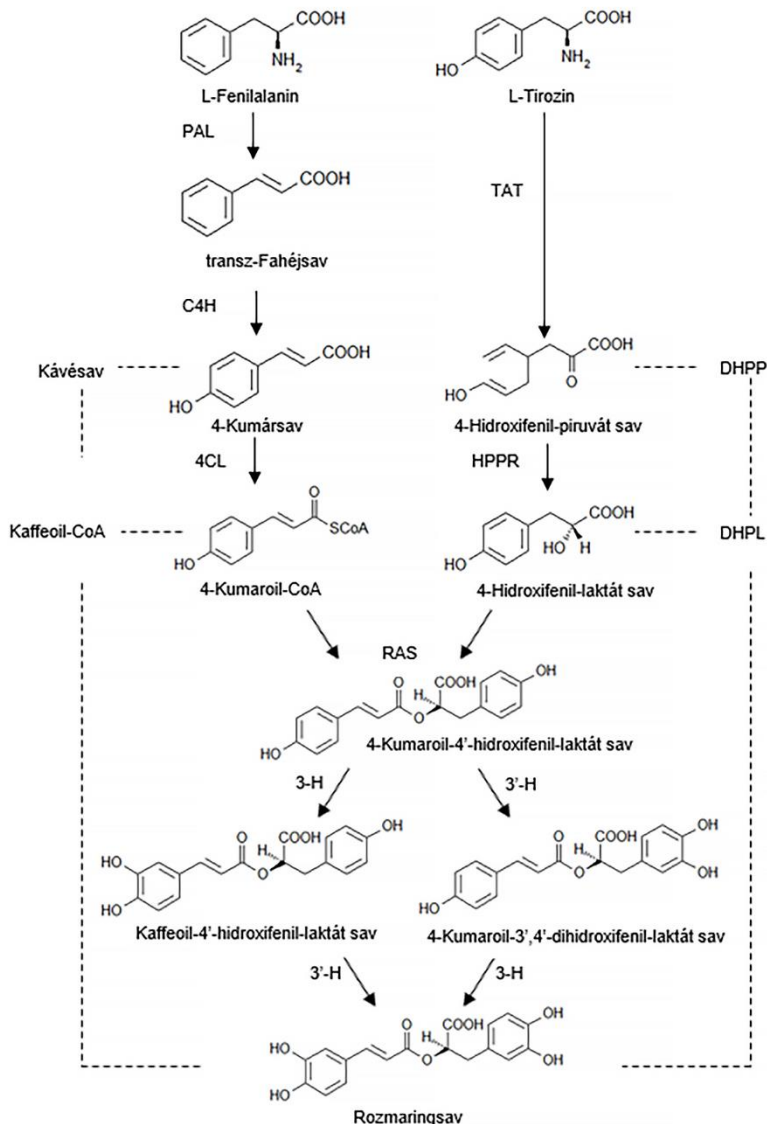


5. ábra Az R-(+)-rozmaringsav (A) és az S-(-)-rozmaringsav (B) enantiomereinek szerkezeti képlete

Felfedezése Scarpati és Oriente nevéhez köthető. Kutatásaik során ugyanis 1958-ban elsőként izolálták a vegyület nevét adó rozmaringból (Al-Dhabi és mtsai, 2014). Noha biológiai úton történő szintézisének leírására viszonylag keveset, mindössze 12 évet kellett várni köszönhetően Ellis és Towers (1970) munkásságának, ugyanez a kémiai szintéziséről nem mondható el. Ez utóbbi kutatására és megértésre ugyanis egészen 1991-ig kellett várni (Sundaram és mtsai, 2010).

A növényekben lévő rozmaringsav a fenil-propanoid, illetve a tirozinból származó reakcióúton keresztül szintetizálódik. A fenil-propanoid reakcióút első enzime az ún. fenilalanin-ammónia-liáz (PAL), mely az L-fenilalanint transz-cinnamáttá, nevezetesen transz-fahéjsavvá alakítja, melyből ezt követően 4-kumársav keletkezik a fahéjsav-4-hidroxiláz enzim (C4H) segítségével. Az így képződött vegyületből a továbbiakban 4-kumaroil-koenzim A (CoA) keletkezik a 4-kumaroil-CoA-ligáz enzim (4CL) segítségével. Abban az esetben, ha a szintézis az L-tirozinból indul ki, az L-tirozin a 4-hidroxifenil-piruvát savon keresztül 4-hidroxifenil-tejsavvá alakul a tirozin aminotranszferáz (TAT) és a 4-hidroxi-fenilpiruvát reduktáz (HPPR) enzimek segítségével. A bioszintézis további lépése, hogy a fentebb leírt módon az L-fenilalaninból képződött 4-kumaroil-CoA-t, illetve az L-tirozinból keletkezett 4-hidroxifenil-piruvát savat a rozmaringsav szintáz, vagy más néven hidroxicinnamoil-CoA:hidroxifenil-laktát enzim (RAS) 4-kumaroil-4'-hidroxifenil-tejsavvá alakítja, melyet végül két különálló citokróm P450 (3-hidroxi-cinnamoil, 3-H; 3'-hidroxicinnamoil, 3'-H) katalizál kaffeoil-4'-hidroxifenil-tejsavvá, illetve 4-kumaroil-3',4'-dihidroxifenil-tejsavvá attól függően, hogy a bioszintézis mely reakcióúton keresztül zajlik. Míg az előbbi (kaffeoil-4'-hidroxifenil-

tejsav) a fenil-propanoid anyagcsere reakcióútra jellemző és a 3'-H alakítja rozmaringsavvá, addig az utóbbi (4-kumaroil-3',4'-dihidroxifenil-tejsav) a 3-H által katalizált tirozinból származó reakciót terméke (6. ábra).



6. ábra A rozmaringsav bioszintézisének folyamata (Sundaram és mtsai, 2010 és Kim és mtsai, 2013 alapján)

Összességében tehát látható, hogy a rozmaringsav molekula kávésav része a fenilalaninból, míg a 3,4-dihidroxi-fenil-tejsav része a tirozinból származik (Sundaram és mtsai, 2010; Kim és mtsai, 2014; Mohamadi és mtsai, 2015; Habtemariam és mtsai, 2018).

2.5.2 Rozmaringsav emberi egészségi hatása

A gyógynövénykutatás területén az utóbbi években a rozmaringsav-tartalmú növényi kivonatok jelentős figyelmet kaptak, köszönhetően kedvező farmakológiai és biológiai tulajdonságaiknak. A hatóanyagoknak a szervezetre gyakorolt kedvező hatásait a számos tudományos jelentés mellett az *in vitro* és klinikai vizsgálatok is igazolják.

Az elmúlt években megnőtt azon kutatások száma, melyek a rozmaringsavnak az antioxidáns hatásával foglalkoznak. A szervezetben ugyanis bizonyos biokémiai folyamatok során párosítatlan elektronnal rendelkező, nagy reakcióképességű szabad gyökök keletkezhetnek, melyek oxidációs folyamatok által a sejtmembrán szétesését, a membránfehérje károsodását és DNS mutációt eredményezve elősegítik a különböző eredetű megbetegedések (rák, szív és érrendszeri problémák, idegi elváltozások, diabetes mellitus stb.) kialakulását (Dontha, 2016). A szabad gyökök elleni védekezésben fontos szerepet töltenek be az antioxidánsok, melyek elektron leadás útján képesek a szabad gyökök semlegesítésére, ezáltal csökkentve az általuk okozott káros hatásokat (Lobo és mtsai, 2010). A rozmaringsav kivételes antioxidáns tulajdonsága szerkezetéből fakad, ugyanis a vegyület két difenol-gyűrűjén lévő katekol csoportok, valamint a négy fenolos hidrogénjéből adódóan képes a szabad gyökök oxidációjának szabályozására. Antioxidáns hatása a fahéjsav-származékok között a legerősebb (Bhatt és mtsai, 2013; Świsłocka és mtsai, 2019).

A neurodegeneratív megbetegedések területén a vegyülettel kapcsolatos legújabb kutatások az Alzheimer-kór prevenciójára összpontosítanak. A betegség jellemzője, hogy az agyban β -amiloid-fehérje plakkok halmozódnak fel ezáltal kognitív diszfunkciót okozva. A kór patogenezisében az oxidatív stressz kitüntetett szerepet játszik. Éppen ezért Baluchnejadmojarad és mtsai (2013) fő célja volt a rozmaringsavnak a tanulásra és a memória károsodására gyakorolt hatásait vizsgálni, hangsúlyozva annak antioxidáns tulajdonságait. Kutatásaik során rozmaringsavat tartalmazó (10 és 20 mg/kg) β -amiloid injekcióval intraperitoneálisan (hasüregbe) oltott patkányokat vizsgáltak. A rövid távú térbeli memória értékeléséhez Y-alakú labirintust használtak, továbbá a hippocampus szövetében a következő oxidatív stressz markereket követték nyomon: malondialdehyd- és nitrittartalom. Tanulmányuk azt jelzi, hogy a rozmaringsav az oxidatív stressz terhelés csökkentésével javítja a β -amiloid által kiváltott tanulási és memóriakárosodást a patkányokban. Az irodalomban egyre több hasonló állatokon végzett kísérlettel találkozhatunk, melyek egyértelműen alátámasztják azt a tényt, hogy a rozmaringsav hatékony terápiás szernek bizonyulhat a betegség kezelésében. Hase és mtsai (2019) például egereken végzett kísérleteivel igazolták, hogy a rozmaringsav csökkenti a β -amiloid plakkok megjelenését a monoamin szekréció fokozásával.

A diabetes mellitus az egyik leggyakoribb anyagcsere rendellenesség. A betegség farmakológiai szempontból való kezelése egyre inkább előtérbe kerül, sőt a 2-es típusú diabetes mellitus kezelésében az egyik leggyakrabban alkalmazott gyógyszer, a metformin is növényi eredetű (Runtuwene és mtsai, 2016). Egyre több kutatás igazolja, hogy a rozmaringsavat tartalmazó növényi készítmények fontos szerepet

tölthetnek be a betegség kezelésében. Hasanein és Zaheri (2014) munkájukban például arról számoltak be, hogy a rozmaringsav jól alkalmazható az állatok diabéteszes neuropátiájának kezelésére. Zhu és mtsai (2014) vizsgálataikkal igazolták, hogy a rozmaringsav α -glükózidáz gátló hatással rendelkezik, mely révén potenciális szernek tűnik a hipoglikémia kezelésében. Runtuwene és mtsai (2016) vizsgálatukban megfigyelték, hogy a vegyület csökkenti a hiperglikémiát is, valamint enyhíti az inzulinérzékenységet azáltal, hogy növeli a glükóztranszporter-4 (GLUT4) expresszióját és csökkenti a foszfoenol-piruvát karboxikináz (PEPCK) expressziót.

Figyelemre méltó kutatások jelentek meg a hatóanyagok a rákos terápiában való alkalmazhatóságáról is. Az egyik mechanizmus ugyanis, amelyen keresztül a bioaktív élelmiszer összetevők rákellenes hatást gyakorolhatnak, hogy csökkentik a ciklooxygenáz-2 (COX-2) proinflammatorikus génjének expresszióját, melyet a daganatok kialakulásának kockázati tényezőjének tekintenek. Scheckel és mtsai (2008) például arról számoltak be, hogy a rozmaringsav csökkentette a HT-29 vastagbélrákos sejtvonalakban a transzkripciós faktort az aktivátor fehérje-1 (AP-1) gátlásával, amely felelős a COX-2 aktiválásért. Venkatachalam és mtsai (2013) vizsgálata pedig arra enged következtetni, hogy a rozmaringsav a vastagbélrák kemoprevenciós szereként alkalmazható. Kutatásaik során ugyanis azt tapasztalták, hogy a hatóanyagok az 5 mg/ttkg koncentrációban való alkalmazása az 1,2 - dimetil-hidrazin által kiváltott vastagbélrákos patkány egyedek esetében csökkentette a daganatképződést és a vastagbél neoplasztikus elváltozásait. A hatóanyag rákellenes aktivitását mindezen túlmenően olyan elváltozások esetében is vizsgálták, mint a melanóma (Cattaneo és

mtsai, 2015), a hasnyálmirigyrák (Han és mtsai, 2019), az emlőrák (Chen és mtsai, 2011), a tüdőrák (Moore és mtsai, 2016) vagy a leukémia (Wu és mtsai, 2015).

Mindezek mellett a rozmaringsavat az állatok, különösen a baromfi takarmányozásában, mint természetes fitogén adalékanyagot használják az általános egészség, a termelési és a reprodukív teljesítmény javítására azáltal, hogy kedvezően hat a tápanyagok felszívódására, a bél mikrobiotájának megváltozására, valamint a patogén baktériumok (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) számának csökkentésére (Alagawany és mtsai, 2017).

A fentebb bemutatott vizsgálatok mellett azonban a terápiás hatással rendelkező hatóanyagoknak (jelen esetben: rozmaringsav) a biztonságos használatára is nagy hangsúlyt kell fektetni. Éppen ezért nagyon fontos megállapítani a hatóanyagok megengedhető napi beviteli értékét (ADI), vagyis azon becsült mennyiségét, mely naponta egy teljes életen át orálisan fogyasztható káros egészségügyi problémák kialakulása nélkül (Tal Friedman, 2015). Noguchi-Shinohara és mtsai (2015) vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy a rozmaringsavnak az 1 g/ttkg/nap mértékben való alkalmazása Alzheimeres transzgenikus egerek (Tg2576) esetében nem okozott káros mellékhatásokat. Ezek alapján a rozmaringsav NOAEL (hatás nélküli szint) értékét 50 g-nak, ADI értékét pedig 500 mg-ra becsülték egy 50 kg-os felnőtt esetében. Takano és mtsai (2004) humán vizsgálatok során a rozmaringsavnak (50 és 200 mg/ttkg) a szezonális szénanáthához társuló konjunktivitiszre gyakorolt hatását vizsgálták. Az alkalmazott dózisok mellett a betegek nem tapasztaltak nem kívánatos mellékhatásokat és a rutinszerű vérvizsgálatok során sem léptek fel jelentős eltérések. Tal Friedman (2015) áttekintő kéziratában ugyanakkor

kiemeli, hogy a rendelkezésre álló bizonyítékok alapján a rozmaringsav optimális dózisa az adagolási spektrum – mely általában injekció útján történő adagolási forma esetében 0,1 és 10 mg/ttkg, orálisan adagolva pedig 1 és 8 mg/ttkg – alacsony vagy mérsékelt végén lenne, mivel több kutatás kimutatta, hogy a rozmaringsav által okozott kedvező hatások kevésbé dóziszfüggőek. Mindezt figyelembe véve a szerző a biztonságos orális adagolási forma esetében a rozmaringsavnak az 1-2 mg/ttkg mennyiségű napi bevitelét javasolja, mely egy 60 ttkg-os embernél 60-120 mg rozmaringsav bevitelt jelent.

2.6 Extrakció

Az extrakció vagy más néven kivonatolás olyan elválasztó anyagátadási művelet, mely során a kiinduló anyag egy vagy több komponensének a kivonása szelektív módon, kivonószer segítségével történik. A kiinduló anyagtól és az alkalmazott kivonószertől függően beszélhetünk folyadék-folyadék, szilárd-folyadék, illetve szuperkritikus-gázos extrakcióról (Fonyó és Fábry, 2004). Mivel a növényekben lévő polifenoloknak, fenolos savaknak és egyéb biológiai aktivitással rendelkező összetevőknek a kivonatolása többnyire szilárd-folyadék extrakción alapulnak (Oreopoulou és mtsai, 2019) és az általam alkalmazott módszerek is ezen eljárástípusba tartoznak, a továbbiakban csupán e módszert tárgyalom.

2.6.1 Szilárd-folyadék extrakció

A szilárd-folyadék extrakció (SLE) röviden összefoglalva egy többfázisú, folyamatos anyagátviteli művelet, mely a megfelelően előkészített (aprított, friss, vagy szárított) növényi minta oldószerrel történő kivonatolásából áll adott időtartamig. Az SLE eljárásokat

klasszikusan az alábbi két nagy csoportba sorolhatjuk: hagyományos és új extrakciós módszerek (Kaufmann és Christen, 2002; Ajila és mtsai, 2011). A hagyományos módszerek közé tartozik például a Soxhlet-extrakció, a szobahőmérsékleten végzett áztatás (macerálás), valamint az olyan nagyobb hőmérsékleten végzett kivonási eljárások, mint a főzet (*decoctum*), vagy a forrázat (*infusum*) készítése. Az említett módszerek legnagyobb kihívásai közé tartozik többek között a hosszú extrakciós idő, a költséges és nagy tisztaságú oldószerek használata, a nagy mennyiségű kivonószer elpárologtatása, a kismértékű extrakciós szelektivitás és a nagyobb hőmérsékleten bomló vegyületek termikus bomlása. Éppen ezért olyan új és ígéretes technikákat vezettek be, mint például az ultrahangos, a mikrohullámú (MAE) vagy a nyomás alatti oldószeres extrakció (Azmir és mtsai, 2013; Ngaha Njila és mtsai, 2017).

A növények fenolos alkotóinak kivonásakor a szilárd-folyadék rendszert az oldott anyag (aktív hatóanyag), a kivonószer, az inert szilárd ballasztanyag, valamint a szilárd szemcsék és a folyékony fázis közötti határfelületen megtalálható gáz-folyadék filmréteg alkotja. Mint ahogy az általánosan ismert, az anyagtranszport folyamata a következő öt lépésre bontható (He és mtsai, 2016):

- 1) A kivonószer diffúziója a gyógynövény szemcséinek felületére,
- 2) A kivonószer behatolása a gyógynövény szemcse felületéről annak belsejébe,
- 3) Az aktív hatóanyagok feloldódása a gyógynövény szemcséinek belsejében,
- 4) Az aktív hatóanyagok diffúziója a szemcsék belsejéből azok felületére (belső diffúzió),

- 5) Az aktív hatóanyagok diffúziója a szilárd szemcsék gáz-folyadék határfelületi filmrétegen keresztül a szemcséfelületről a kivonószerbe (külső diffúzió).

A fentiekből is látható, hogy az extrakciós folyamatok fontos meghatározója az anyagátvitel (diffúzió), mely tulajdonképpen egy vagy több komponens (aktív hatóanyag) átmenetét jelenti az egyik fázisból (növényi anyag) a másik fázisba (kivonószer), az egyes fázisok (jelen esetben: folyadék-gáz) határán képződő két határrétegen (filmen) keresztül. A folyamat végbemehet áramló és nyugvó fázisok között. Ez utóbbinál az extrakciós eljárások esetében az anyagátadás egyirányú molekuláris diffúzió eredménye, mely kvázi Brown-mozgásnak felel meg; tipikus példája a macerálás. Mivel ez a típusú anyagátvitel meglehetősen lassú, az oldási folyamatot általában mesterséges cirkulációval, kevertetéssel növelik. Ez esetben turbulens diffúzióról, vagy más néven konvektív anyagátadásról beszélünk, ahol az anyagtranszport már nem csak a fázist alkotó komponensek fizikai tulajdonságaitól, hanem hidrodinamikai feltételektől is függ (pl. diffúzió sebessége). Fontos megjegyezni, hogy a kevertetés az extrakció hatásfokát nem befolyásolja, hiszen csak a diffúzió sebességére és ezáltal az extrakció sebességére van hatással azáltal, hogy csökkenti a diffúziós határréteget (Fonyó és Fábry, 2004). A diffúzió sebességét Fick I. törvénye írja le, mely egydimenziós modell esetén a következőképp írható fel (Liang, 2018):

$$J_i = -D_i \frac{\partial a_i}{\partial x} \quad (1)$$

Ahol: J_i , a_i , D_i és $\frac{\partial a_i}{\partial x}$ rendre az i -edik komponens anyagárama, kémiai aktivitása, diffúziós együtthatója és aktivitás gradiense.

Az (1) egyenletben a diffúziós együttható negatív előjele mutatja, hogy a diffúziós folyamatok a nagyobb kémiai aktivitású hely felől az kisebb kémiai aktivitású hely felé haladnak és az anyagáramlás sebessége arányos a kémiai aktivitás-gradienssel, vagyis a kémiai aktivitás hely szerinti deriváltjával. A folyamat egészen addig tart, amíg el nem érjük az egyensúlyi állapotnak megfelelő kémiai aktivitás megoszlást:

$$K_i = \frac{a_i^s}{a_i^l} \quad (2)$$

Ahol: a_i^s és a_i^l rendre az i -edik komponens kémiai aktivitása a szilárd (s), illetve folyadék (l) fázisban, K_i pedig a megoszlási állandó.

Az (1) egyenletből továbbá látható, hogy Fick I. törvénye a diffúzió fizikai alapjelenségét írja le, s arra a kérdésre, hogy milyen a diffundáló anyag kémiai aktivitásának az időfüggése a diffúziós tér pontjaiban nem ad választ (Maróti és Laczkó, 2013). Fick II. törvénye azonban igen, mely kimondja, hogy a kémiai aktivitás időbeli változása a kémiai aktivitás hely szerinti második deriváltjával arányos (Liang, 2018):

$$\frac{\partial a_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 a_i}{\partial x^2} \quad (3)$$

Ahol: a_i és D_i rendre az i -edik komponens kémiai aktivitása és diffúziós együtthatója, t pedig a diffúziós idő.

2.6.2 Diffúziót befolyásoló tényezők

Mivel a növényi anyagok kivonatolásakor a diffúziót és ezzel egyidejűleg az extrakciós hatásfokot befolyásolja a növényi mátrix kémiai és fizikai tulajdonsága, az alkalmazott kivonószer típusa és polaritása, a kivonás hőmérséklete és időtartama, valamint a minta és a kivonószer

aránya (Dai és Mumper, 2010), a továbbiakban ezeknek a tényezőknek az extrakcióra gyakorolt hatásával foglalkozom.

A növényekben lévő aktív hatóanyagok mennyiségét és kémiai összetételét számos külső és belső tényező befolyásolhatja. Az endogén faktorok a növények anatómiai és fiziológiai jellemzőihez, valamint a komponensek bioszintetikus útvonalaihoz kapcsolódnak, melyek változhatnak a növények különböző szövetében, de akár a különböző évszakokban is (Barra, 2009). A környezeti faktorok közül pedig kiemelkedő jelentőséggel bírnak az olyan tényezők, mint például a tengerszint feletti magasság, a napsütéses órák száma (Szőke és mtsai, 2012), a hőmérsékleti viszonyok, a relatív páratartalom, a szezonális, valamint a talaj tulajdonságai (Abdelmajeed, 2013).

Mint minden kémiai elemzés során a növényi anyagok analízisekor is nagy jelentőséggel bír a minta előkészítése és tárolása. Ennek ellenére ezekre a lépésekre a kutatók nem fordítanak kellő figyelmet, a minták megfelelő gyűjtését és tárolását pedig figyelmen kívül hagyják, vagy nem megfelelően dokumentálják. A begyűjtött mintáknak ugyanis egyrészt reprezentatívnak kell lenniük, másrészt pedig a mintákat az elemzésig megfelelően kell tárolni azért, hogy azok kémiai összetételében ne történjék jelentős változás. Nem optimált tárolási körülmények között ugyanis a mintagyűjtés és az elemzés közötti időtartam alatt a tároló időtől és a körülményektől függően a nyersanyagban lévő fenolos vegyületek szintjének jelentős csökkenése fordulhat elő. A mintákat általában friss, fagyasztott vagy szárított formában tárolják. A hosszú tároláshoz az utóbbi kettő ajánlatos. A fagyasztás ráadásul még az extrahálási folyamatot is megkönnyítheti azáltal, hogy a minta térfogatának növekedése és a jégkristályok képződése a szövetek megbontásához vezet megkönnyítve

ezzel a vegyületek felszabadulását. A minták kiolvasztásakor azonban enzimikus és kémiai reakciók is felléphetnek, melyek a fenolos összetétel megváltozásához vezethetnek (Santos-Buelga és mtsai, 2012). A szárítás szintén az egyik legjobb módja a növényi anyagok tartósításának, hiszen a betakarított növények nedvességtartalma általában nagy, mintegy 60-80%, mely kedvez a különböző bomlási folyamatok beindulásának. A természetes szárítást általában csak kisebb mennyiségek szárításakor alkalmazzák, tömegtermelés esetén ugyanis nélkülözhetetlen a műszaki berendezéseknek a használata. A gyógynövények esetében az aktív hatóanyagok megőrzése érdekében viszonylag kis szárítási hőmérséklet (30-50°C) javasolt. A különböző gyógynövényfajokra jellemző végső nedvességtartalmat a világ különböző tájain alkalmazott gyógyszerkönyvek írják elő. Általánosságban azonban elmondható, hogy a nedvességtartalomnak a szárítás végén 10-14% között kell lennie (Müller és Heindl, 2006; Poós és Varju, 2017). A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv például a citromfű esetében 10% maradék nedvességtartalmat ír elő (Ph.Hg.VIII., 2009). A mintaelőkészítés további fontos része az alkalmazott növényi rész aprítása, hiszen a bioaktív vegyületek kinyerése az ép növényi részből csupán kis extrakciós hozammal valósítható meg. Az aprítás hatására azonban növekszik a meghatározandó komponens (analit) anyagárama azáltal, hogy nagyobb lesz az érintkezési felület a növényi anyag és a kivonószer között, illetve, hogy a mintakomponens diffúziós útja lecsökken ezáltal növelve a kémiai aktivitás-gradienst és csökkentve az extrahálás időtartamát. Mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy a túl nagy részecskeméret csökkentés nem ajánlatos, ugyanis nemkívánatos vegyületek extrahálásához, illetve a növényi maradéknak az extraktumtól való elválasztásának nehézségeihez vezethet. Annak

ellenére, hogy a részecskeméret hatása nyilvánvaló a fentebb említett hatások nem jelentősek abban az esetben, ha az alkalmazott növényi rész a levélzet. Ebben az esetben ugyanis a hatások csupán akkor észlelhetők, ha a részecskeméretet a levél vastagsága alá csökkentik. A leggyakrabban alkalmazott részecskeméret 125-250 μm között változik (Chan és mtsai, 2017; Tomaz és mtsai, 2019).

A növények fenolos kivonata mindig különböző fenol csoportoknak az elegye, melyek szelektíven oldódnak az egyes kivonószerekben (de Rijke és mtsai, 2006). Éppen ezért a kivonószer helyes megválasztása az egyik legfontosabb tényező az extrahálási folyamat során. A zöld kémia elterjedésével a kutatók egyre inkább azon extrakciós technikák alkalmazására törekednek, melyek olyan kivonószereket használnak, amelyek egyáltalán nem, vagy kevésbé károsak az emberi egészségre (Kivilompolo és Hyötyläinen, 2007). E nézet tekintetében kivonószerként leggyakrabban az etanol és a víz, illetve e két oldószer bináris elegye használatos, mivel kis toxicitással és nagy extrakciós hozammal rendelkeznek, azzal a további előnnyel, hogy a kivonószer polaritása az etanol-víz-elegy különböző arányokban történő alkalmazásával változtatható (Franco és mtsai, 2008). Ez utóbbi azért is nagyon fontos, mivel a megfelelő polaritású kivonószer megválasztását elsősorban az extrahálendő komponens polaritása befolyásolja. A fizikai oldódás általános szabálya ugyanis, hogy a hasonló a hasonlóban oldódik („*similis similia solvuntur*”). Ennek értelmében például az erősen poláros benzoésav és hidroxifahéjsav származékokhoz kiváló kivonószer lehet a víz, illetve az olyan tiszta szerves oldószerek, mint a metanol, az etanol vagy az aceton (Dent és mtsai, 2013). A gyakorlatban azonban ez közel sincs így, legfőképpen a fenolos savak esetében, melynek oka, hogy a

karboxil- és hidroxil-csoportjainak reakciói révén észter-, éter- és glikozidkötésekkel kapcsolódnak egyéb sejtfa mátrixalkotókhoz úgy, mint fehérjékhez, poliszacharidokhoz, terpénekhez, klorofilokhoz, lipidekhez, vagy egyéb szerves vegyületekhez (Harnly és mtsai, 2007; Rajbhar és mtsai, 2015). Éppen ezért, ahhoz, hogy e kötött fenolos savak mérhetővé váljanak, fel kell őket szabadítani (aglikon forma). Erre leggyakrabban savas és lúgos hidrolízist alkalmaznak, bár az utóbbi években számos olyan új módszer is sikeresnek bizonyult, mint az enzimikus hidrolízis vagy a mikrohullám használata. Ezen eljárások közül leginkább a savas hidrolízist alkalmazzák köszönhetően egyszerűségének, valamint annak, hogy az így előállított extraktumok közvetlenül felhasználhatók semlegesítés és szűrés után. A savas hidrolízis során az extrahálendő vegyületek természetétől függően víz és szerves oldószer alkotta bináris elegyekben gyenge (hangya-, foszfor-, citromsav) vagy erős savakat (0,5-3,0 v/v% trifluoroecetsav, TFA; 1-5 v/v% HCl) alkalmaznak kis koncentrációban. A kivonószer megsavanyításával ugyanis a fenolát forma a kevésbé poláros fenol formába megy át, ezáltal megkönnyítve a szerves kivonószerekkel történő extrakciót, különösen poláris protikus oldószerek (metanol, etanol) esetében. Fontos azonban, hogy a savanyítás során különös figyelmet fordítsunk a savfelesleg hozzáadásának elkerülésére, ez ugyanis a további koncentrálnálási lépések során (pl. kivonószer elpárologtatás vákuum bepárlóval) hidrolizálhatja a konjugáló maradékokat (pl. labilis acil- és cukormaradékokat tartalmazó flavonoidok) ezáltal veszteségeket okozva. (Dai és Mumper, 2010; Santos-Buelga és mtsai, 2012; Shahidi és Yeo, 2016).

Az extrakciós hőmérséklet szintén fontos tényező, hiszen nagymértékben befolyásolja a fenolos vegyületek diffúzivitását.

Egyrészt általánosan ismert, hogy a hőmérséklet növekedésével a sejtfal permeabilitása és a diffúziós együttható is növekszik, másrészt pedig, hogy a nagyobb hőmérséklet csökkenti a kivonószerek viszkozitását és felületi feszültségét, ezáltal növelve az oldhatóságot és a tömegátviteli sebességet. Mindezek mellett azonban, mivel a legtöbb fenolos vegyület hőérzékeny és könnyen oxidálható, a túl nagy extrakciós hőmérséklet növeli az oxidáció esélyét, ezáltal csökkentve a mennyiségüket az extraktumokban. Általánosságban elmondható, hogy a 20-80°C közötti extrakciós hőmérsékleten a legtöbb polifenolos vegyület hozamát növeli a kötött fenolok felszabadulását eredményező észter-, illetve éterkötések hidrolízise (Dai és Mumper, 2010; Oreopoulou és mtsai, 2019).

A fenolos vegyületek növényi anyagokból történő extrahálását a szilárd anyag és a kivonószer aránya is befolyásolhatja. Logikailag célszerű lenne a kivonószer mennyiségét növelni, ugyanis a megoszlás törvénye alapján (ld. (2) egyenlet) nagyobb extrahált anyagmennyiséget eredményez. Ugyanakkor mindenképp fontos megjegyezni, hogy ezzel párhuzamosan növekednek az előállítási költségek és a kivonószer hulladékok mennyisége is, ráadásul a túl nagy mennyiségű kivonószer használatakor az extrakció időtartama is növekszik. Abban az esetben azonban, ha túl kevés a kivonószer mennyisége az extrahálás hatékonysága is csökkeni fog a telítési hatások miatt. Mindezekből következően tehát fontos, hogy az extrahálási költségeket figyelembe véve olyan mintatömeg:kivonószer-térfogat aránnyal dolgozzunk, mellyel megfelelő mennyiségű hatóanyag extrahálható. A növényi minták esetében ez leggyakrabban 1:10, vagy 1:20 g/mL (Zhang és mtsai, 2018; Mourtzinos és Goula, 2019).

Noha az extrakció időtartama szintén befolyásolja a hatékonyságot közel sincs rá akkor hatással, mint a fentebb bemutatott tényezők, melynek oka, hogy ennek a paraméternek csupán az egyensúly beálltáig van jelentősége. Abban az esetben ugyanis, ha az egyensúly beállta után is folytatjuk az extrakciót fennáll annak az esélye, hogy az adott körülmények között maximálisan kinyert hatóanyagok mennyisége egyrészt az oxidáció folytán, másrészt pedig az endogén enzimek működésének következtében bomlásnak indulnak. A növényekben lévő aktív hatóanyagok kinyerésénél az extrakciós időtartamra vonatkozólag meglehetősen változatos képet kapunk az irodalomban, ugyanis a néhány perces kezelési időtől kezdve a több órán keresztül zajló módszerekre találunk példát (Hasbay és Galankis, 2018; Zhang és mtsai, 2018).

2.7 Extrakciós eljárások

2.7.1 Macerálás, macerálás-kevertetéssel

A latin *macerare* (= kivonatolás, áztat, macerál) szóból eredő macerálás az egyik leggyakrabban alkalmazott hagyományos extrakciós módszer a növényekben lévő hatóanyagok kinyerésére, köszönhetően egyszerűségének. Az eljárás során a hatóanyag kinyerése az aprított növényi részek 4-10 napon át tartó áztatásával zajlik zárt edényben, szobahőmérsékleten. Az extrakciós idő letelte után a kivonatnak a növényi résztől való elválasztása szűréssel, illetve a növényi anyagnak a préselésével valósul meg. Mivel a módszer statikus, a hatóanyagoknak a kivonószerbe jutása molekuláris diffúzió eredménye. Legfőbb hátránya, hogy a megfelelő hatóanyag-tartalom eléréshez hosszú extrakciós idő szükséges, éppen ezért a rázás technikája beépült a hagyományos macerálási eljárásba. Ez azonban, ahogy korábban is említettem (ld. 2.6.1

fejezet) az extrakció hatékonyságára nincs hatással, hiszen csak a gyorsabb egyensúly beálltát segíti elő, melyből következően az extrakciós idő is lerövidül (általában 10-30 min). Habár kis mennyiségű kivonószer használatakor a keverés nem okoz komoly gondot, ha a technikát ipari méretekben nagy mennyiségű növényi anyaggal alkalmazzák a rázás esetenként nehézkes lehet. Ezen okokból kifolyólag olyan módszereket fejlesztettek ki, mint a perkolálás, vagy a többlépcsős kivonatolás (Fahr, 2018; Manousi és mtsai, 2019).

2.7.2 Perkolálás, forralás visszafolyóztatással (refluxálás)

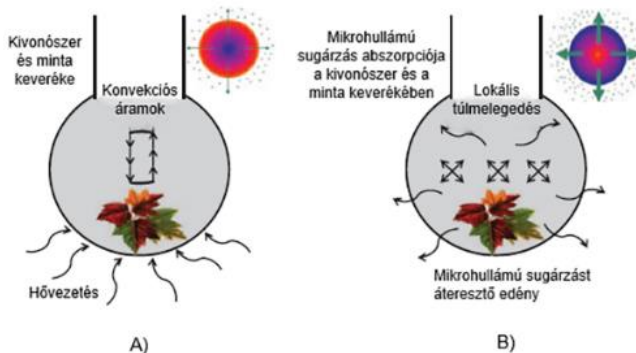
A szintén latin eredetű *percolate* (= átszűrni, átszivároztatni) szóból eredeztetett perkolálás eljárás során a kivonatolást függőlegesen elhelyezett üvegből, zománcozott vasból, illetve acélból készült, be- és kivezető nyílásokkal ellátott hengeres vagy kúpos edényben (perkolátor) hajtják végre rendszerint szobahőmérsékleten. Az eljárás során az aprított növényi anyagot még a perkolátorba való töltését megelőzően csaknem 4 órán keresztül nedvesítik a kivonószerrel egyrészt azért, hogy megkönnyítsék a kivonószernek a sejtszerkezetbe történő behatolását, ezáltal megkönnyítve a perkolálási folyamatot, másrészt pedig, hogy elkerüljék a növényi anyag tömör szerkezetűvé alakulását közvetlenül a perkolátorban. Ez utóbbi azért is veszélyes, mert a berendezés eltömítéséhez, ebből adódóan pedig az extrakciós folyamat leállításához vezethet. Az áztatási idő letelte után történik a növényi anyagnak a perkolátorba töltése és macerálása 24 órán keresztül. Ezt követően friss kivonószer folyamatos betáplálása mellett a kivonószer általában szakaszos áramoltatás mellett engedik le úgy, hogy a visszamaradó kivonószer mindig ellepje a növényi anyagot. Folyékony kivonatok előállításánál esetén a kinyert perkolátumot néhány napig állni hagyják, majd

dekantálják és szűrik. A módszer hatékonyságát számos esetben a kivonószer hőmérsékletének emelésével segítik elő úgy, hogy a keringető szivattyú és a perkolátor adagolónyílása közé egy cső alakú hőcserélőt építenek be, melybe az extraktumot folyamatosan szivattyúzzák, s melyet gőz melegít. A hőmérséklet szabályozása gőz-mágnesszelep segítségével történik egy hőmérsékletérzékelőn keresztül (Handa, 2008; Singh, 2008; Fahr, 2018; Manousi és mtsai, 2019). Laboratóriumi körülmények között a perkolációnak ez utóbbi változata általában Soxhlet-extrakcióval, vagy forralásos visszafolyóztatással, azaz refluxálással valósul meg. Ez utóbbi lényegében egy olyan szilárd-folyadék extrakciós módszer, melynél állandó hőmérsékleten, ismétlődő kivonószer elpárologtatással és kondenzációval történik a kivonás, ezáltal elkerülve a kivonószer veszteséget (Chua és mtsai, 2016). Az eljárás során az aprított növényi anyagot és a kivonószer egy visszafolyó hűtővel felszerelt gömblombikba helyezik, majd annak tartalmát a kivonószer forráspontján adott időtartamig forralják (Seidel, 2006). A módszer legfőbb hátránya, hogy az eljárás során alkalmazott nagy hőmérséklet miatt általában minimális a kinyerhető bioaktív vegyületek koncentrációja (Singh és Orsat, 2015).

2.7.3 Mikrohullámmal segített extrakció

A mikrohullámokon a 300 MHz és 300 GHz közötti frekvencitartományba eső elektromágneses sugárzást értjük. Az elektromágneses spektrumban a rádióhullámok és az infravörös tartomány között helyezkednek el, hullámhosszuk 1 m és 1 mm között változhat (Sagarika és mtsai, 2017; Al-Mamoori és Al-Janabi, 2018). Ipari alkalmazásokhoz a 915 MHz-es, míg az analitikai és kémiai vizsgálatokhoz általában a 2450 MHz-es frekvencia használata az elterjedt (Routray és Orsat, 2012).

A MAE elve elsősorban a mikrohullámoknak a poláros molekulára gyakorolt közvetlen hatására támaszkodik ionos vezetéssel és dipól forgatással. A poláros molekulák (pl. polifenolok) ugyanis intenzíven abszorbeálják a mikrohullámú energiát, mivel állandó dipólus momentummal rendelkeznek (Ajila és mtsai, 2011). A MAE alapjai különböznek a fentebb bemutatott hagyományos módszerektől, hiszen a kivonatolás az elektromágneses hullámok által okozta sejtstruktúra változásainak következménye (Sadeghi és mtsai, 2017). Ráadásul, ahogy azt a 7. ábra is szemlélteti a MAE során az alkalmazott fűtési mód és ebből eredően a hőmérséklet gradiens iránya is eltérő azon hagyományos eljárásokhoz képest, melyeknél termikus energiát alkalmaznak az extrakció meggyorsítása érdekében.



7. ábra Két különböző fűtési mód, valamint a hatásukra kialakult hőmérséklet gradiensek. A) Hagományos melegítés, kívülről befelé mutató hőmérséklet gradienssel; B) Mikrohullámú melegítés, belülről kifelé mutató hőmérséklet gradienssel (Destandau és mtsai, 2013 alapján)

A MAE esetében ugyanis a fűtés térfogati, magyarul az egész mintának a melegítése egyszerre valósul meg, mivel a folyamat a kivonószer-mátrix keverék „szívében” zajlik, szemben a hagyományos eljárások során alkalmazottnál, melynél először a felületet hevítik (Destandau és mtsai, 2013).

Az eljárás elve, hogy a zárt extraháló edényekbe helyezett növényi mátrixon belüli komponensek kölcsönhatásba lépnek a magnetron által kibocsátott mikrohullámú fotonokkal. Ez a kölcsönhatás az elektromágneses hullámok fotonjainak abszorpciója következtében a növényi mátrixban lévő nedvesség termikus energiájának növekedését eredményezi. Ennek következtében a növényi mátrixban lévő nedvesség elpárolog és a keletkező vízgőz jelentős nyomást gyakorol a növényi sejtfalakra celluláris és szubcelluláris szinten, aminek következtében a növényi sejtek megduzzadnak. Ez a duzzadási folyamat végül szerkezeti változásokat eredményez a növényi mátrixban, ezáltal elősegítve a sejtek repedése következtében a fitokémiai anyagoknak a kioldódását az kivonószerbe (Ameer és mtsai, 2017).

Növénytípusok alkalmazása esetén a mikrohullámú energia hatása erősen függ az oldószer és a mátrix természetétől. A MAE paramétereinek kiválasztásakor figyelembe kell venni olyan fizikai paramétereket, mint például az oldhatóság, a dielektromos állandó és a disszipációs tényező (Afoakwah és mtsai, 2012). Disszipáción fizikai értelemben az elektromágneses energiának a hőenergiává való alakulását értjük. Jelen esetben a disszipáció a polarizációs jelenségnek az eredménye, ugyanis a dipólus momentummal rendelkező molekulának a nagyfrekvenciájú elektromágneses mezővel való kölcsönhatás következtében megnövekedett forgási energiájából származó súrlódás következménye a belső hőkeltés (Kovács és mtsai, 2017).

Az eljárás első és egyben legfontosabb lépése az oldószer helyes megválasztása, mely gyakran ugyanaz, mint a hagyományos kivonási módszereknél. Fontos azonban megjegyezni, hogy a MAE esetében a hagyományos oldószer megválasztási lépések mellett, a kivonószer

abszorpciós tulajdonságait is figyelembe kell venni, melyet a dielektromos állandó határoz meg (Destandau és mtsai, 2013). Célszerű olyan oldószert választani, mely nagy dielektromos állandóval és disszipációs tényezővel rendelkezik, ezáltal elősegítve a nagyobb fokú mikrohullám elnyelést és a maximális hőelosztást a mátrixon (Afoakwah és mtsai, 2012). Egyes esetekben, amikor a nagy dielektromos állandójú oldószert kis disszipációs tényezővel rendelkezik (pl. víz) a kutatók azt tapasztalják, hogy a fenolos vegyületek kinyerésénél a MAE eljárás kevésbé hatékony a hagyományos technikákhoz képest. Ennek magyarázata a lokális túlhevítés jelenségének a létrejötte, ebből adódóan pedig a hatóanyagbomlás (különösen hőérzékeny vegyületeknél) azáltal, hogy ezen oldószerszerek a nagy dielektromos állandójuknál fogva több mikrohullámú energiát abszorbeálnak, mint amennyit a disszipációs tényezőjüktől függően képesek eloszlatni (Veggi és mtsai, 2013). Ezen állandók értékétől függően a növényekben lévő bioaktív vegyület MAE-hoz általában az olyan oldószereknek, illetve ezeknek a vízzel alkotott bináris elegyeinek a használata figyelhető meg, mint az etanol, az acetone, a metanol vagy az acetonitril (Lovrić és mtsai, 2017, Khoddami és mtsai, 2013). A módszer hatékonysága ezenkívül olyan tényezőktől is függ, mint az alkalmazott mikrohullámú teljesítmény, besugárzási időtartam, hőmérséklet, mintatömeg:kivonószer-térfogat arány. Az említett paraméterek közül az alkalmazott mikrohullámú teljesítményről célszerű pár szót ejteni, hiszen a többi paraméter esetében a 2.6.1 fejezetben ismertetett törvényszerűségek határozzák meg a diffúziót. A MAE folyamatának optimalizálása érdekében célszerű mérsékelt teljesítményt alkalmazni, ugyanis a nagy teljesítmény alkalmazása esetén fennáll a termikus bomlás kockázata, noha vannak olyan jelentések is, melyek azt mutatják, hogy a

teljesítményváltozónak nincs jelentős hatása a fenolos komponensek hozamára (Al-Mammori és Al- Janabi, 2018). A rozmaringsav MAE-hoz a kutatók a fenti elvet követve általában 400-700 W közötti teljesítményt alkalmaznak (Liu és mtsai, 2011; Dragović-Uzelac és mtsai, 2012; Caleja és mtsai, 2017a).

2.8 Extrakciós módszerek optimalizálása

Az extrakciós folyamatok optimalizálását általában az egy-változós-egyszeri megközelítés elve, vagy más néven egy faktor (változó) egy időben (OFAT) és a válaszfelület-módszertan (RSM) segítségével végzik a kutatók. Az első eljárás egy klasszikus módszer, melynél egyszerre a többváltozós függvény egyik változójának értékeit változtatják és a többi változót ekkor paraméterként állandó értéken tartják. A másik módszer, az RSM, egy matematikai és statisztikai eljárások gyűjteménye, melynek segítségével többváltozós polinomfüggvényt illesztnek a kísérleti adatokra (Chew és mtsai, 2011).

A két eljárás közül az extrakciós folyamatok optimalizálására általában az OFAT eljárást alkalmazzák, noha közismert tény, hogy az optimális működési feltételek, vagy az egyes változók közötti kapcsolatok (korrelációk) ezzel az eljárással nem jósolhatók meg, szemben az RSM módszerrel. Tekintettel erre az alapvető tényre fontos megjegyezni, hogy az OFAT tervezéssel összességében a lokális szélsőérték helyét lehet megkeresni a válaszfüggvény felületén. Az eljárás meghatározó jellemzője tehát, hogy a kísérletek során csak egy független változó értékét változtatva vizsgálják a válaszfüggvény értékeit. Ez úgy értendő, hogy míg például az extrakciós hőmérsékletet változtatjuk, addig a többi változót, mint például az extrakció idejét, a kivonószer koncentrációját, a pH-t stb., mint paramétert állandó értéken tartjuk. Az ily módon egyváltozósá

alakított többváltozós válaszfüggvényünk független változóját addig változtatjuk, amíg meg nem találjuk a függvényünk optimális értékét, majd változónk értékét paraméterként rögzítjük. Ezt követően egy újabb független változó értékeit változtatva határozzuk meg a válaszfüggvény lokális szélsőértéket eredményező értékét, melyet paraméterként rögzítünk, és így tovább. Mindezekből belátható, hogy ez az eljárás a korábban említett hátránya mellett meglehetősen időigényes. Fő előnye azonban az egyszerűsége, valamint, hogy minden egyes mérésről információt szolgáltat ezáltal lehetővé téve a gyorsabb feltárását annak, hogy egy-egy változónak van-e hatása a válaszfüggvényre és, ha igen akkor az milyen mértékű. Az összes vizsgálati sorozat elvégzése után az eredményeket egyszerű grafikonok segítségével elemzik (Qu és Wu, 2005; Wahid és Nadir, 2013; Belwal és mtsai, 2020).

Az utóbbi években egyre nagyobb teret hódít az RSM módszer köszönhetően annak, hogy segítségével jóval kevesebb erőforrást (kísérletek száma, idő, anyagok, stb.) kell igénybe venni. Az RSM-ben a kísérleti tervezésre vonatkozó adatok felhasználásával létrehozott matematikai modellek ugyanis meghatározzák a független- (tényezők) és a függő változók (válaszfüggvény) közötti kapcsolatokat, majd ezeket a modelleket használják a független változók és azok kölcsönhatásainak a válaszokra gyakorolt hatásainak elemzésére, valamint a folyamat optimalizálására. A regressziós modell megjelenítését felületi válaszdiagramokkal (háromdimenziós ábrázolás) és kontúr diagramokkal (kétdimenziós diagram) lehet szemléltetni, melyek segítenek megérteni a válasz tényezőit a különböző tényezőszinteken. Noha az irodalmakban legfőképpen az RSM előnyeit emelik ki a többi optimalizációs eljáráshoz képest, a módszer számos hiányossággal is rendelkezik. Ezek közül

kiemelendő például a szűk kísérleti tartomány, melyből adódóan a kísérletet végző személynek megfelelő ismeretekkel kell rendelkeznie a vizsgált folyamatról az optimális kísérleti tartomány kiválasztásához. Fontos tehát megjegyezni, hogy lokális elemzésről beszélhetünk ennél a módszernél, vagyis a kidolgozott válaszfelület érvénytelen a vizsgált tényezőtartománytól eltérő régióban. Az RSM ugyanis a kísérleti adatokat egy másodfokú polinomiális modellhez illeszti, mely nem magyarázza meg az összes görbületet tartalmazó rendszert. Éppen ezért a becsült értékeket kísérletileg ellenőrizni kell; a kísérleti tervezés kezdeti szakaszában pedig számos szűrési kísérletet kell végezni annak érdekében, hogy meghatározzák azokat a változókat, melyek nagymértékben befolyásolják a választ. Ráadásul ezen változókat általában OFAT tervvel végzett kísérletekkel azonosítják (Czitrom, 1999; Zangeneh és mtsai, 2002; Nair és mtsai, 2014; Aydar, 2018).

2.9 Fenolos savak meghatározására szolgáló analitikai eljárások

A növényi kivonatokban lévő fenolos savak kvalitatív és kvantitatív meghatározására leggyakrabban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszert alkalmazzák UV-, illetve tömegspektrometriás (MS) detektálással. A növényekben megtalálható fenolos vegyületek vizsgálata egyéb elválasztástechnikai eljárásokkal, úgymint vékonyréteg kromatográfia, kapilláris elektroforézis, micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia, továbbá spektrofotometriás módszerekkel is megvalósítható (Nour és mtsai, 2013; Khoddami és mtsai, 2013). Ez utóbbi technikákkal szemben a HPLC módszer előnye, hogy viszonylag egyszerű, nagy pontossággal, felbontással, szelektivitással és érzékenységgel rendelkezik, mindamelllett, hogy teljesen automatizálható

(Oniszczuck és Hawryl, 2011; Bansal és mtsai, 2014; Tzima és mtsai, 2018).

2.9.1 Rozmaringsav vizsgálata folyadékkromatográfias módszerekkel

Az elválasztástechnikai körülmények helyes megválasztása döntő jelentőséggel bír az analitikai vizsgálatok során, hiszen például egy nem megfelelően megválasztott elemzési hullámhossz, vagy egy nem kellően optimalizált mintaelőkészítési módszer az eredményekből levonható téves következtetésekhez vezethet. A fenolos vegyületek esetében az optimális körülmények megválasztása függ a mintamátrixtól, a meghatározandó vegyület kémiai tulajdonságaitól és molekulaszervezetétől, valamint az aromás gyűrűk és a hidroxil (-OH) csoportok számától, illetve polaritásától (Khoddami és mtsai, 2013). A gyógynövények rozmaringsav-tartalmának meghatározásához általában egyszerű mintaelőkészítési módszereket alkalmaznak, mely során a gyógynövény extraktumot közvetlenül a centrifugálást, az esetleges hígítást, illetve a membránszűrést követően injektálják a HPLC oszlopra (Olenikov és Tankhaeva, 2010; Arceusz és Wesolowski, 2013; Petkova és mtsai, 2017). Számos esetben találkozhatunk olyan mintaelőkészítési módszerrel, amely során az extraktumot szárazra párolják, majd a kapott szárazmaradékot szerves oldószerben felveszik (Hamrouni-Sellami és mtsai, 2012). Abban az esetben pedig, amikor a növényi kivonatokban lévő rozmaringsav izolálása mellett, annak tisztítására is szükség van a szilárdfázisú extrakciót (SPE) alkalmazzák (Zgórka és Głowniak, 2001).

A rozmaringsav HPLC-vel történő elválasztására – néhány kivételtől eltekintve – szinte minden esetben fordított fázisú (RP) oktadecil sziloxánnal módosított szilikagél töltetű (C18) 100-250 mm hosszú, 2 - 4,6 mm belső átmérőjű, 3-5 μm átlagos részecskeátmérővel rendelkező

oszlopokat használnak (Radušienė és mtsai, 2008; Baj és mtsai, 2011; Raudone és mtsai, 2017; Milevskaya és mtsai, 2017; Duletić-Laušević és mtsai, 2018). Mindazonáltal, az esetek többségében a vizsgálatokhoz 25-30°C közötti oszlop hőmérséklettel dolgoztak (Luis és Johnson, 2005; Wang és mtsai, 2004; Adham, 2015; Petkova és mtsai, 2017). Ennél nagyobb oszlop hőmérséklet alkalmazására is találhatunk pár példát (Zimmermann és mtsai, 2011; Benedec és mtsai, 2015; Ghanadian és mtsai, 2018). Ziaková és Brandšteterová (2003) különböző Lamiaceae családba tartozó növényekben lévő rozmaringsav elválasztására a következő fordított fázisú folyadékkromatográfiás oszlopokat tesztelték: C18 (GROM-SIL 100 ODS-0 AB, 120 ODS-3 CP, 120 ODS-4 HE, SEPARON SGX C18, Symmetry Shield C18, Symmetry C18, Develosil ODS), C8 (GROM-SIL 100 OCTYL-4 FE), és CN (GROM-SIL 120 CYAN-3CP). Elemzéseik során a vizsgált kromatográfiás jellemzők (retenciós idő, kapacitási tényező, felbontóképesség, aszimmetria, elméleti tányérszám) alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a ciano-propillal módosított szilikagél állófázissal rendelkező oszlopok nem alkalmasak a rozmaringsav elválasztására, szemben a C18-as töltetű oszlopokkal, melyek közül a legjobb csúcsszimmetriát a Symmetry Shield és a GROM SIL 120 ODS-4 HE mutatta.

A mozgófázis kiválasztása az elválasztandó vegyületek típusától és természetétől függ. Mivel a legtöbb fenolos sav pK_a értéke megközelítőleg 4 ($pK_{\text{arozmaringsav}} = 3,57$), a HPLC elemzések során ajánlott a 2-es körüli pH alkalmazása annak érdekében, hogy elkerüljük a fenolok ionizációját és a meghatározandó vegyület csúcsalakjának kiszélesedését az azonosítás során (Brandšteterová és Žiaková-Čaniová, 2010; Khoddami és mtsai, 2013; Ngo és mtsai, 2018). A rozmaringsav elválasztásához általában

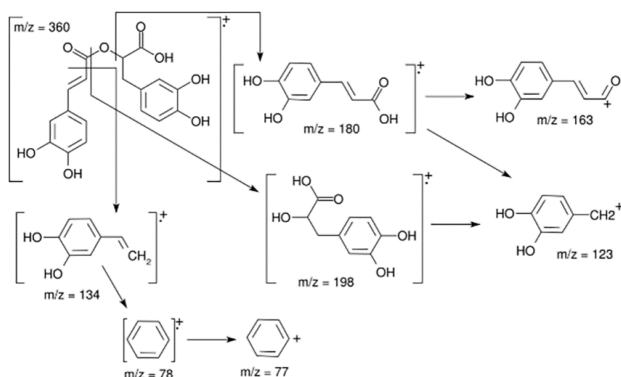
szerves oldószereket (metanol, acetonitril) és vizet alkalmaznak kis koncentrációjú ecet-, hangya-, foszfor-, és trifluorecetsavval (TFA) (Ondrejovič és mtsai, 2009; Al-Dhabi és mtsai, 2014; Jassbi és mtsai, 2014; Suwanchaikasem és mtsai, 2014; Adham, 2015; Gökbulut, 2015), valamint foszfát-, nátrium-citrát-, ammónium-formiát és ammónium-acetát pufferekkel (Widmer és Laurent, 2006; Yam és mtsai, 2012; Benedec és mtsai, 2015; Tohma és mtsai, 2016). Míg a savak koncentrációja általában 0,01-6 v/v% közötti (Tzima és mtsai, 2018), addig a puffereké 5-50 mM (Brandšteterová és Žiaková-Čaniová, 2010). A gradiens elúciós rendszerek mellett (Wang és mtsai, 2004; Luis és Johnson, 2005; de Oliveira és de Oliveira, 2013, Liu és mtsai, 2013), esetenként az izokratikus módszerek alkalmazása is megfigyelhető (Canelas és da Costa, 2007; Jirovský és mtsai, 2007; Couto és mtsai, 2011).

Az aromás UV kromofor csoporttal rendelkező fenolos vegyületek kvantitatív meghatározásához túlnyomórészt a 190-380 nm hullámhossz tartományú UV spektrometriát használják diódasoros detektorok (DAD) alkalmazásával (Robbins, 2003, Harnly és mtsai, 2007). A rozmaringsav azonosítására az előbb említett módszeren kívül az MS technika alkalmazása a legelterjedtebb, ritkább esetekben pedig találkozhatunk olyan detektálási módszerekkel is, mint az elektrokémiai (Salihovic és mtsai, 2010), vagy a mágneses magrezonancia spektroszkópia (Exarchou és mtsai, 2001). A hatóanyagok azonosítása DAD módszer esetében retenciós idő, UV spektrum, referencia standardok és irodalmi adatok alapján történhet. Míg a legtöbb benzoésav származék abszorpciós maximuma 246-262 nm között van, addig ez az érték a hidroxifahéjsavak esetében 320 nm körüli hullámhossznál található (Lee, 2000; Aleixandre-Tudo és du Toit, 2018). A rozmaringsav az esetek többségében viszonylag

könnyen azonosítható még abban az esetben is, ha nem áll rendelkezésünkre MS, köszönhetően jellegzetes abszorpciós UV spektrumának. Azonosításához a leggyakrabban alkalmazott 280 nm-es hullámhossz mellett (Bandoniene és mtsai, 2005; Luis és Johnson, 2005; Yang és mtsai, 2010; Fotovvat és mtsai, 2019), a következő abszorbeáló hullámhosszok alkalmazására is találunk számos példát: 254, 270, 290, 310, 320, 324, 330 nm (Tóth és mtsai, 2003; Mărculescu és mtsai, 2007; Radušienė és mtsai, 2008; Arceusz és Wesolowski, 2013; Dvorackova és mtsai, 2014).

Noha kutatómunkámnak nem képezte részét a HPLC-nek az MS-sel való kombinálása, e technikáról is fontos néhány szót ejteni, hiszen az elmúlt években jelentősen megnövekedett a használata. Az MS-sel meghatározás alapvetően három lépésre (ionizáció, tömegelemzés, detektálás) osztható. Ezen lépések során az oszlopról eluálódó komponensek először az ionforrásban fragmentálódnak, illetve ionizálódnak szerkezeti tulajdonságaiktól függően, majd ezt követően a keletkezett ionok a tömeg/töltés (m/z) értéküknek megfelelően az analizátorban elválnak és a detektorban intenzitásukkal arányos jelet szolgáltatnak (Kremmer és Torkos, 2010). A rozmaringsavnak a HPLC-MS-sel történő vizsgálata során általában elektroporlasztásosionizációs (ESI) technikát alkalmaznak, mivel az ESI-vel előállítható protonált és deprotonált molekulaionok fragmentációja általában korlátozott és ezért a fragementionok kis számának köszönhetően a tömegspektrumuk is viszonylag egyszerű (Afonso és mtsai, 2017; Milevskaya és mtsai, 2017). A 8. ábra a rozmaringsav elektronütköztetési (EI) ionizációja során végbemenő fragmentációjának főbb lépéseit mutatja. A pozitív ionizáció során keletkezett $m/z=360$ tömeg/töltésű rozmaringsav gyökion

($C_{18}H_{16}O_8^+$) fragmentációjából a következő tömeg/töltésű ionok keletkeznek: $m/z=198$: 3,4-dihidroxi-fenil tejsav gyökion ($C_9H_{10}O_5^+$), $m/z=180$: kávéssav gyökion ($C_9H_8O_4^+$), $m/z=163$: acilium ion ($C_9H_7O_3^+$). További fragmentációval ionok jelennek meg a tömegspektrumban: $m/z=134$ ($C_8H_6O_2^+$), $m/z=123$ ($C_7H_7O_2^+$) báziscsúcs, $m/z=78$ ($C_6H_6^+$) és $m/z=77$ ($C_6H_5^+$) (Mehrabani, 2005).



8. ábra Rozmaringsav elektronütköztetési (EI) ionizációja során keletkező molekulaion ($m/z=360$) fragmentációjának folyamata (Mehrabani, 2005 alapján)

2.9.2 Spektrofotometriás módszerek alkalmazása rozmaringsav-tartalmú kivonatok esetében

Az elmúlt években egyre több kutató foglalkozik a különböző növényi kivonatokban lévő antioxidáns hatású vegyületek spektrofotometriás vizsgálatával. A nagyszámú rendelkezésre álló módszer ellenére azonban ezen vegyületek elemzése nem túl hatékony folyamat, melynek oka, hogy a különböző módszerekkel mért eredmények szinte összehasonlíthatatlanok (Nemes és mtsai, 2015). A jelenleg alkalmazott eljárásokat hidrogénatom-átvitelen (HAT) és elektronátmeneten (ET) alapuló meghatározások csoportjába lehet osztani attól függően, hogy az egyes eljárások gyöksemlegesítő reakciói a fenolos

vegyületek –OH csoportjaiból történő hidrogén, vagy elektron transzferen alapulnak e. Míg az előbbi csoportba olyan módszerek tartoznak, mint például az oxigéngyök abszorpciós kapacitás (ORAC), az összes peroxilgyök befogadására vonatkozó paraméter (TRAP) vagy a fotokemilumineszcencián alapuló eljárások, addig az utóbbiba a vasredukáló képességen alapuló (FRAP), a Folin-Ciocalteu reagenssel végzett összes polifenol (TPC), a troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás (TEAC) vagy a 2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil gyök megkötésen (DPPH) alapuló mérések sorolhatók (Gulcin, 2020).

A rozmaringsav-tartalmú növényi kivonatok vizsgálatánál általában a tinktúrák eltarthatósági vizsgálatánál általam is alkalmazott összes polifenol és DPPH gyök megkötésen alapuló módszereket alkalmazzák. Éppen ezért ezen eljárások elvét kívánom röviden összefoglalni.

2.9.2.1 Összes polifenol-tartalom meghatározás Folin-Ciocalteu reagenssel

A Singleton és Rossi (1965) által kifejlesztett összes polifenol-tartalom meghatározására szolgáló módszer nem más, mint egy elektronátmeneten alapuló reakció, mely az antioxidáns redukív képességét méri (Lamuela-Raventós, 2017). Az eljárás elve, hogy a Folin-Ciocalteu reagensben lévő sárga színnel rendelkező Mo(VI) ionok antioxidánsok jelenlétében kékszínű Mo(V) ionokká redukálódnak (Chen és mtsai, 2015). A polifenolok és az eljárás során alkalmazott reagens közti reakció nátrium-karbonáttal (Na_2CO_3) biztosított lúgos körülmények között (pH=10) megy végbe azáltal, hogy a fenolos proton disszociációja útján keletkező fenolátion redukálja a Folin-Ciocalteu reagenst (Sánchez-Rangel és mtsai, 2013). A keletkező kék szín intenzitását 725-760 nm

közti hullámhossztartományban mérik, az eredményeket pedig galluszsavra vonatkoztatva adják meg (Chrpová és mtsai, 2010; Skendi és mtsai, 2017). A módszer fő hátránya, hogy nem szelektív a polifenolos komponensekre, hiszen a növényi kivonatokban előforduló egyéb vegyületek (glükóz, fruktóz, L-aszcorbinsav) nagyobb mennyiségben a reagens redukciójához vezethetnek, ezáltal torzítva az eredményeket. A módszer ezen tulajdonságából adódóan sorolják azonban az eljárást az antioxidáns kapacitást meghatározó módszerek közé (Sánchez-Rangel és mtsai, 2013, Gulcin, 2020).

2.9.2.2 2,2-difenil-1-pikrilhidarzil (DPPH) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés

A növényi anyagok antioxidáns aktivitásának mérésekor gyakorta találkozhatunk a 2,2-difenil-1-pikrilhidarzil (DPPH) gyök megkötésén alapuló eljárással is köszönhetően annak, hogy a DPPH azon kevés stabil szabad gyökök egyike, mely kereskedelemben kapható, ráadásul a módszer kivitelezése is meglehetősen gyors és egyszerű (Kedare és mtsai, 2011). A Blois (1958) által kifejlesztett módszer elve, hogy a párosítatlan elektronnal rendelkező, ibolyás lila színű DPPH antioxidánsokkal reagálva sárga színű DPPH-ra redukálódik (Dontha, 2016). A színváltozást általában 517 nm-en, a DPPH abszorpció maximumán követik nyomon (Gulcin, 2020). Az eredményeket többnyire gátlásszázalékban (%), antioxidáns hatású vegyületekre (L-aszcorbinsav, BHT) vonatkoztatva, vagy pedig IC_{50} értékben – minta azon koncentrációja, mely gátolja a DPPH gyök 50%-át – fejezik ki (Amorati és Valgimigli, 2015). Az eljárás fő hátránya, hogy a reakció végbemeneteléhez alkalmazott DPPH a szerkezetben nem található meg, melyből adódóan nehéz szemléltetni, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire

reaktívak (Nemes és mtsai, 2015). További problémát jelent, hogy bizonyos vegyületek (pl. anticaninok) az azonos hullámhossztartományban történő abszorpció miatt spektrális zavaró hatást okoznak (Gulcin, 2020).

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Felhasznált vegyszerek, reagensek

Míg a gyógynövénykivonatok előállításához használt vízmentes etanolt és a Ph. Eur. minőségű metanolt a Merck (Darmstadt, Németország), addig a hatóanyagok HPLC-vel történő azonosításához használt kávésav ($\geq 98\%$) és rozmaringsav (96%) standard vegyületeket a Sigma Aldrich (Magyarország) forgalmazta.

Vizsgálataimhoz analitikai tisztaságú 99%-os trifluoecetsavat (Riedel-de Haën, Németország), 37%-os sósavat (Biolab, Magyarország), 75%-os foszforsavat (Merck), L-aszkorbinsavat (Sigma Aldrich, Magyarország), galluszsavat (Merck), Folin-Ciocalteu reagenst (Merck), vízmentes nátrium karbonátot (Riedel-de Haën, Németország), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilt (Sigma Aldrich, Magyarország), nagy tisztaságú vizet (18 M Ω cm), n-hexánt (Carlo Erba, Franciaország), valamint HPLC tisztaságú metanolt (LGC Standards, Németország) és acetonitrilt (Fisher Scientific, UK) használtam.

3.2 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 gyógynövényeknek az előkészítése a tanszékünkre való érkezését követően a leveleknek a szárrészről való eltávolításából, majd az így eltávolított levélrészeknek az aprításából állt (becsült átlagos részecskeátmérő $< 0,5$ mm). Az egységesített növénymintákat a további felhasználásig zárt edényben,

fénytől védve, 5°C-on hűtőszekrényben tároltam. Az etanolos tinktúrákat, illetve a csokoládétermék elkészítéséhez szükséges szárazkivonatot a fentebb megnevezett gyógynövények felhasználásával készítettem.

A csokoládétermék kifejlesztéséhez használt 54,5%-os étcsokoládé-pasztillát az Édeni Édességek Boltja (Szentendre, Magyarország) forgalmazta. A rendelkezésre bocsátott információk alapján az étcsokoládé-pasztilla átlagos tápérték adatai 100 g termékre vonatkoztatva a következők:

Energia: 2307 kJ

Zsír: 37 g (ebből telített zsírsavak: 22 g)

Szénhidrát: 46 g (ebből cukrok: 43 g)

Fehérje: 5,1 g

Só: 0,01 g

3.3 Alkalmazott készülékek

Az elemzésekhez a nagytisztaságú vizet Zeneer Power I (Human Corporation, Korea) víztisztítóval állítottam elő. Az extrakciós módszerek fejlesztéséhez, valamint az étrend-kiegészítőként és funkcionális élelmiszerként szolgáló termékek előállításához és mintaelőkészítéséhez 358S (Elpan, Lengyelország) laboratóriumi rázógépet, Mars 5 (CEM Corporation, USA) mikrohullámú berendezést, RE-100 (Bibby Scientific, UK) vákuum bepárlót, FD-3-85A-MP (FTS Systems, USA) fagyasztva szárítót, RX³ kémcsőrázót (VELP Scientifica, Olaszország), Heraeus T6 szárítószekrényt (Thermo Scientific, Németország), RF-120F ultrahangos készüléket (Realsonic, Magyarország), illetve 3K12 típusú laboratóriumi centrifugát (Sigma, Németország) használtam.

A gyógynövények folyékony kivonatainak kromatográfias vizsgálatához egy kvaterner gradiensképző egységgel ellátott szivattyúból

(L-7100), automatikus mintaadagolóból (L-7250), kolonna termosztátból (L-7350) és diódasoros detektorból (L-7450) álló LaChrom 7000 (Merck-Hitachi) HPLC rendszer szolgált. Az adatfeldolgozást D-7000 HPLC System Manager 4.0 (HSM) számítógépes szoftver segítségével végeztem.

A csokoládétermékek kromatográfias elemzése PU-980 szivattyúból, DG208054 vákuumos gázmentesítőből, LG-98002 kvaterner gradiens képzőből, MD-4010 diódasoros detektorból, AS2055Plus automatikus mintaadagolóból, valamint Model 7955 kolonna termosztátból álló HPLC rendszer (Jasco, Japán) segítségével valósult meg. Az adatokat ChromNav 2.0 számítógépes program segítségével dolgoztam fel.

A tinktúrák összes polifenol-tartalom, valamint DPPH-gyök megkötésen alapuló antioxidáns kapacitásának méréseit Spectroquant Pharo 100 (Merck) típusú spektrofotométerrel hajtottam végre.

3.4 Extrakciós módszer fejlesztése folyékony kivonatok előállításához

A jelen tanulmányban alkalmazott extrakciós módszereknek (MACs, HRE, MAE) a fejlesztése, az egy faktor egy időben megközelítés elve (OFAT) alapján, a növények kemotaxonómiai markerének, a rozmaringsavnak a nyomon követésén alapult. A rozmaringsav maximálisan kinyerhető mennyiségéhez szükséges extrakciós körülmények meghatározásához a következő független paramétereket vizsgáltam: kivonószer típusa, kivonószer savassága, extrakció időtartama és hőmérséklete.

A MACs-t csiszolatos dugóval lezárt 100 mL-es 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 $30 \pm 5^\circ\text{C}$ -ra. Ezt követően a mintákat további 5 percre hideg vízfürdőbe helyeztem.

A kivonatolási eljárásokhoz minden esetben 0,25 g növényi anyagot és 10 mL kivonószert használtam. Analitikai szempontból ezen optimális mintatömeg:kivonószer-térfogat (1:40 g/mL) arányt – citromfűvel végzett előzetes kísérletek figyelembevételével – 70:30 v/v EtOH-H₂O elegy segítségével, a következő mintatömeg:kivonószer-térfogat arányok alkalmazása mellett állapítottam meg: 1:20, 1:40, 1:60 g/mL.

Az egyes módszerekhez használt savanyított EtOH-H₂O-HCl keverékből (70:30:1 v/v/v) készült extrakciós kivonószert a következőkben bemutatandó optimalizálási lépések sorozatán keresztül választottam ki. Minden gyógynövény esetében kezdeti szűrési kísérleteket végeztem szobahőmérsékleten történő, 1440 percig tartó MAC_S eljárással. Ezen kísérletek során 0; 0,1 és 1 v/v% HCl-val savanyított EtOH-H₂O (0:100, 50:50, 70:30 és 100:0 v/v) elegyek hatását vizsgáltam a kinyerhető rozmaringsav mennyiségére. A további kísérletekhez négy MeOH-H₂O (30:70, 50:50, 70:30 és 100:0 v/v) keveréket alkalmaztam 1 v/v% HCl-val. A savasodás mértéke az EtOH és H₂O felhasználásával végzett kísérletek eredményein alapultak

feltételezve, hogy a savanyítás a metanolos extrakció visszanyerési hatékonyságát is javítja. Ezen kívül vizsgálataimat a következő EtOH-H₂O-HCl (30:70:1 v/v/v) kivonószerkeverékre is kiterjesztettem. A kezdeti szűrési kísérletek eredményei alapján az 1 v/v% HCl-t tartalmazó kivonószerket citromfűvel teszteltem maximális extrahálási idővel mind a három extrakciós módszer esetében.

3.5 Extrakciós módszer fejlesztése adalékolt csokoládé HPLC elemzéséhez

Az adalékolt étcsokoládék rozmaringsav-tartalmának kinyeréséhez alkalmazott extrakciós módszereknek (MAC_S, MAE) a fejlesztése szintén az OFAT elv alapján került kivitelezésre a következő két tényezőnek (független változó) a figyelembe vételével: kivonószer típusa és extrakció időtartama.

A kivonatolásokhoz minden esetben 500 mg zsírtalanított csokoládét és 10 mL kivonószer alkalmaztam. Az optimális kivonószer kiválasztásához EtOH-H₂O, valamint MeOH-H₂O különböző arányú keverékeinek (100:0 és 50:50 v/v) hatását vizsgáltam.

A MAC_S extrakciós módszernek a kivitelezése a 3.4 fejezetben ismertetett módon került megvalósításra. A MAE eljárást az alkalmazott hőmérséklet kivételével, mely ezesetben 60°C volt, szintén az előző fejezetben leírtak szerint hajtottam végre.

3.6 Mintaelőkészítés

3.6.1 Folyékony kivonatok, tinktúrák

Az extrakciós módszerek fejlesztése során előállított folyékony kivonatok, majd ezen optimalizálási módszer alapján kifejlesztett tinktúrák HPLC elemzése közvetlenül, a minták előkészítése nélkül

valósult meg, szemben a spektrofotometriás vizsgálatok esetében végrehajtott mintaelőkészítési (hígítás 50:50 v/v EtOH-H₂O) lépésekkel, ezáltal minimalizálva a hatóanyagok veszteségének lehetőségét és a pontosabb hatóanyag tartalom nyomon követését az eltarthatósági vizsgálatok során.

3.6.2 Csokoládétermékek

A citromfű szárazkivonattal, a standard rozmaringsavval adalékolt, valamint az adalékolatlan (kontroll) szilárd csokoládé minták előkészítését kétlépéses mintaelőkészítési folyamat alkotta. Első lépésben a megszilárdult csokoládékat lereszeltem, majd dörzsmozsárban egységesítettem (becsült átlagos részecskeátmérő $\leq 0,20$ mm). Az így előállított mintákat a további felhasználásig zárt edényben, fénytől védve, 5°C-on hűtőszekrényben tároltam. A mintaelőkészítés második fázisa az egységesített csokoládék alikvot mennyiségének (0,5000 g) 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 percig kémcsőrázóval intenzíven kevertettem. A mintákat további 5 percig ultrahanggal rázattam, majd az így kapott elegyet centrifugáltam ($2500 \times g$, 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.

3.7 HPLC mérési feltételek

3.7.1 Folyékony kivonatok, tinktúrák

Vizsgálataim során a folyékony kivonatok rozmaringsav-tartalmának analizéséhez Arceusz és Wesolowski (2013) általam módosított gradiens módszerét alkalmaztam. Állófázisul mindegyik vizsgált gyógynövény esetében egy Merck gyártmányú C18-as Purospher Star (250 mm, 4,6 mm, 5 μ m) oktadecil szilánal módosított utószilanizált nagy tisztaságú szilikagél töltetű 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 mozgófázis térfogatárama 1 mL/min, az elemzési idő 47 min, a detektálási hullámhossztartomány 220 - 400 nm, a sáv szélesség 4 nm, a mintavételi idő pedig 400 ms volt. A HPLC elemzést megelőzően a mintákat minden esetben centrifugáltam (2500 \times g, 10°C, 10 min), majd a felülúszóból 2 μ L-t egy 0,22 μ m-es PVDF membránon való szűrést követően közvetlenül a HPLC oszlopra injektáltam.

3.7.2 Csokoládétermékek

A citromfű szárazkivonattal illetve standard rozmaringsavval adalékolt és adalékoltalan csokoládék folyadékkromatográfiás elemzéséhez egy Supelco gyártmányú Ascentis Express C18-as (150 mm, 3 mm, 5 μ m) mag-héj töltetű (nem porózus szilícium-dioxid magot körülvevő porózus szilikagél héjú gömbszimmetrikus részecskékkel töltött), úgynevezett „fused-core” 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 térfogatárama 0,5 mL/min, az elemzési idő 35 min, a detektálási hullámhossztartomány 200 - 400 nm, a sáv szélesség 2 nm, a mintavételi idő pedig 0,1 s volt. A HPLC elemzést megelőzően a mintákat a folyékony kivonatokkal és a tinktúrákkal megegyező módon centrifugáltam, majd a felülúszóból szintén 2 µL-t egy 0,22 µm-es PVDF membránon való szűrést követően közvetlenül a HPLC oszlopra injektáltam.

3.8 HPLC módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása

Az alkalmazott HPLC módszerek érvényesítésénél a következő teljesítményjellemzőket határoztam meg: linearitás, szelektivitás és specifitás, precizitás, pontosság, valamint meghatározási határ (LOQ).

3.8.1 Folyékony kivonatok, tinktúrák

A módszer lineáris tartományát a kalibráló görbék vizsgálatával határoztam meg. Ehhez 1 mg/mL-es (kávésav), illetve 5 mg/mL-es (rozmaringsav) koncentrációjú metanolos törzsoldatokat készítettem. A törzsoldatokból készített kávésav mérőoldat koncentrációtartománya 2 - 100 µg/mL volt. A rozmaringsav esetében a mérőoldatokat a pontosabb kiértékelés végett két különböző koncentrációtartományban (10 - 400 µg/mL és 400-4000 µg/mL) állítottam elő. A törzsoldatok hígítását minden esetben 50:50 v/v MeOH-H₂O eleggyel végeztem.

Az alkalmazott kromatográfias módszer specifikusságának és szelektivitásának megállapításához a mintákban lévő adott hatóanyag komponensnek a retenciós idejét és UV-spektrumát vettem össze ugyanazon standard hatóanyag retenciós idejével és UV spektrumával. A szelektivitást az alkotók kromatográfias csúcsából és UV spektrumából a kromatográfias szoftverünk segítségével számolt csúcstisztasági értékkel igazoltam.

A módszer ismételtetésének meghatározásához elemzésenként 3 párhuzamos mérést végeztem, majd az azonosított komponensek retenciós idejének és kromatográfias csúcs alatti területei átlagának relatív szórását (RSD%) vizsgáltam. A pontosságot, vagyis a mérésstartomány torzítatlanságának mértékét, referenciaanyagok hiányában, a standard vegyületek etanolos extraktumokhoz ismert mennyiségben hozzáadásával határoztam meg, átlagos visszanyerhetőségi százalékban (R%) kifejezve, a következő képlet segítségével:

$$R\% = \frac{C_{adalékolt} - C_{minta}}{C_{hozzáadott}} \times 100 \quad (4)$$

Ahol: $C_{adalékolt}$, C_{minta} és $C_{hozzáadott}$ rendre az adalékolt minta koncentrációja ($\mu\text{g/mL}$), a minta adalékolás előtti koncentrációja ($\mu\text{g/mL}$) és a hozzáadott standard vegyület koncentrációja ($\mu\text{g/mL}$).

A meghatározási határt (LOQ) a mintaoldatokban azonosított hatóanyag-komponensek koncentrációja adta 10:1 jel/zaj arány mellett.

3.8.2 Csokoládétermékek

Az újonnan kifejlesztett HPLC módszer rendszeralkalmassági vizsgálatát különböző koncentrációjú rozmaringsav standard, illetve extrahált csokoládé oldat háromszori injektálásával vizsgáltam a

következő paraméterekre: elméleti tényérszám (> 2000), retenciós idő ($RSD\% < 1$), csúcs szimmetria (≤ 2) és felbontás ($> 1,5$).

A csokoládétermékek esetében a linearitást 1 mg/mL koncentrációjú metanolos törzsoldatból készített, 50:50 v/v MeOH-H₂O eleggyel hígított rozmaringsav (5-800 µg/mL) mérőoldat segítségével elemeztem.

A mérési napokon belüli és azok közötti (3 nap) ismételhetőség meghatározásához elemzésenként 3 párhuzamos mérést végeztem különböző koncentrációjú (10, 100 és 400 µg/mL) standard rozmaringsav, valamint 4 mg/g (névleges koncentráció) rozmaringsavat tartalmazó extrahált étcsokoládé oldatokkal. Az ismételhetőséget a kapott csúcs alatti területek relatív szórásaként (RSD%) ismertetem.

A pontosságot a standard rozmaringsavval adalékolt (400 mg) étcsokoládé (100 g) átlagos visszanyerhetőségi százalékaival (R%) fejeztem ki a (4) képlet segítségével. Az LOQ értéket a 3.8.1 fejezetben leírtak szerint határoztam meg.

3.9 Spektrofotometriás vizsgálatok

3.9.1 Összes polifenol-tartalom meghatározás

Ez irányú vizsgálataim során Singleton és Rossi (1965) módszerét vettem alapul. Ennek megfelelően a mérésekhez szükséges reagenseket úgy, mint a 10% Folin-Ciocalteu reagenst és a 7,5 g/100 mL Na₂CO₃ oldatot, ionmentes víz segítségével állítottam elő. A kalibráláshoz galluszsavat használtam 100-1000 µg/mL koncentráció tartományban.

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 reakció során keletkező kék szín megjelenéséhez mintáimat fénytől védett helyen 90 percig, szobahőmérsékleten tartottam. Az abszorbanciát 725 nm-es hullámhosszúságon, gyógynövény extraktumot nem tartalmazó vakoldattal szemben spektrofotometriásan mértem. Az abszorbancia mérésekből és a galluszsavval 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.

3.9.2 Összantioxidáns kapacitás vizsgálata

A termékek antioxidáns aktivitásának meghatározását célzó vizsgálataimat Blois (1985) által kifejlesztett, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) megkötésén alapuló antioxidáns kapacitási módszerrel hajtottam végre. Ehhez 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 metanolos DPPH oldattal jelre állítottam. A mérésekhez gyógynövény extraktumot nem tartalmazó vakoldatot is készítettem, majd 60 perc elteltével az oldat abszorbanciájának csökkenését 517 nm-es hullámhosszúságon metanollal szemben spektrofotometriásan mértem. Az IC₅₀ értéket µg/mL egységben kifejezve 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. A DPPH gyök aktivitást mg L- aszkorbinsav/g (mg AAE/g) ekvivalensben fejeztem (növényi szárazanyagra vonatkoztatva) ki a következő egyenlettel:

$$DPPH_{akt} = \frac{IC_{50L-aszorbinsav}}{IC_{50tinktúra/standard}} \times 10^3 \quad (5)$$

3.10 Termékfejlesztés

A 3.4 és a 3.5 fejezetekben bemutatott optimalizálási lépések, valamint gazdasági szempontok figyelembevételével, a termékek elkészítéséhez szükséges folyékony kivonatok előállítása minden esetben 1:20 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arány alkalmazása mellett, szobahőmérsékleten végrehajtott MACs technikával valósult meg 120 perces kivonási időtartammal.

3.10.1 Étrend-kiegészítő készítmény (tinktúra)

Az egyes etanolos kivonatok, mint étrend-kiegészítő készítmények 3 g aprított növényi anyag és 60 mL 50:50 v/v EtOH-H₂O elegy felhasználásával készültek. Az így elkészült extraktumokat 1-es típusú Whatman szűrőpapíron (Sigma-Aldrich) szűrtem, majd a szűrleteket, mint tinktúrákat használtam a további elemzésekhez. Kontroll mintaként standard rozmaringsav (500 µg/mL) 50:50 v/v EtOH-H₂O elegyét használtam.

3.10.2 Funkcionális élelmiszer (adalékolt csokoládé)

A funkcionális élelmiszerként szolgáló csokoládétermék kifejlesztéséhez szükséges növényi szárazkivonat (*extractum siccum*) előállításához első lépésben 75 g porított citromfűvet 1500 mL 50:50 v/v EtOH-H₂O eleggyel extraháltam, majd az így nyert alkoholos kivonatot 1-es típusú Whatman szűrőpapíron szűrtem. Ezt követően a *siccum* előállításának lépései a szűrlet vákuum bepárlásából, továbbá a visszamaradt viszkózus anyag 24 órán át történő liofilizálásából álltak. A kivonat rozmaringsav-tartalmának meghatározását, annak alikvot

részének (50 mg) 50:50 v/v EtOH-H₂O elegyben (50 mL) történő visszaoldásával végeztem.

A növényi száraz extraktummal adalékolt étcsokoládé előállítására 400 mg rozmaringsavval egyenértékű szárazkivonatnak a hozzáadásából állt 100,34 g vízgőz felett felolvasztott étcsokoládé-pasztillához, 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 (100 mg rozmaringsav/25 g csokoládé) adalékolt étcsokoládét, valamint standard hatóanyagot és növényi szárazkivonatot nem tartalmazó, kontroll mintaként szolgáló étcsokoládét is készítettem.

3.11 Stabilitási vizsgálatok

3.11.1 Tinktúra

A tinktúrák stabilitási vizsgálatához a 3.10.1 alfejezetben ismertetett módon előállított kivonatoknak és a standard rozmaringsav oldatnak 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 és a standard oldat rozmaringsav-tartalmának változását havi rendszerességgel (0, 27, 55, 86, 113, 141 és 168 nap) elemeztem. Ezen vizsgálatok során nyomon követtem továbbá a

tinktúrák kávésav tartalmának, valamint összes polifenol és antioxidáns tulajdonságainak változását is. Az eltarthatósági időtartam megállapításához a marker vegyületnek (rozmaringsav) legfeljebb 10%-os hatóanyagbomlását tekintettem elfogadhatónak a fogyasztó számára megfelelő hatékonyság biztosítása érdekében.

3.11.2 Csokoládétermékek

Ezen irányú vizsgálataimhoz az elkészített csokoládék egy részét (40 g) alumíniumfóliába csomagolva, hűtőszekrényben, 5°C-on hat hónapig tároltam. A citromfű szárazkivonattal és a standard rozmaringsavval adalékolt étcsokoládék rozmaringsav-tartalmát 29 napos időközönként, havi rendszerességgel 6 hónapig elemeztem. Az eltarthatósági időtartam megállapításához a tinktúrák tárolási vizsgálatánál is alkalmazott hatóanyagbomlás megengedhető mértékét (10%) vettem alapul.

3.12 Alkalmazott statisztikai módszerek

Az adatokat átlag ($n=3$) \pm 95%-os konfidencia intervallum formátumban (U) tüntettem fel, amelyet a következőképpen határoztam meg: $U = t \times SD/n^{1/2}$, ahol n a párhuzamos mérések száma, SD a tapasztalati szórás, t pedig a $n-1$ szabadsági fokhoz és két oldali 95%-os megbízhatósághoz tartozó t -érték. A mért értékek normál eloszlásának igazolásához F-próbát, a vizsgálatok várható értékeinek összehasonlításához pedig egytényezős varianciaanalízist (ANOVA, $p \leq 0,05$) alkalmaztam. A statisztikai elemzéseket LibreOffice Calc 6.0 táblázatkezelő felhasználásával végeztem.

4 EREDMÉNYEK

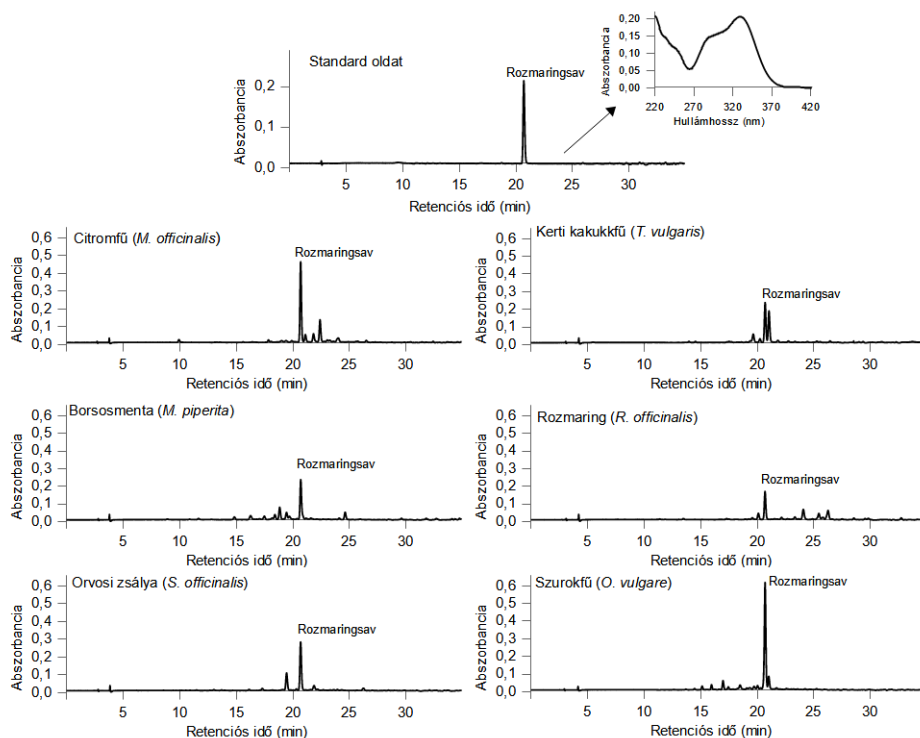
Mivel doktori munkám kutatási része összességében a rozmaringsav diffúzióját befolyásoló paramétereknek a kihozatalra gyakorolt hatásának tanulmányozásából, étrend-kiegészítők és funkcionális élelmiszer fejlesztéséből, valamint ezen termékek eltarthatósági vizsgálatából állt, eredményeimet három külön alfejezetben ismertetem. Ennek megfelelően az első fejezetben a rozmaringsav extrakcióját befolyásoló fő diffúziós paraméterek hatását, valamint az alkalmazott kromatográfias módszer teljesítményjellemzőit tárgyalom. A második fejezetben belül azon vizsgálataimat és eredményeimet szemléltetem, melyek az étrend-kiegészítőként funkcionáló tinktúrák termékfejlesztési lépéseivel, valamint eltarthatósági vizsgálataival függenek össze. A harmadik fejezetben pedig azokat a kísérleti eredményeimet foglalom össze, melyek az adalékolt étcsokoládé vizsgálatait célozták meg.

4.1 Extrakciós módszerfejlesztés folyékony gyógynövénykivonatokban lévő rozmaringsav kinyerésére

4.1.1 Rozmaringsav kvalitatív és kvantitatív elemzése

Ezen irányú vizsgálataim során elsőként az alkalmazott kromatográfias módszer szelektivitását vizsgáltam, azaz az előállított etanos kivonatok kromatogramjában megjelenő rozmaringsav-csúcsoknak a megfelelő elválását a mintákban lévő egyéb kísérő komponensektől. Ez a paraméter ugyanis az egyik legfontosabb tényező, hiszen e nélkül nem tudnánk a vizsgált minta egyes komponenseinek a koncentrációját pontosan, kvantitatívan meghatározni az extrakció során a mérendő komponenssel, jelen esetben a rozmaringsavval együtt a kivonatokba kerülő egyéb komponensek csúcsainak átlapolása miatt.

A 9. ábra a 70:30:1 v/v/v EtOH-H₂O-HCl eleggyel készített folyékony kivonatoknak és a rozmaringsav standard oldatnak a kromatogramjait mutatja az azonosításhoz használt rozmaringsav jellegzetes UV-spektrumának a bemutatásával.



9. ábra A rozmaringsav standard (400 µg/mL) és a Lamiaceae növények HPLC-DAD kromatogramja 330 nm hullámhosszon. Extrakciós körülmények: MACs, 1440 min, szobahőmérséklet

A kromatogramokból egyrészt láthatjuk, hogy a kivatok fő fenolos komponense a Nepetoideae alcsalád kemotaxonómiai markerének tartott rozmaringsav, másrészt, hogy a komponens jól elvált a mintában kisebb mennyiségben megtalálható vegyületektől. A további minőségbiztosítás érdekében a rozmaringsav csúcstisztaságának ellenőrzését is elvégeztem ezáltal megerősítve, hogy a kapott jel a

vegyülettől nem pedig több egymáshoz hasonló komponens csúcsának átlapolásából adódik. Ezen irányú vizsgálatok során míg a standard oldatokban a rozmaringsav csúcstisztasága 0,9966 és 0,9997 között változott, addig a citromfű, a borsosmenta, az orvosi zsálya, a kerti kakukkfű, a rozmaring és a szurokfű esetében rendre a következők voltak: 0,9993, 0,9955, 0,9998, 0,9988, 0,9935 és 0,9975. Mindezen eredményekből következik tehát, hogy az általam alkalmazott kromatográfias módszer a növényi kivonatokban lévő rozmaringsavra nézve szelektívnek tekinthető, ezáltal biztosítva a kvantitatív meghatározásból származó eredmények megfelelőségét.

Az extraktumokban lévő, növényi szárazanyagra vonatkoztatott rozmaringsav mennyiségének (mg/g) meghatározásához külső standard addíciós technikát alkalmaztam a 3.8.1 alfejezetben leírtaknak megfelelően. Az eredmények megadásához használt kalibrációs görbék determinációs együtthatóit (R^2), valamint meredekségeit az 1. táblázatban ismertetem, melyből egyértelműen látszik a módszer linearitása.

1. táblázat Rozmaringsav retenciós ideje, linearitása és meghatározási határa (LOQ) az alkalmazott HPLC-DAD módszer esetében

Fenolos komponens	Retenciós idő (min)	Méréstartomány ($\mu\text{g/mL}$)	Meredekség ($\text{mL}/\mu\text{g}$)	R^2	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Rozmaringsav	20,79	10 - 400	2544	0,9995	6
		10 - 4000	2584	0,9996	

A kvantitatív meghatározás során az etanolos extraktumokból 330 nm-en abszorpció maximummal rendelkező rozmaringsav $20,79 \pm 0,22$ min retenciós idővel detektálható, $6 \mu\text{g/mL}$ LOQ értékkel. Amint azt a 3. táblázat is mutatta a Lamiaceae nemzetség példányai közül míg a szurokfű ($24,1 \pm 5,5 - 40,1 \pm 2,5 \text{ mg/g}$) és a citromfű

($27,2 \pm 1,9 - 30,0 \pm 0,5$ mg/g) esetében tapasztaltam a legnagyobb ($24,1 \pm 5,5 - 40,1 \pm 2,5$ mg/g) rozmaringsav-tartalmat, addig a rozmaring esetében a legkisebbet ($7,4 \pm 0,5 - 9,7 \pm 0,7$ mg/g). Ezen értékekhez viszonyítva, közepes hatóanyag tartalommal rendelkezett az orvosi zsálya ($17,8 \pm 1,7 - 20,1 \pm 0,7$ mg/g), a borsosmenta ($14,6 \pm 1,7 - 16,3 \pm 0,5$ mg/g) és a kerti kakukkfű ($12,8 \pm 1,0 - 15,3 \pm 3,0$ mg/g).

Az ismételhetőség megállapításához három párhuzamos elemzésből számolt RSD% értékeket, valamint a pontosság elemzésére szolgáló %-ban kifejezett visszanyerést a 2. táblázat tartalmazza, melyből látható, hogy az alkalmazott módszer jól reprodukálható és pontos. A hat gyógynövénykivonatban lévő rozmaringsav ismételhetősége ugyanis minden esetben nem nagyobb, mint 1,7 RSD%, a visszanyerés pedig 95,6 és 98,5% közé esett a citromfű (92,3%) és a kerti kakukkfű (93,5%) kivételével.

2. táblázat Az alkalmazott HPLC-DAD módszer ismételhetősége és pontossága hat különböző 1 v/v% HCl-al savanyított EtOH-H₂O eleggyel növényi kivonatokból extrahált rozmaringsav tekintetében

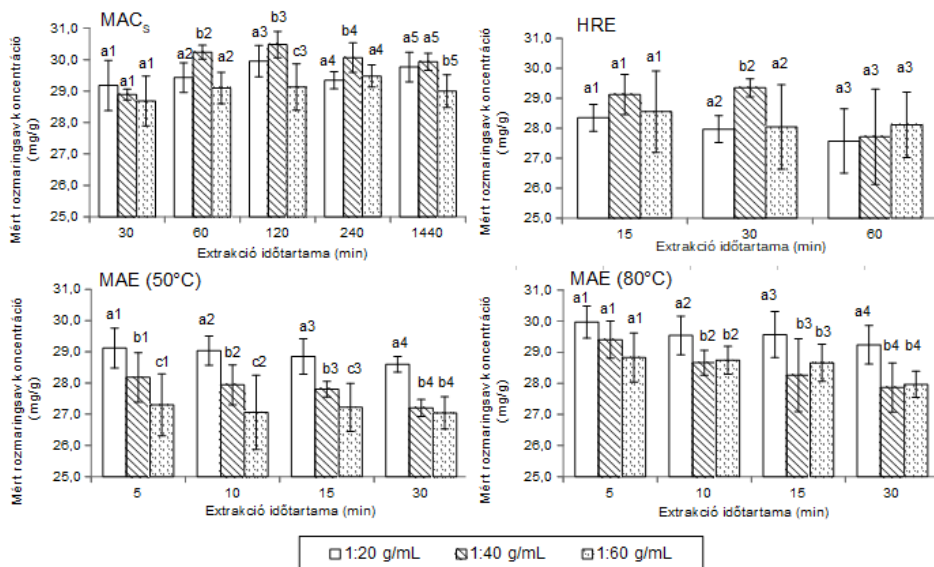
Növény	Ismételhetőség (n=3)		Pontosság			
	Rozmaringsav (mg/g)	RSD (%)	Hozzáadott (mg/g)	Mért (mg/g)	Visszanyerés (%)	RSD (%)
Citromfű	30,2	0,7	31,3	59,1	92,3	2,3
Borsosmenta	16,2	1,1		46,2	95,8	3,6
Szurokfű	40,1	1,7		70,9	98,5	1,8
Rozmaring	9,4	0,5		39,5	96,1	2,8
Orvosi zsálya	20,1	0,2		50,0	95,6	2,6
Kerti kakukkfű	15,1	0,4		44,4	93,5	4,6

4.1.2 Diffúziót befolyásoló paraméterek

Az extrakciós módszerfejlesztés a rozmaringsav diffúzióját befolyásoló paramétereknek nevezetesen a kivonószer savasságának, a kivonószer típusának, az extrakció időtartamának és hőmérsékletének az

optimalásából állt. Ezen paraméterek részletes vizsgálata előtt azonban citromfűvel végzett előkísérletekkel megállapítottam a mintatömeg:kivonószer-térfogat arány és a MAE eljárás során alkalmazott besugárzási energia közelítő hatását, ezáltal elősegítve az eredményeknek az összehasonlíthatóságát.

Ennek szellemében a megfelelő mintatömeg:kivonószer-térfogat arány kiválasztásához a 3.4 fejezetben leírt módon végrehajtott MAC_s, HRE és MAE eljárások esetében 1:20, 1:40 és 1:60 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arányok alkalmazása mellett vizsgáltam a rozmaringsav maximálisan kinyerhető mennyiségét. A 10. ábrán bemutatott eredmények a célvegyület extrakciós hatékonyságának nyilvánvaló növekedését jelezték 60, 120 és 240 perces kezelési időkkel a MAC_s eljárás esetében 1:40 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arány alkalmazása mellett. Ezt a tendenciát a HRE módszernél is tapasztaltam 30 perces extrakciós időtartamnál. Eredményeimből ugyanakkor látható, hogy az alkalmazott mintatömeg:kivonószer-térfogat arányok rövid ideig tartó extrahálás esetén nem növelték az extrakció hatékonyságát, ugyanis míg a MAC_s esetében a 30 perces, addig a HRE eljárásnál a 15 perces kezelési idő nem eredményezett szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,05$). Hasonló tendenciát hosszabb kivonási idők (60 min) mellett is megfigyeltem a HRE esetében, továbbá a MAC_s eljárásnál abban az esetben, amikor a mintatömeg:kivonószer-térfogat arányt 1:20 g/mL-ről 1:40 g/mL-re növeltem.



10. ábra Különböző mintatömeg:kivonószer-térfogat arányok hatása a kioldott rozmaringsav mennyiségre. Mindegyik kivonószer HCl-t (1 v/v%) tartalmazott. A bemutatott adatok átlagértékek \pm 95%-os konfidencia intervallum, $n=3$; a különböző alfanumerikus jelek (a1-a5, b1-b5, c1-c5) szignifikáns különbségeket jelölnek ($p \leq 0,05$)

A 10. ábra továbbá mutatja, hogy 50°C-on a MAE eljárás az 1:20 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arány alkalmazásával a leghatékonyabb, függetlenül az alkalmazott extrakciós időtartamtól. Ugyanez azonban nem mondható el a 80°C-on végzett extrakció esetében, ugyanis az 5 perces kezelési időnél szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) nem volt kimutatható. Hasonló tendenciát, noha kisebb extrakciós hatékonysággal, de az 1:40 g/mL és az 1:60 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arányok alkalmazása mellett is tapasztaltam.

A fentebb bemutatott eredményekből adódóan további kísérleteimnél 1:40 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat aránnyal dolgoztam, hiszen míg a hagyományos extrakciós eljárások esetében (MAC_s, HRE) ezt találtam a leghatékonyabbnak, addig a MAE esetében ezen mintatömeg:kivonószer-térfogat arány alkalmazása mellett a

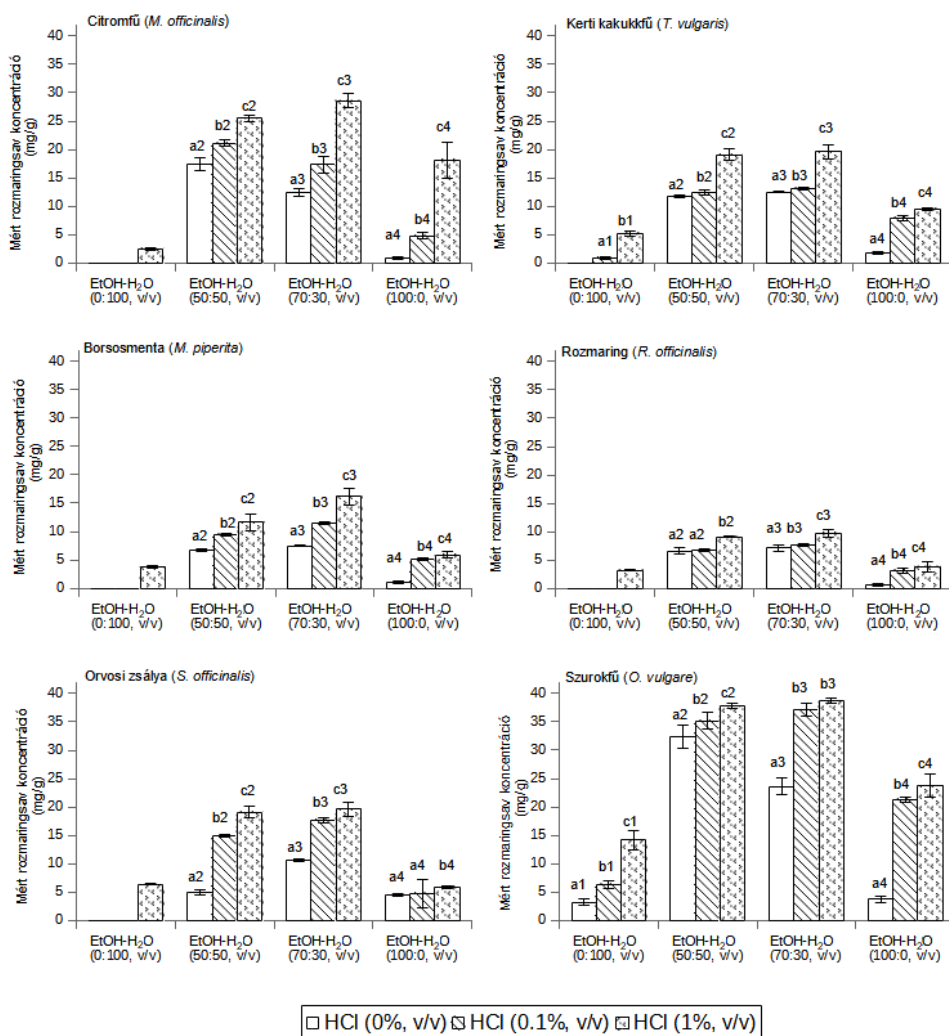
legnagyobb hatóanyag-veszteség, amit tapasztaltam csupán 4,9% volt, azaz még így is 95,1%-os hatékonyságot értem el.

A továbbiakban az alkalmazott mikrohullám hatásának értékelése szempontjából a fentebb ismertetett eredmények alapján 80°C-on végzett, 5 percig tartó kezelésnek 400, 800 és 1600 W-os mikrohullámú teljesítmény alkalmazása mellett kiegészítő kísérleteket végeztem. Ezen eredmények azt mutatták, hogy az alkalmazott mikrohullámú sugárzás teljesítményének növelése negatív hatással van a rozmaringsav kinyerhető mennyiségére. A legjobb hatóanyag kinyerést ($29,4 \pm 1,2$ mg/g) 400 W teljesítmény alkalmazásával kaptam. A magnetron teljesítményének 800, illetve 1600 W-ra való növelése azonban már rendre 10,3% ($26,4 \pm 2,7$ mg/g) és 17,7% ($24,2 \pm 2,7$ mg/g) rozmaringsav veszteséget eredményezett a 400 W-on mért értékhez képest. Ezen jelenség a nagyobb teljesítmény okozta lokális túlmelegedés miatti rozmaringsav bomlással magyarázható.

4.1.2.1 Kivonószer savassága

A MAC_s eljárással előállított folyékony kivonatokban lévő rozmaringsav kinyerhető mennyisége széles tartományban változott az extrakciós eljárás során alkalmazott HCl mennyiségétől (0; 0,1 és 1 v/v%) függően. A meghatározott rozmaringsav-koncentrációkat a 11. ábrán szemléltetem, melyen jól látható, hogy 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 hatóanyag tartalom 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 hatóanyagnak 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.



11. ábra Kivonószer savságának hatása a kioldott rozmaringsav mennyiségre a különböző Lamiaceae fajok esetében. Extrakciós körülmények: MAC_s, 1440 min, szobahőmérséklet. A bemutatott adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum, n=3; a különböző alfanumerikus szimbólumok szignifikáns különbségeket jelölnek (p<0,05)

Noha a legjobb eredményeket az 1 v/v% HCl-el savanyított kivonószer elegyek esetében tapasztaltam, a HCl-nek a 0,1 v/v% koncentrációban való alkalmazása szintén hatással volt a maximálisan kinyerhető rozmaringsav mennyiségére (11. ábra). Azonban ez az extrakciós hatásfok növekedés közel sem akkora, mint az előzőekben bemutatott eredményeknél.

4.1.2.2 Alkalmazott kivonószer típusa

Mivel a fenolos vegyületek extrahálását az alkalmazott kivonószer döntően befolyásolja, vizsgálataim során nagy hangsúlyt fektettem e paraméter helyes megválasztására is, ezáltal hozzájárulva a jobb hatóanyag tartalom kihozatalhoz. Ahogy azt a 3.4 fejezetben is említettem vizsgálataimat az OFAT megközelítés elv alapján végeztem, melyből adódóan 4.1.2.1 alfejezetben bemutatott mérési eredményeket figyelembe véve az elemzéseimhez használt öt EtOH-H₂O és négy MeOH-H₂O elegyet minden esetben 1 v/v% HCl-al savanyítottam.

A különböző kivonószereknek a mért rozmaringsav-koncentrációra gyakorolt hatását a 3. táblázat mutatja. Egyrésztől megfigyelhető, hogy a legtöbb esetben az alkoholok és víz keverékei hatékonyabbnak bizonyultak a hatóanyag extrahálásában, mint tiszta kivonószer-rendszerek, másrésztől pedig, hogy az alkalmazott kivonószer-rendszer-től erősen függött a rozmaringsav kinyerhető mennyisége. A mért rozmaringsav-koncentrációk egyértelműen mutatják, hogy az EtOH-H₂O elegyek szignifikánsan hatékonyabbak ($p \leq 0,05$) a növényekben lévő rozmaringsav kinyerésére, mint a MeOH-H₂O kivonószer rendszerek.

3. táblázat Különböző típusú és összetételű kivonószerek hatása a kioldott rozmaringsav mennyiségre eltérő Lamiaceae fajok esetében

Kivonószer (v/v)	Rozmaringsav-tartalom (mg/g)						
	Citromfű	Borsosmenta	Szurokfű	Rozmaring	Orvosi zsálya	Kerti kakukkfű	
EtOH-H₂O	0:100	2,5±0,2 ^a	3,7±0,2 ^a	14,2±1,7 ^a	3,2±0,2 ^a	6,4±0,2 ^a	5,2±0,5 ^a
	30:70	17,0±1,2 ^b	11,0±2,0 ^b	34,8±1,7 ^b	7,9±0,5 ^b	16,7±0,5 ^b	12,6±0,5 ^b
	50:50	25,5±0,5 ^c	12,6±1,5 ^c	37,8±0,5 ^c	9,1±0,2 ^c	19,1±1,0 ^c	14,1±0,5 ^c
	70:30	28,6±1,2 ^d	16,2±1,5 ^d	38,8±0,5 ^d	9,7±0,7 ^d	19,6±1,2 ^c	14,6±0,5 ^d
	100:0	18,1±3,2 ^b	5,9±0,5 ^e	23,7±2,0 ^e	3,8±1,0 ^a	5,9±0,2 ^d	9,5±0,2 ^e
MeOH-H₂O	30:70	13,8±0,2 ^e	11,6±0,2 ^b	30,6±0,5 ^f	6,6±0,2 ^e	13,9±0,5 ^e	10,8±0,2 ^f
	50:50	20,1±0,5 ^f	11,7±1,0 ^b	37,1±1,7 ^c	8,2±0,2 ^f	14,4±2,0 ^f	13,2±1,0 ^b
	70:30	24,2±1,0 ^g	13,4±0,2 ^c	36,0±1,2 ^c	8,6±0,5 ^g	16,0±1,5 ^b	12,9±0,2 ^b
	100:0	25,3±0,5 ^c	11,5±1,5 ^b	n.d.	n.d.	14,8±3,0 ^f	4,9±1,7 ^a

Mindegyik kivonószer HCl-t (1 v/v%) tartalmazott. A bemutatott adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum; n=3; n.d., nem detektált; a különböző indexek szignifikáns különbségeket jelölnek ($p \leq 0,05$)

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) és a kerti kakukkfű ($14,6 \pm 0,5$ mg/g) esetében a 70:30 v/v EtOH-H₂O elegy alkalmazásával mértem. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy az 50:50 v/v EtOH-H₂O elegy hasonló extrakciós hatásfokot eredményezett, ráadásul a két kivonószer-rendszer között az orvosi zsálya esetében nem találtam szignifikáns különbséget ($p \leq 0,05$). A 3. táblázatból egyúttal látható, hogy a tiszta MeOH alkalmazása során hatóanyag az extraktumban nem volt mérhető mennyiségben, így nem alkalmas a rozmaringban és a szurokfűben lévő rozmaringsav kinyerésére. Előbbi kivonószer azonban a citromfű, a borsosmenta és az orvosi zsálya esetében hatékonyabbnak bizonyult, mint a tiszta EtOH. Eredményeimből továbbá megfigyelhető, hogy a borsosmentánál a 30:70 v/v ($11,6 \pm 0,2$ mg/g) és az 50:50 v/v ($11,7 \pm 1,0$ mg/g) MeOH-H₂O eleggyel extrahálható végső hatóanyag koncentráció megegyezett a 30:70 v/v EtOH-H₂O elegy ($11,0 \pm 2,0$ mg/g) esetében mért értékkel. Ezenfelül hasonló tendenciát tapasztaltam a szurokfű esetében 50:50 v/v EtOH-H₂O ($37,1 \pm 1,7$ mg/g) és MeOH-H₂O elegy ($37,8 \pm 0,5$ mg/g) alkalmazása mellett, illetve a citromfűnek a tiszta MeOH ($25,3 \pm 0,5$ mg/g) és az 50:50 v/v EtOH-H₂O eleggyel ($25,5 \pm 0,5$ mg/g) történő extrakciója során.

A kivonószer helyes megválasztása folyamán fontos, hogy figyelembe vegyük az alkalmazott extrakciós eljárást is. Mivel a növényekben lévő hatóanyag kinyeréséhez nemcsak a MACs eljárás hatékonyságát vizsgáltam, hanem a HRE és a MAE módszereket is, tanulmányaim során citromfűvel ellenőriztem, hogy a kivonószerként

alkalmazott egyes oldószerrendszerek hogyan hatnak az említett extrakciós módszerek hatásfokára (4. táblázat).

4. táblázat Különböző összetételű kivonószerek alkalmazásával nyert rozmaringsav-koncentrációk

Kivonószer (v/v)	Rozmaringsav-koncentráció (mg/g)				
	MAC _s (25°C)	HRE (f.p.)	MAE (50°C)	MAE (80°C)	
EtOH-H₂O	0:100	2,5±0,2 ^a	12,6±0,5 ^a	13,4±1,0 ^a	12,6±0,5 ^a
	30:70	17,0±1,2 ^b	25,5±0,7 ^b	25,7±0,7 ^b	25,5±0,7 ^b
	50:50	25,5±0,5 ^c	26,4±0,2 ^c	27,3±1,0 ^c	26,4±0,2 ^c
	70:30	28,6±1,2 ^d	27,2±0,7 ^d	27,9±0,7 ^c	27,2±0,7 ^d
	100:0	18,1±3,2 ^b	14,3±0,2 ^e	11,0±0,2 ^d	14,3±0,2 ^e
MeOH-H₂O	30:70	13,8±0,2 ^e	23,0±0,2 ^f	20,7±1,0 ^e	23,0±0,2 ^f
	50:50	20,1±0,5 ^f	25,6±1,0 ^b	15,1±0,7 ^f	25,6±1,0 ^b
	70:30	24,2±1,0 ^g	26,3±0,5 ^c	14,6±0,5 ^f	26,3±0,5 ^c
	100:0	25,3±0,5 ^c	5,1±0,2 ^g	n.d.	5,1±0,2 ^g

Mindegyik kivonószer HCl-t (1 v/v%) tartalmazott. A bemutatott adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum, n=3; n.d., nem detektált; f.p., forráspont; a különböző indexelés szignifikáns különbségeket jelöl (p≤0,05)

A MAC_s-al mért legnagyobb rozmaringsav-tartalmat a 70:30 v/v EtOH-H₂O elegy (28,6 ± 1,2 mg/g) alkalmazásakor kaptam, melyet rendre az 50:50 v/v EtOH-H₂O (25,5 ± 0,5 mg/g), a tiszta MeOH (25,3 ± 0,5 mg/g) és a 70:30 v/v MeOH-H₂O elegy (24,2 ± 1,0 mg/g) követett. A HRE módszer esetében szintén a 70:30 v/v EtOH-H₂O elegyet (27,9 ± 0,2 mg/g) találtam optimálisnak, ugyanakkor az 50:50 v/v EtOH-H₂O (26,1 ± 1,0 mg/g) és MeOH-H₂O (25,9 ± 0,7 mg/g), valamint a 70:30 v/v MeOH-H₂O elegy (26,2 ± 0,7 mg/g) is hatékonynak bizonyult. Ezen eredmények szorosan korreláltak az 50°C-on végzett MAE esetében mért értékekkel. Ezzel szemben a 80°C-on kapott eredmények azt mutatják, hogy az 50:50 v/v (27,3 ± 1,0 mg/g) és a 70:30 v/v (27,9 ± 0,7 mg/g) EtOH-H₂O eleggyel extrahálható rozmaringsav mennyiségében nincs szignifikáns különbség, a metanolos

kivonószerrendszerek esetében pedig csak a 30:70 v/v MeOH- H₂O elegy ($20,7 \pm 1,0$ mg/g) eredményezett elfogadható hatóanyag mennyiséget.

A fentebb bemutatott eredményeket és tényezőket figyelembe véve további kísérleteimhez 70:30:1 v/v/v EtOH-H₂O-HCl elegyet használtam.

4.1.2.3 Extrakció időtartama és hőmérséklete

Mivel a hagyományos, kevertetés nélküli macerációs eljárás legfőbb hátránya a hosszú extrakciós idő, mely akár 7 napot is igénybe vehet, vizsgálataim során a módszert és a rázás technikáját kombináltam, ezáltal elősegítve a maximálisan kinyerhető hatóanyag eléréshez szükséges extrakciós idő csökkenését. Ahogy azt az 5. táblázat is mutatja ezen 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. Vizsgálataim során a hatóanyag kinyerésének maximalizálása céljából olyan extrakciós módszereket is bevontam, mint a HRE, vagy MAE, hiszen számos kutató hatékonyabbnak tartja ezen eljárásokat a gyógynövényekben lévő fenolos komponensek kinyerésére. Mindezek ellenére eredményeim ezt az állítást több esetben cáfolják. A borsosmentában lévő, 30 perces kezelési idővel maximálisan kinyerhető rozmaringsav tekintetében, ugyanis az alkalmazott MAC_s ($15,0 \pm 0,2$ mg/g), HRE ($15,3 \pm 0,2$ mg/g) és 80°C-on végzett MAE ($14,7 \pm 1,0$ mg/g) módszerek nem eredményeztek statisztikailag szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,05$), de ugyanez elmondható a kerti kakukkfű esetében is.

5. táblázat Extrakciós idő és hőmérséklet hatása a kioldott rozmaringsav mennyiségre különböző Lamiaceae fajok és extrakciós eljárások esetében

Extrakciós eljárás	Extrakció időtartama (min)	Rozmaringsav-koncentráció (mg/g)					
		Citromfű	Borsosmenta	Szurokfű	Rozmaring	Orvosi zsálya	Kerti kakukkfű
MACs (25°C)	30	28,9±0,2 ^a	15,0±0,2 ^a	34,3±1,0 ^a	8,0±0,2 ^a	19,9±1,0 ^a	14,8±0,5 ^a
	60	29,7±1,5 ^b	16,1±1,0 ^b	36,1±1,5 ^b	8,7±0,5 ^b	19,7±0,2 ^a	14,4±0,5 ^a
	120	30,0±0,5 ^b	16,2±1,5 ^b	36,4±1,0 ^b	9,2±0,5 ^b	19,6±0,7 ^a	14,7±0,2 ^a
	240	29,8±0,5 ^b	16,3±0,5 ^b	36,8±0,5 ^b	9,4±0,2 ^c	20,1±0,7 ^a	14,8±0,2 ^a
	1440	28,6±1,2 ^a	16,2±1,5 ^b	38,8±0,5 ^c	9,7±0,7 ^c	19,6±1,2 ^a	14,6±0,5 ^a
HRE (f.p.)	15	28,4±0,5 ^a	15,0±2,0 ^a	40,1±2,5 ^c	8,7±0,2 ^b	18,5±0,2 ^b	15,3±3,0 ^a
	30	28,0±0,5 ^c	15,3±0,2 ^a	39,5±2,7 ^c	8,2±0,7 ^a	18,3±0,7 ^b	13,5±1,0 ^b
	60	27,2±2,0 ^c	14,6±0,2 ^a	39,5±3,2 ^c	7,4±0,5 ^d	16,0±3,2 ^c	12,8±1,0 ^b
MAE (50°C)	5	27,3±1,0 ^c	14,9±0,5 ^a	38,7±1,7 ^c	8,9±0,2 ^b	19,4±0,5 ^a	14,8±0,5 ^a
	10	27,6±2,2 ^c	16,1±0,5 ^b	37,1±1,2 ^b	9,0±1,2 ^b	19,2±1,0 ^a	14,6±1,0 ^a
	15	27,8±0,2 ^c	16,0±0,7 ^b	37,4±1,5 ^b	8,9±0,5 ^b	19,5±1,2 ^a	14,8±0,5 ^a
	30	27,2±0,7 ^c	15,9±0,5 ^b	37,1±1,0 ^b	9,2±0,2 ^b	19,4±0,5 ^c	14,8±0,7 ^a
MAE (80°C)	5	29,4±1,2 ^b	15,0±0,5 ^a	36,5±2,7 ^b	9,4±0,2 ^c	19,9±1,5 ^a	15,2±0,2 ^a
	10	28,7±0,5 ^a	15,0±3,2 ^a	34,4±2,7 ^a	9,1±0,5 ^b	19,7±0,2 ^a	14,6±0,7 ^a
	15	28,3±1,2 ^a	14,6±1,7 ^a	32,0±2,5 ^d	9,0±0,5 ^b	19,1±0,5 ^a	14,6±0,2 ^a
	30	27,9±0,7 ^c	14,7±1,0 ^a	24,1±5,5 ^e	8,4±0,5 ^a	17,8±1,7 ^b	14,2±0,2 ^a

Alkalmazott kivonószer: EtOH-H₂O-HCl (70:30:1 v/v/v); A bemutatott adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum, n=3; f.p., forráspont; a különböző indexek szignifikáns különbségeket jelölnek (p≤0,05)

Az 5. táblázat eredményeiből továbbá látható, hogy a MAC_S eljárás során kapott legjobb hatóanyag-tartalom kihozatalt eredményező kivonási időknél a HRE és a MAE technikákkal való összehasonlítása esetén a szurokfű kivételével a MAC_S, vagy a MAE módszerek alkalmazásával érhető el legjobb kihozatal. Ezen összehasonlító vizsgálatok esetében ugyanis a citromfűben, a kerti kakukkfűben és az orvosi zsályában található rozmaringsav kinyerhető mennyiségének tekintetében hasonló eredményeket tapasztaltam a MAC_S eljárásnak a 60 és 120 perces, illetve a 80°C-on, 5 perces tartó MAE során. Mindezek mellett 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 hőmérsékletek, 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, azaz 34,0%-os veszteséget tapasztaltam. Ugyanezen eljárásnál továbbá 1,5 mg/g (5,0%) és 2,1 mg/g (10,6%) csökkenést konstataáltam rendre a citromfű és az orvosi zsálya esetében is. Ezen utóbbi növénynél a rozmaringsavnak hasonló mértékű (2,5 mg/g, 13,6%) bomlását a HRE módszer esetében is megfigyeltem, abban az esetben amikor a 15 perces kezelési időt 30 percre növeltem. Ez a tendencia szintén 2,5 mg/g hatóanyag veszteséggel (16,0%) a kerti kakukkfű esetében is megfigyelhető. A MAE módszernél

alkalmazott két hőmérséklet eredményeinek összehasonlítása során azonban több gyógynövénynél is jobb rozmaringsav kihozatalt tapasztaltam nagyobb hőmérséklet, azaz 80°C alkalmazása mellett. A citromfűnél például a termikus bomlás ellenére 80°C-on nagyobb kihozatalt sikerült elérnem 5 ($29,4 \pm 1,2$ mg/g), 10 ($28,7 \pm 0,5$ mg/g) és 15 ($28,3 \pm 1,2$ mg/g) perces kezelési időkkel, mint 50°C-on az összes alkalmazott kivonási idők esetében ($27,2 \pm 0,7$ mg/g – $27,5 \pm 0,7$ mg/g). Ez a tendencia a rozmaring esetében is megfigyelhető.

4.2 TINKTÚRÁK

4.2.1 Kvalitatív és kvantitatív elemzés

A tinktúrák kvalitatív és kvantitatív vizsgálatát az extrakciós módszerfejlesztésnél bemutatottakkal összhangban végeztem. Ennek megfelelően a teljesítményjellemzők elemzése során kapott eredmények a rozmaringsav tekintetében konszenzusban voltak a 4.1.1 fejezetben leírtakkal, azaz sem a szelektivitást, sem a linearitást és ismételhetőséget illetően nem tapasztaltam olyan mértékű eltérést, mely ezen eredményeknek újbóli szemléltetését (ismétlését) követelné meg.

A rozmaringsav „természetéből” adódóan a tinktúrák eltarthatósági vizsgálata során a kávésav alakulását is nyomon követtem. Ebből adódóan ezen komponensre nézve szintén meghatároztam az alkalmazott HPLC-s módszerem teljesítményjellemzőit.

A megfelelő szelektivitást a kávésav tekintetében ugyancsak igazoltam, a 12. ábrából ugyanis látható, hogy zavarásmentesen volt mérhető, ráadásul mind a standard oldatban (0,9998) mind a tinktúrákban mért csúcstisztaságára vonatkozó értékek (0,9938-0,9991) megfeleltek az elvárt követelményeknek.

A tinktúrák kávésav mennyiségének meghatározásához a rozmaringsavnál is használt külső standard addíciós technikát alkalmaztam. A 2-100 µg/mL koncentráció tartományban 7 ponton felvett kalibrációs egyenes meredeksége 4723 mL/µg, determinációs együtthatója pedig 0,9998 volt, ezáltal jelezve a megfelelő érzékenységet és linearitást. A kávésav eluálódási ideje 14,33 min, meghatározási határa pedig 2 µg/mL volt a vizsgált körülmények között.

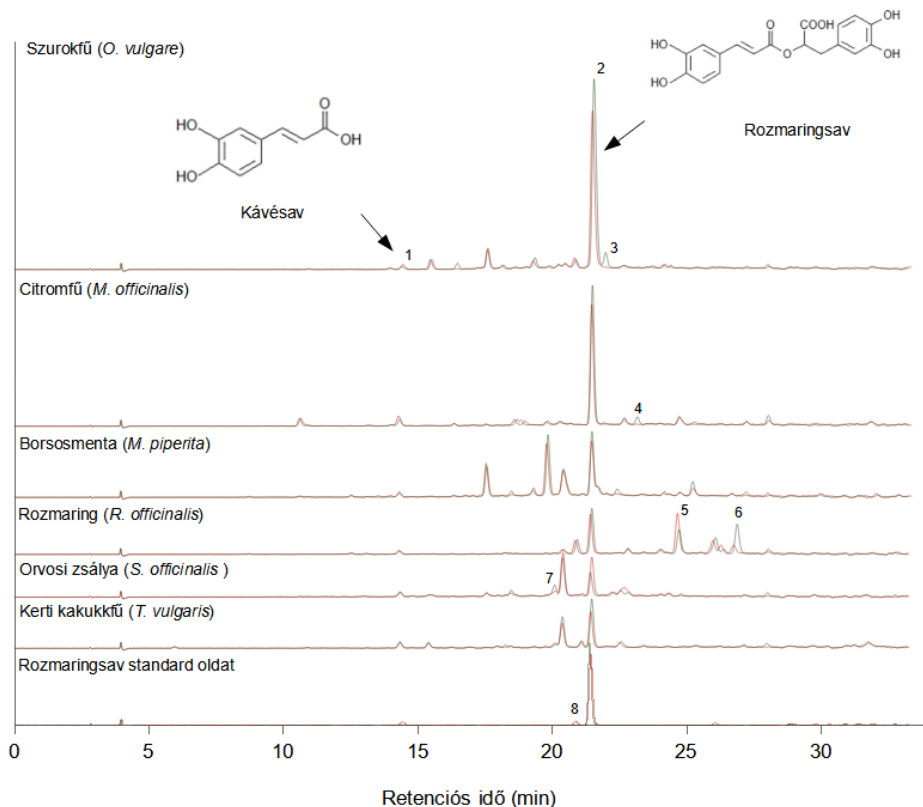
Az ismételhetőségre és a pontosságra vonatkozó adatokat a 6. táblázat mutatja. Ezen eredményekből látható, hogy az alkalmazott módszer jól reprodukálható és pontos, ugyanis míg a hat gyógynövény tinktúrában lévő kávésav ismételhetősége 0,6 és 2,8 RSD%, addig százalékban kifejezett visszanyerése 94,2 és 103,8% között változott.

6. táblázat HPLC-DAD módszer ismételhetősége és pontossága hat különböző 50:50 v/v EtOH-H₂O eleggyel extrahált növényi kivonatokban lévő kávésavra

Tinktúra	Ismételhetőség (n=3)		Pontosság			
	Kávésav (µg/mL)	RSD (%)	Hozzáadott (µg/mL)	Mért (µg/mL)	Visszanyerés (%)	RSD (%)
Citromfű	22,31	0,6		37,87	103,8	3,2
Borsosmenta	13,65	1,2		28,48	97,3	3,8
Szurokfű	11,68	1,8	15,0	26,16	96,5	4,8
Rozmaring	11,58	2,8		26,20	97,4	2,9
Orvosi zsálya	17,41	0,9		31,54	94,2	3,6
Kerti kakukkfű	20,59	1,2		34,90	95,4	2,6

A tinktúrák és a rozmaringsav standard kezdeti kromatográfias profiljának változását a 168. naphoz képest a 12. ábra mutatja. A rozmaringsav standardnál jól megfigyelhető, hogy a vegyület csupán egy része redukálódik kávésavvá, hiszen a kromatogramban egy másik, 8-as számmal jelölt ismeretlen csúcs is megjelent. A tinktúrák kromatogramjaiból látható továbbá, hogy míg a rozmaringsav bomlása az

orvosi zsályánál, addig a kávésav növekedése a citromfűnél a legszembetűnőbb.



12. ábra Tinktúrák és a rozmaringsav standard (500 µg/mL) oldat kezdeti (sötétzöld) és utolsó napon (piros) kapott HPLC-kromatogramjainak eltérései 330 nm hullámhosszon

A kromatográfiai profilok kvalitatív elemzése során ugyanakkor néhány azonosítatlan csúcs nagyobb mértékű változását is megállapítottam. Például a 3-, 4- és 6-os számú ismeretlen csúcsok csúcs alatti területeinek csökkenése rendre megfigyelhetők a szurokfűnél, a citromfűnél és a rozmaringnál. Egyes esetekben azonban épp az ellenkezőjét tapasztaltam, hiszen ahogy az a 12. ábrán is látható a rozmaring (5-ös csúcs) és az orvosi zsályá (7-es csúcs) esetében bizonyos csúcsoknál a csúcs alatti terület jelentős növekedését figyeltem meg. Az 1

és 2-es számmal jelölt, azonosított kávésav és rozmaringsav csúcsoknak a tárolás során bekövetkező mM/mL egységben kifejezett kvantitatív változását a 4.2.3 alfejezetben tárgyalom.

A kromatogramok kvalitatív elemzése alapján összességében elmondható, hogy a tinktúrák fő összetevője a szurokfű, a citromfű, a rozmaring és a kerti kakukkfű esetében a rozmaringsav; ezáltal bizonyítva, hogy kiválóan alkalmazható, mint az eltarthatósági vizsgálatok marker komponense.

4.2.2 Termékfejlesztés

Mivel a tinktúrák előállításánál a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv olyan etanolt, vagy egyéb emberi egészséget nem veszélyeztető kivonószerek használatát írja elő, melyek megfelelnek a Gyógyszerkönyv vonatkozó cikkelyében előírt követelményeknek, vizsgálataim során a legjobb rozmaringsav-tartalmat eredményező 70:30:1 v/v/v EtOH-H₂O-HCl eleggyel (pH= 1,4) extrahált kivonat (pH= 3,2) HCl tartalmának semlegesítésére törekedtem. Mivel azonban a szódabikarbónával történő semlegesítést követően minden esetben több, mint 40%-os hatóanyag veszteséget tapasztaltam arra a döntésre jutottam, hogy ezen plusz előállítási lépésnek, s egyben költségnek a beiktatása elhanyagolható. Ennek következtében a tinktúrák előállításához az alkalmazott kivonószert HCl-el nem savanyítottam. A 11. ábrán (4.1.2.1 fejezet) látható, hogy savanyítás nélkül a legjobb hatóanyag tartalmat az 50:50 v/v EtOH-H₂O és a 70:30 v/v EtOH-H₂O elegyek eredményezték. Mivel azonban az orvosi zsálya kivételével ezen két bináris kivonószerszám hasonló rozmaringsav hozamot eredményezett, ráadásul a citromfű és a szurokfű esetében az 50:50 v/v EtOH-H₂O elegy hatékonyabbnak bizonyult, az

eltarthatósági vizsgálatokhoz tinktúráimat ezen kivonószer eleggyel készítettem el.

4.2.3 Eltarthatósági vizsgálat

4.2.3.1 A rozmaringsav és a kávésav stabilitása

A 168 napos tárolás hatását az egyes növényi tinktúrák mM/mL-ben kifejezett rozmaringsav és kávésav tartalmának mennyiségére, illetve változására (Δ), továbbá százalékban (%) kifejezett bomlási értékére a 7. táblázat tartalmazza. Az adatokat elemezve egyrészt jól látszik, hogy az azonosított fenolos vegyületek kezdeti és végkoncentrációjában jelentős eltérések mutatkoztak másrészt, hogy minden esetben 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 növekedést 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 (7. táblázat). Ebben az esetben azonban jóval kisebb bomlási értékeket figyeltem meg, ráadásul a hat hónapos tárolási időszak alatt a rozmaringsav bomlásának értéke nem haladta meg a 10%-os elfogadhatósági szintet sem.

7. táblázat Rozmaringosav stabilitása szobahőmérsékleten 168 napos tárolás során hat Lamiaceae tinktúrában és standard oldatban

Növény/standard	Tárolási idő (nap)	Kávésav			Rozmaringosav		
		mM/mL	Δc (mM/mL)	Bomlás (%)	mM/mL	Δc (mM/mL)	Bomlás (%)
Citromfű	0	0,135 ± 0,021 ^a	-	-	2,398 ± 0,032 ^a	-	-
	27	0,160 ± 0,005 ^b	0,025	-27,0	2,224 ± 0,015 ^b	-0,174	7,2
	55	0,171 ± 0,005 ^c	0,036	-18,8	2,011 ± 0,061 ^c	-0,387	16,1
	86	0,190 ± 0,007 ^d	0,055	-40,8	2,015 ± 0,080 ^c	-0,383	16,0
	113	0,189 ± 0,002 ^d	0,054	-40,4	2,007 ± 0,007 ^c	-0,391	16,3
	141	0,208 ± 0,002 ^e	0,073	-54,4	1,985 ± 0,025 ^d	-0,413	17,2
	168	0,208 ± 0,002 ^e	0,073	-54,8	1,985 ± 0,021 ^d	-0,413	17,2
Borsosmenta	0	0,079 ± 0,002 ^a	-	-	1,150 ± 0,022 ^a	-	-
	27	0,096 ± 0,007 ^b	0,017	-21,8	1,093 ± 0,005 ^b	-0,057	5,0
	55	0,098 ± 0,002 ^b	0,019	-23,5	1,057 ± 0,007 ^c	-0,093	8,1
	86	0,101 ± 0,002 ^c	0,022	-27,4	1,043 ± 0,005 ^d	-0,107	9,4
	113	0,103 ± 0,005 ^c	0,024	-30,5	1,029 ± 0,011 ^e	-0,121	10,5
	141	0,108 ± 0,002 ^d	0,029	-36,1	1,014 ± 0,035 ^e	-0,136	11,9
	168	0,109 ± 0,002 ^d	0,030	-37,9	0,968 ± 0,027 ^f	-0,182	15,8

7. táblázat (folytatás-1)

Növény/standard	Tárolási idő (nap)	Kávésav			Rozmaringsav		
		mM/mL	Δc (mM/mL)	Bomlás (%)	mM/mL	Δc (mM/mL)	Bomlás (%)
Szurokfű	0	0,074 ± 0,015 ^a	-	-	3,808 ± 0,110 ^a	-	-
	27	0,096 ± 0,011 ^b	0,022	-29,4	3,451 ± 0,041 ^b	-0,357	9,4
	55	0,100 ± 0,007 ^c	0,026	-33,8	3,358 ± 0,037 ^c	-0,450	11,8
	86	0,104 ± 0,007 ^c	0,030	-40,1	3,329 ± 0,099 ^c	-0,479	12,6
	113	0,106 ± 0,002 ^c	0,032	-42,4	3,312 ± 0,015 ^c	-0,496	13,0
	141	0,107 ± 0,002 ^c	0,033	-42,4	3,240 ± 0,027 ^d	-0,568	14,9
	168	0,112 ± 0,005 ^d	0,038	-50,6	3,180 ± 0,089 ^e	-0,628	16,5
Rozmaring	0	0,065 ± 0,005 ^a	-	-	0,810 ± 0,015 ^a	-	-
	27	0,077 ± 0,005 ^b	0,012	-16,9	0,766 ± 0,005 ^b	-0,044	5,4
	55	0,076 ± 0,005 ^b	0,011	-15,7	0,744 ± 0,012 ^c	-0,066	8,1
	86	0,075 ± 0,002 ^b	0,010	-14,4	0,728 ± 0,021 ^d	-0,082	10,1
	113	0,077 ± 0,002 ^b	0,012	-17,8	0,729 ± 0,007 ^d	-0,081	10,0
	141	0,078 ± 0,005 ^b	0,013	-18,2	0,710 ± 0,007 ^e	-0,100	12,4
	168	0,080 ± 0,005 ^b	0,015	-21,6	0,696 ± 0,021 ^e	-0,114	14,1
Orvosi zsálya	0	0,103 ± 0,007 ^a	-	-	0,693 ± 0,007 ^a	-	-
	27	0,108 ± 0,005 ^b	0,005	-5,4	0,646 ± 0,005 ^b	-0,047	6,8
	55	0,110 ± 0,005 ^b	0,007	-7,0	0,491 ± 0,012 ^c	-0,202	29,1
	86	0,114 ± 0,007 ^b	0,011	-11,4	0,469 ± 0,005 ^d	-0,224	32,3
	113	0,124 ± 0,005 ^c	0,021	-21,0	0,463 ± 0,011 ^d	-0,230	33,2
	141	0,128 ± 0,005 ^d	0,025	-25,1	0,450 ± 0,007 ^e	-0,243	35,0
	168	0,131 ± 0,005 ^d	0,028	-27,0	0,406 ± 0,005 ^f	-0,287	41,4

7. táblázat (folytatás-2)

Növény/standard	Tárolási idő (nap)	Kávésav			Rozmaringosav		
		mM/mL	Δc (mM/mL)	Bomlás (%)	mM/mL	Δc (mM/mL)	Bomlás (%)
Kerti kakukkfű	0	0,117 ± 0,002 ^a	-	-	0,861 ± 0,017 ^a	-	-
	27	0,129 ± 0,012 ^b	0,012	-9,5	0,762 ± 0,017 ^b	-0,099	11,5
	55	0,130 ± 0,005 ^b	0,013	-10,4	0,659 ± 0,015 ^c	-0,202	23,5
	86	0,130 ± 0,002 ^b	0,013	-11,1	0,659 ± 0,015 ^c	-0,202	23,4
	113	0,130 ± 0,005 ^b	0,013	-11,1	0,658 ± 0,005 ^c	-0,203	23,6
	141	0,133 ± 0,007 ^b	0,016	-13,5	0,653 ± 0,021 ^c	-0,208	24,2
	168	0,141 ± 0,007 ^c	0,024	-19,7	0,623 ± 0,007 ^d	-0,238	27,6
	Rozmaringosav	0	<LOQ	-	-	1,333 ± 0,015 ^a	-
27		0,015 ± 0,015 ^a	0,015	-15,0	1,292 ± 0,021 ^b	-0,041	3,1
55		0,017 ± 0,011 ^a	0,017	-17,2	1,262 ± 0,015 ^c	-0,071	5,3
86		0,028 ± 0,015 ^b	0,028	-28,4	1,238 ± 0,022 ^d	-0,100	7,1
113		0,037 ± 0,012 ^b	0,037	-37,1	1,225 ± 0,015 ^d	-0,105	8,1
141		0,049 ± 0,015 ^c	0,049	-49,2	1,214 ± 0,011 ^e	-0,119	8,9
168		0,057 ± 0,022 ^c	0,057	-57,1	1,205 ± 0,015 ^e	-0,128	9,6

A bemutatott adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum, n=3; a különböző felső indexek szignifikáns különbségeket jelölnek ($p \leq 0,05$); Δc , koncentráció változás

A 7. táblázatból egyúttal látható, hogy a rozmaringsav-koncentrációjának viszonylag gyors kezdeti változását egy stagnáló fázis, majd egy enyhe bomlási szakasz követte. Ez a stagnálás a szurokfű, a citromfű és a kerti kakukkfű esetében 55, a rozmaring és az orvosi zsálya esetében pedig 86, míg a borsosmentánál 113 nap elteltével figyelhető meg. Noha a kávésav mennyiségének növekedése esetében hasonló tendenciák szintén felfedezhetők, nem találtam lineáris kapcsolatot a rozmaringsav bomlásának mértéke és a kávésav koncentrációjának növekedése között.

4.2.3.2 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 (orvosi zsálya), illetve $93,4 \pm 5,5$ mg GAE/g (szurokfű) között változott, mely több, mint 2,7-szeres különbséget jelent a legkisebb és a legnagyobb érték között (8. táblázat).

A 168 napos tárolási kísérlet során a rozmaringsav és a kávésav mennyiségi változásához hasonlóan az összes polifenol-tartalom alakulását is nyomon követtem. Eredményeimből azonban látható, hogy e tekintetben jelentős változásokat nem tapasztaltam. A tárolási idő ugyanis nem befolyásolta szignifikánsan ($p \leq 0,05$) a szurokfű és a kerti kakukkfű összes polifenol-tartalmát. Ugyanakkor, míg a rozmaring (11,6%), a borsosmenta (7,9%) és a citromfű (7,6%) esetében kisebb mértékű növekedést, addig az orvosi zsályánál épp az ellenkezőjét, azaz 7,8%-os csökkenést figyeltem meg.

8. táblázat Standardok és tinktúrák összes polifenol-tartalma és antioxidáns aktivitása

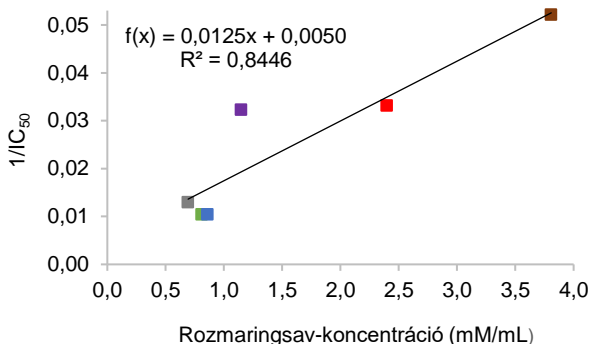
Tinktúra/Standard	Összes polifenol (mg GAE/g)		Antioxidáns aktivitás				
	0. nap	168. nap	Gátlás (%)		IC ₅₀ (µg/mL)	1/IC ₅₀	mg AAE/g
			0. nap	168. nap			
Citromfű	66,2 ± 4,2 ^a	71,2 ± 1,5 ^f	33,0 ± 9,4 ^{a*}	31,1 ± 7,7 ^{a*}	30,2	0,033	132
Borsosmenta	65,8 ± 3,0 ^a	70,9 ± 1,2 ^f	32,7 ± 6,0 ^{a*}	31,5 ± 9,2 ^{a*}	31,0	0,032	128
Szurokfű	93,4 ± 5,5 ^b	91,2 ± 5,5 ^b	39,0 ± 6,0 ^{b*}	38,3 ± 5,2 ^{b*}	19,2	0,052	207
Rozmaring	38,8 ± 1,0 ^c	43,3 ± 3,2 ^g	56,1 ± 7,0 ^c	65,1 ± 6,4 ^c	96,2	0,010	41,3
Orvosi zsálya	34,1 ± 2,7 ^d	31,4 ± 2,2 ^h	48,8 ± 3,5 ^d	49,2 ± 5,2 ^d	77,2	0,013	51,4
Kerti kakukkfű	49,2 ± 2,7 ^e	50,0 ± 3,0 ^e	58,4 ± 4,2 ^c	58,9 ± 5,7 ^c	96,0	0,010	41,4
L-askorbinsav	-	-	-	-	3,97	0,250	1000
Rozmaringsav	-	-	-	-	4,02	0,250	988
Kávésav	-	-	-	-	4,24	0,238	936

A bemutatott összes polifenol és antioxidáns gátlás adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum, n=3; a különböző indexek szignifikáns különbségeket jelölnek (p≤0,05); *, 20-szorosan hígított minták; GAE, galluszsav egyenérték; AAE, aszkorbinsav egyenérték

A DPPH módszerrel meghatározott antioxidáns kapacitás értékeket szintén a 8. táblázat tartalmazza, melyből látható, hogy a tinktúrák jóval kisebb mértékű ($IC_{50} \geq 19,2 \mu\text{g/mL}$) 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 aktivitást a legnagyobb összes polifenol és rozmaringsav-tartalommal rendelkező szurokfű ($IC_{50} = 19,2 \mu\text{g/mL}$), míg a legkisebbeket a közel azonos mennyiségű rozmaringsavat tartalmazó rozmaring ($IC_{50} = 96,2 \mu\text{g/mL}$) és a kerti kakukkfű ($IC_{50} = 96,0 \mu\text{g/mL}$) esetében mértem. Az orvosi zsálya ($IC_{50} = 77,2 \mu\text{g/mL}$) szintén gyengébb antioxidáns aktivitást mutatott, ugyanakkor a citromfűnél ($IC_{50} = 30,2 \mu\text{g/mL}$) és a borsosmentánál ($IC_{50} = 31,0 \mu\text{g/mL}$) mért értékek jó antioxidáns tulajdonságokra utalnak.

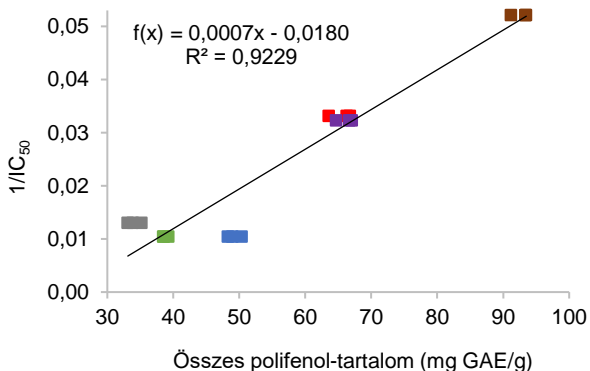
A tinktúrák és a standard vegyületek L-aszkorbinsav ekvivalensben kifejezett értékét a 8. táblázatban szintén feltüntettem. Vizsgálataim során továbbá az összes polifenol-tartalomhoz hasonlóan a %-ban kifejezett antioxidáns tulajdonságok változását is nyomon követtem. Ehhez míg a szurokfű, a citromfű és a borsosmenta tinktúrákat 20-szorosan, addig a rozmaring, az orvosi zsálya és a kerti kakukkfűkivonatokat 5-szörösen hígítottam 50:50 v/v EtOH-H₂O elegy alkalmazásával. Ezen irányú vizsgálataim során azonban szintén nem találtam jelentős változásokat, ugyanis a rozmaring tinktúra kivételével egyetlen esetben sem találtam szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbségeket (8. táblázat).

Vizsgálataim továbbá rávilágítottak arra a tényre is, hogy az antioxidáns aktivitás 84,5%-ban a rozmaringsavnak tulajdonítható (13. ábra).



13. ábra Lamiaceae családba tartozó növényekből készült tinktúrák $1/IC_{50}$ értékének függése a rozmaringosav-koncentrációtól. A különböző színek a szurokfűvet (barna), a citromfűvet (piros), a borsosmentát (lila), az orvosi zsályát (szürke), a rozmaringot (zöld) és a kerti kakukkfűvet (kék) jelölik

A fennmaradó 15,5% egy része feltételezhetően más fenolos vegyületeknek tudható be, melyet a 14. ábra is bizonyít, ugyanis meglehetősen nagy korrelációt (92,3%) tapasztaltam az antioxidáns aktivitás és a különböző tinktúrák összes polifenol-tartalma között.



14. ábra Lamiaceae családba tartozó növényekből készült tinktúrák $1/IC_{50}$ értékének függése azok összes polifenol-tartalmától. A különböző színek a szurokfűvet (barna), a citromfűvet (piros), a borsosmentát (lila), az orvosi zsályát (szürke), a rozmaringot (zöld) és a kerti kakukkfűvet (kék) jelölik

Ugyanakkor ezen ábrán az is látható, hogy míg a szurokfű, a citromfű, a borsosmenta és a rozmaring főként a fenolos vegyületeknek köszönheti

antioxidáns tulajdonságait, addig az orvosi zsálya és a kerti kakukkfű ezen sajátossága egyéb antioxidáns hatású másodlagos metabolitokkal is összefüggésben lehet.

4.3 ADALÉKOLT ÉTCSOKOLÁDÉ

4.3.1 Termékfejlesztés

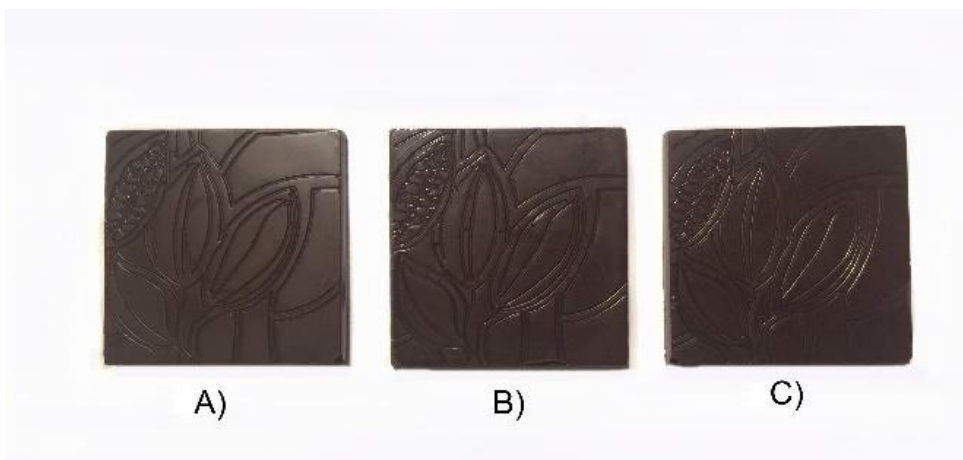
A funkcionális élelmiszerként szolgáló, növényi kivonattal adalékolt étcsokoládé előállításának első és egyben legfontosabb lépése a funkcionális összetevőként alkalmazott citromfű száraz kivonatának (*Melissae folii extractum siccum*) az előállítása volt a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph.Hg.VIII., 2010b) és a korábbi eredményeim figyelembevételével (4.1.2 fejezet). A liofilezéssel előállított, 18,63 g ösztömegű, $88,4 \pm 3,7$ mg/g rozmaringsavat tartalmazó, 50:50 v/v EtOH-H₂O elegyben jól oldódó száraz kivonatot a 15. ábra szemlélteti, melyen látható, hogy fizikai tulajdonságai megfeleltek a gyógyszerkönyvi előírásnak (barna, vagy zöldes barna, amorf por).



15. ábra EtOH-H₂O (50:50 v/v) eleggyel készített citromfű kivonatból, vákuum bepárlás és liofilizálás útján előállított szárazkivonat

A kivonat százalékos kitermelése, mely 24,83% volt ($100 \times$ liofilizált minta tömege /extrahálható növény tömege) a liofilizált és porított citromfűkivonat tömegén alapult.

Az adalékolt csokoládé előállítása a száraz kivonat rozmaringsav-tartalmának meghatározását követően a 3.10.2 alfejezetben leírtak szerint valósult meg. Vizsgálataimhoz standard rozmaringsavval adalékolt és kontroll étcsokoládét készítettem (16. ábra).

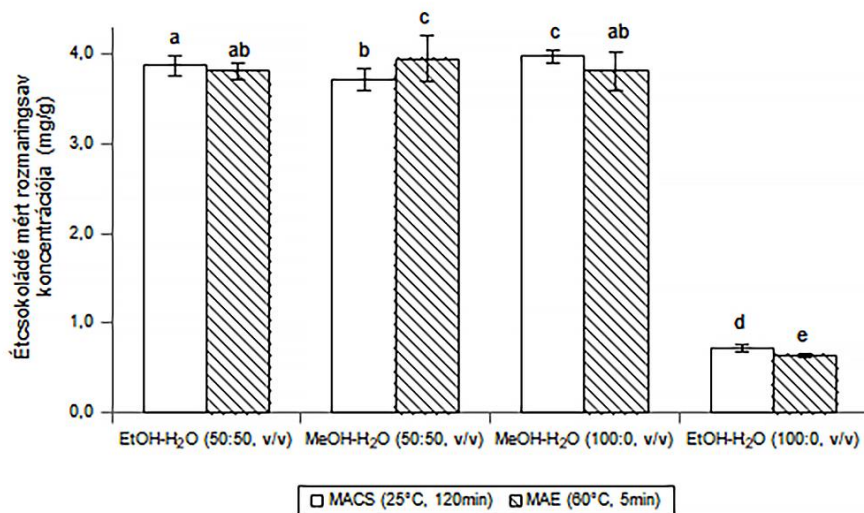


16. ábra Kontroll (A), standard rozmaringsavval (B) és citromfű (C) szárazkivonattal adalékolt étcsokoládé

4.3.2 Extrakciós módszerfejlesztés adalékolt étcsokoládé rozmaringsav-tartalmának kinyerésére

4.3.2.1 Alkalmazott kivonószer típusa

A 17. ábra a MAC_S és a MAE eljárással extrahálható rozmaringsav mennyiségét mutatja különböző típusú és összetételű kivonószer alkalmazás mellett.



17. ábra Különböző típusú és összetételű kivonószerek hatása citromfűvel adalékolt étcsokoládéban mért rozmaringsav-tartalomra. Extrakciós körülmények: MAC_S, 120 min, szobahőmérséklet; MAE, 5 min, 60°C. A bemutatott adatok átlagértékek \pm 95%-os konfidencia intervallum, $n=3$; a különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek ($p \leq 0,05$)

Az ábrán egyrészt látható, hogy a tiszta EtOH kivételével az egyes kivonószerek jó kinyerési hatásfokot eredményeztek másrészt, hogy míg a MAC_S esetében a tiszta MeOH ($3,98 \pm 0,07$ mg/g), addig a MAE-nál az 50:50 v/v MeOH-H₂O ($3,95 \pm 0,25$ mg/g) elegy alkalmazásával mértem a legjobb rozmaringsav kihozattal, mely rendre 5,5- és 6,1-szeres hatóanyag tartalom növekedést jelentett a legkisebb és a legnagyobb mért érték között. A 17. ábrán továbbá megfigyelhető, hogy a MAE esetében az 50:50 v/v EtOH-H₂O ($3,81 \pm 0,17$ mg/g) eleggyel extrahálható végső hatóanyag koncentráció megegyezett a tiszta MeOH ($3,85 \pm 0,10$ mg/g) esetében mért értékkel. A MAC_S eljárásnál hasonló összefüggését nem tapasztaltam, ugyanis az eredmények minden esetben szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,05$) mutattak.

4.3.2.2 Kivonás időtartamának hatása

Mivel a korábbiakhoz hasonlóan méréseimet az OFAT megközelítés elv szerint végeztem, ezen irányú vizsgálataimhoz a MAC_S eljárásnál tiszta MeOH, a MAE extrakciónál pedig 50:50 v/v MeOH-H₂O elegyet használtam. Eredményeimet a 9. táblázatban szemléltetem melyből látható, hogy a kinyerési idő tekintetében hasonló tendenciát tapasztaltam, mint a 4.1.2.3 alfejezetben ismertetett növényi kivonatok esetében, ugyanis míg a hagyományos MAC_S esetében 60 perc, addig a MAE módszernél már 5 perc elteltével kinyerhető az étcsokoládéhoz adalékolt citromfű szárazkivonatban lévő rozmaringsav mennyisége.

9. táblázat Extrakciós idő hatása a kioldott rozmaringsav-tartalomra különböző extrakciós eljárások esetében

Extrakció időtartama (min)	Rozmaringsav-tartalom (mg/g)	Extrakció időtartama (min)	Rozmaringsav-tartalom (mg/g)
	MAC _S		MAE
30	3,74±0,21 ^a	5	3,95±0,12 ^b
60	3,93±0,12 ^b	10	3,98±0,05 ^b
120	3,98±0,07 ^b	15	3,97±0,32 ^b
240	3,81±0,17 ^c	30	3,96±0,35 ^b
1440	3,86±0,10 ^c	-	-

A bemutatott adatok átlagértékek ± 95%-os konfidencia intervallum; a különböző indexek szignifikáns különbségeket jelölnek ($p \leq 0,05$)

A 9. táblázatból látható, hogy a csokoládé mátrixban lévő rozmaringsav extrahálható mennyiségére a kezelés időtartama nincs jelentős hatással, hiszen míg a MAE esetében egyáltalán nem mutatkozott az eredményekben ($3,95 \pm 0,12$ mg/g - $3,98 \pm 0,05$ mg/g) szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$), addig a MAC_S eljárásnál is csupán 6%-os hatóanyag tartalombeli különbség volt kimutatható a legnagyobb ($3,98 \pm 0,07$ mg/g) és a legkisebb ($3,74 \pm 0,20$ mg/g) mért érték között. Eredményeimből

ugyanakkor az is megfigyelhető, hogy a 120 perces MAC_S-el végzett kivonatolás ($3,98 \pm 0,07$ mg/g) ugyanakkora hatóanyag-tartalmat eredményezett, mint a 10 perc ideig tartó MAE ($3,98 \pm 0,05$ mg/g).

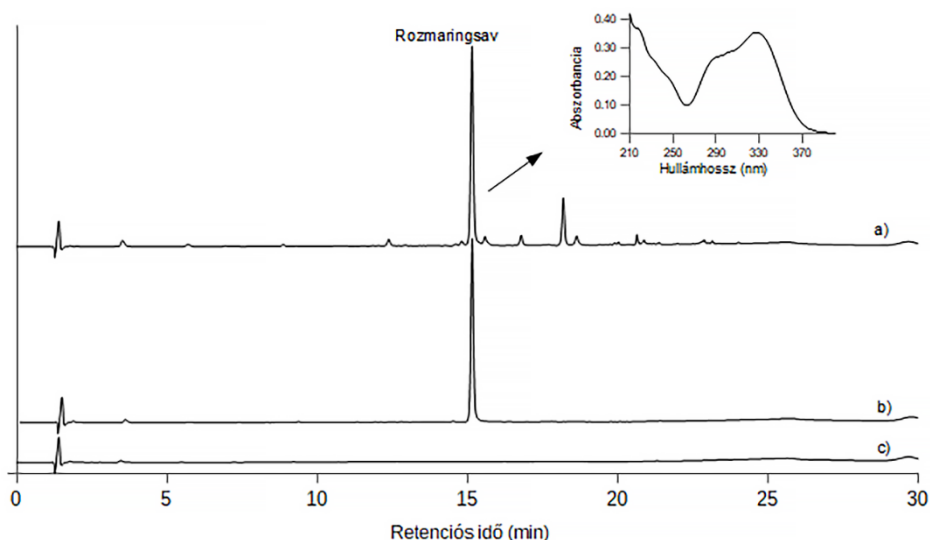
A fentebb és az előző fejezetben bemutatott eredményeket figyelembe véve a standard rozmaringsavval adalékolt és a kontroll csokoládé vizsgálatához a MAC_S és a MAE esetében, rendre tiszta MeOH-t és 120 perces kezelési időt, valamint 50:50 v/v MeOH-H₂O elegyet és 5 perces kivonási időtartamot használtam. A 400 mg standard rozmaringsavat tartalmazó étcsokoládéból (100 g) a hatóanyag maximálisan kinyerhető mennyisége a MAC_S eljárással $3,82 \pm 0,07$ mg/g, a MAE esetében pedig $3,78 \pm 0,07$ mg/g volt.

4.3.3 Folyadékkromatográfiai módszerfejlesztés

A növényi száraz kivonattal adalékolt étcsokoládéból MAC_S és MAE útján kinyert rozmaringsav analízisére fordított fázisú, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (RP-HPLC) eljárást dolgoztam ki és validáltam, egy 150 mm hosszú, 3 mm átmérőjű és 5 µm szemcseméretű mag-héj töltetű állófázison (Ascentis Express).

Ahogy azt a 2.9.1 alfejezetben is említettem 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) és a minta injektált térfogatának (1 és 2 μ l) a hatását is. Míg az utóbbi paraméter nem befolyásolta a rozmaringsav elválasztását és csúcsalakját, addig az előbbinél a nagyobb áramlási (0,8 és 0,6 mL/min) térfogatoknak az alkalmazása a rendszer felbontóképességének és elméleti tányérszámának csökkenését eredményezték. Ezen oknál fogva végül optimális áramlási sebességnek 0,5 mL/min-t, mintatérfogatnak pedig 2 μ L-t választottam. A teljes elemzési idő 35 perc volt. Az optimalizált rendszerrel felvett kontroll, citromfű szárazkivonattal, illetve standard rozmaringsavval adalékolt étcsokoládé kromatogramjait a 18. ábra mutatja.



18. ábra Extrahált étcsokoládék kromatogramja, ahol a) étcsokoládé citromfű szárazkivonattal b) étcsokoládé standard rozmaringsavval c) kontrollcsokoládé. Extrakciós körülmények: MACs, 120 min, szobahőmérséklet

Az extrahált csokoládé mintaoldatok közvetlenül, mintaelőkészítés nélkül kerültek elemzésre. A 200 és 400 nm-es detektálási hullámhossztartományban felvett adatok elemzését követően a

rozmaringsav mennyiségi vizsgálatához a legnagyobb jelintenzitást mutató 330 nm-es hullámhosszt választottam. A 18. ábrán továbbá jól látható, hogy a rozmaringsav zavarásmentesen mérhető, hiszen a citromfű szárazkivonattal adalékolt étcsokoládében jelenlévő egyéb kisebb komponensektől jól elkülönül. A kontroll csokoládében rozmaringsavat és egyéb fenolos savakat nem detektáltam. A további minőségbiztosítás érdekében a mintakomponens csúcstisztaságának (0,9987) ellenőrzését a korábbiakhoz hasonlóan szintén elvégeztem.

A kromatográfias rendszer megfelelő működését a rendszeralkalmassági teszt alapján kapott eredmények és azok RSD% értékei (0,1-1,8%) bizonyítják (10. táblázat).

10. táblázat A kifejlesztett RP-HPLC módszer rendszeralkalmassága

Mátrix	Elméleti tányérszám	RSD (%)	Szimmetria faktor	RSD (%)	Felbontás	RSD (%)	Retenció s idő (min)	RSD (%)
Standard oldat (µg/mL)								
10	153 189	1,5	1,041	0,10	-	-	15,17	0,42
100	150 155	1,8	1,071	0,85	17,63	1,8	15,18	0,66
400	141 017	1,8	1,150	0,31	17,21	1,5	15,16	0,36
Csokoládé (mg/g)*								
Citromfű szárazkivonat	145 896	0,5	1,064	0,37	2,96	0,2	15,16	0,55
Standard rozmaringsav	155 926	0,4	1,075	0,31	16,23	2,7	15,18	0,53

A bemutatott adatok átlagértékek \pm RSD%; n=3; * – az adalékolt étcsokoládék névleges koncentrációja 4 mg/g

Az adalékolt étcsokoládék mg/g egységben kifejezett rozmaringsav mennyiségének meghatározása a korábbiakban is alkalmazott külső standard addíciós technikával valósult meg. A rozmaringsav 15,2 min retenció s idővel detektálható, 0,0021 mg/mL LOQ értékkel. Az 5-800 µg/mL koncentrációtartományban 8 pontra felvett kalibrációs egyenes meredeksége 5530 mL/µg, tengelymetszete pedig 2490 volt. Az 1,0000 determinációs együttható a módszer kitűnő

linearitását bizonyítja. A módszer érvényesítése során ugyancsak jónak találtam az ismételhetőséget és a reprodukálhatóságot, mivel a 10, 100 és 400 µg/mL koncentrációjú standard rozmaringsav oldatok, továbbá a standard rozmaringsavval és a citromfű szárazkivonattal (*Melissae folii extractum siccum*) adalékolt csokoládé mintaoldatok egy napon belül, illetve napok között mért koncentrációjának relatív szórásai rendre 0,92%, illetve 2,3% alatt voltak (11. táblázat).

11. táblázat A kifejlesztett RP-HPLC módszer precizitási paramétereit

Mátrix	Napon belüli ismételhetőség		Napok közötti ismételhetőség (3 nap)	
	Mért konc.	RSD(%)	Mért konc.	RSD(%)
Standard oldat (µg/mL)				
10	9,30	0,72	8,97	1,82
100	100	0,83	98,9	2,34
400	400	0,45	379	2,17
Csokoládé (mg/g)*				
Citromfű szárazkivonat	3,98	0,79	3,94	1,02
Standard rozmaringsav	3,82	0,92	3,77	1,54

A bemutatott adatok átlagértékek, n=3; *, az adalékolt étcsokoládék névleges koncentrációja 4 mg/g

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. A fenti eredmények alapján összességében tehát elmondható, hogy a kifejlesztett RP-HPLC eljárás alkalmas az adalékolt étcsokoládéban lévő rozmaringsav minőségi és mennyiségi meghatározására és nyomonkövetésére.

4.3.4 Eltarthatósági vizsgálat a rozmaringsav függvényében

A 174 napos tárolás hatását a citromfű szárazkivonattal, illetve a standard rozmaringsavval adalékolt étcsokoládék mg/g-ban kifejezett rozmaringsav-tartalmának mennyiségére, illetve változására (Δ), továbbá százalékban (%) kifejezett bomlási értékére a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat Hűtött körülmények között tárolt (5°C) adalékolt étcsokoládé rozmaringsav komponensének stabilitása

Csokoládé	Tárolási idő (nap)	Rozmaringsav		
		mg/g	Δc (mg/g)	Bomlás (%)
Citromfű szárazkivonat	0	3,98 \pm 0,07 ^a	-	
	29	3,93 \pm 0,15 ^a	-0,05	1,3
	58	3,94 \pm 0,10 ^a	-0,04	1,0
	87	3,93 \pm 0,10 ^a	-0,05	1,3
	116	3,91 \pm 0,15 ^a	-0,07	1,8
	145	3,90 \pm 0,22 ^a	-0,08	2,0
	174	3,89 \pm 0,12 ^a	-0,09	2,3
Standard rozmaringsav	0	3,81 \pm 0,10 ^b	-	
	29	3,85 \pm 0,15 ^b	0,04	-1,0
	58	3,81 \pm 0,07 ^b	0,00	0,0
	87	3,83 \pm 0,07 ^b	0,02	0,5
	116	3,80 \pm 0,02 ^b	-0,01	0,3
	145	3,82 \pm 0,10 ^b	0,01	-0,3
	174	3,79 \pm 0,22 ^b	-0,02	0,5

A bemutatott adatok átlagértékek \pm 95%-os konfidencia intervallum, n=3; a különböző indexek szignifikáns különbségeket jelölnek ($p \leq 0,05$); Δc , a koncentráció változás

A fenti táblázatból jól látható, hogy a rozmaringsav kezdeti és 174. napon mért koncentrációjában jelentős eltérés sem a citromfű szárazkivonattal sem a standard rozmaringsavval adalékolt étcsokoládé esetében nem mutatkozott. A legnagyobb hatóanyagbomlást ugyanis a citromfű szárazkivonattal adalékolt étcsokoládé esetében konstatáltam

csupán 2,3%-os veszteséggel, mely elhanyagolhatónak tekinthető a 10%-os elfogadhatósági szinthez képest, ráadásul a mért értékek között szignifikáns különbségek ($p \leq 0,05$) sem voltak kimutathatók. A 12. táblázatból továbbá látható, hogy a standard rozmaringsavval adalékolt étcsokoládé jobb stabilitást mutatott. Ez esetben ugyanis a $3,81 \pm 0,10$ mg/g kezdeti rozmaringsav-koncentráció csupán $3,79 \pm 0,22$ mg/g értékre csökkent, mely 0,5%-os hatóanyagbomlásnak felel meg. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a mért értékek statisztikailag ($p \leq 0,05$) ebben az esetben sem különböztek egymástól.

5 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1 Extrakciós módszerfejlesztés folyékony gyógynövény-kivonatokban lévő rozmaringsav kinyerésére

A növényekben lévő rozmaringsav kinyerése és különféle készítményekben történő felhasználása az elmúlt években egyre nagyobb figyelemnek örvend, köszönhetően kedvező tulajdonságainak. E vegyület extrakciójáról szóló cikkek jelentős többsége azonban meglehetősen ellentmondásos, ráadásul a különféle extrakciós technikáknak a rozmaringsavra gyakorolt hatásával kapcsolatos összehasonlító vizsgálatok is hiányosak. A vegyület kinyeréséhez használt módszereket illetően igencsak széles képet kapunk az irodalomban, hiszen a hagyományos extrakciós technikákon át (macerálás, perkolálás, Soxhlet-extrakció, stb.) az új extrakciós eljárásokig (MAE, szuperkritikus fluid extrakció, enzim segített extrakció, stb.) számos példát találunk (Ngo és mtsai, 2018).

Az optimális mintatömeg:kivonószer-térfogat arány tekintetében az irodalmakban általában az 1:20 g/mL arányt alkalmazzák, hiszen számos vizsgálat mutat rá arra, hogy ezen mintatömeg:kivonószer-térfogat arálynak a nagyobb mértékben történő alkalmazása nincs szignifikáns hatással a rozmaringsav kihozatalára. Ezen állítást Ondrejovič és mtsai (2009) is igazolták. Citromfűvel végzett elemzéseik során ugyanis optimálisnak az 1:20 g/mL és az 1:30 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arányt állapították meg. Ezen adatok összességében összhangban állnak Zu és mtsai (2012) vizsgálataival is, hiszen ők sem tapasztaltak jelentős hatékonyság javulást abban az esetben, amikor a mintatömeg:kivonószer-térfogat arányt 1:20 g/mL-ről 1:50 g/mL-re

növelték. Ezzel szemben eredményeim azt mutatták, hogy az 1:20 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arálynak a növelése az 50°C-on végzett MAE kivételével csak rövid extrakciós idők esetében nem eredményez hatékonyság javulást. Az észlelt jelenség feltételezhetően az irodalmi áttekintés c. fejezetben is említett telítési hatásból adódott, ugyanis hosszabb extrakciós időtartamok mellett már több esetben találtam növekedésbeli szignifikáns különbségeket (10. ábra). Hasonló tendenciát Huang és mtsai (2014) is megfigyeltek. Kínai bazsalikkal (*Perilla frutescens* (L.) Britton) végzett vizsgálata során ugyanis a legkisebb rozmaringsav-tartalmat éppen az 1:20 g/mL mintatömeg:kivonószer-térfogat arány alkalmazásával mérték, optimálisnak pedig az 1:45 g/mL arányt találták.

Ahogy korábban is említettem, a kötött fenolos savak esetében a legjobb extrahálási hozam érdekében javasolt a gyenge, vagy erős szerves savak alkalmazása. Mindezek ellenére kevés olyan tanulmányt találni az irodalomban, amelyek a rozmaringsav extraháláshoz savanyított kivonószer alkalmaznának, noha jelen munkám szintén megerősítette (11. ábra) több szerző (Košar és mtsai 2005; Putnik és mtsai, 2016) azon megfigyelését, miszerint a Lamiaceae növényekből származó, természetben előforduló rozmaringsav glikozidos formája sósavval savanyított etanolos kivonatok esetében aglikonos formává alakul, ezáltal növelve az extrakciós hozamot.

Az extrakció további fontos tényezője az alkalmazott kivonószer típusa, mely a kinyerési módszerektől függetlenül többnyire poláris szerves oldószer és víz keverékéből áll. A szerves oldószer általában metanol (Bandoniene és mtsai, 2005; Arceusz és Wesolowski, 2013), vagy etanol (Peev és mtsai, 2011; Skowyra és mtsai, 2014). Ugyanakkor olyan

egyéb szerves oldószerek használata is megfigyelhető, mint például az aceton (Lagouri és Nisteropoulou, 2009), vagy az etil-acetát (Dastmalchi és mtsai, 2007). A két kivonószerként leggyakrabban alkalmazott oldószer hatékonyságát illetően azonban megoszlanak a vélemények, ugyanis míg egyesek szerint a metanol (Paniwnyk és mtsai, 2009), addig mások szerint az etanol (de Oliveira és mtsai, 2016, Fatma Ebru és mtsai, 2018) hatékonyabb. Általánosságban ugyanakkor elmondható, hogy a kutatók a közepes polaritású kivonószerekkel vélik optimálisnak. Durling és mtsai (2007) például az 55-75 v/v közötti EtOH-H₂O elegyeket találták megfelelőnek a szárított orvosi zsályában lévő rozmaringsav kinyerésére. Che Mansor és mtsai (2016) a vesetea (*Orthosiphon stamineus* Benth) vizsgálata során 50:50 v/v EtOH-H₂O eleggyel nyerték a legnagyobb rozmaringsav kihozataalt, de hasonló etanol koncentrációt (60 v/v%) találtak optimálisnak Casoni és mtsai (2017) is a borsikafű (*Sateruja hortensis* L.) esetében. Ezen eredmények összhangban állnak az általam kapott eredményekkel, hiszen vizsgálataim során a legjobb rozmaringsav kihozataalt az 50:50 és a 70 :30v/v EtOH-H₂O elegyek esetében találtam (3. táblázat). Noha köztudott, hogy tiszta kivonószerként az etanol, vagy metanol kevésbé hatékony a rozmaringsav extrakciójában (ld. 2.6.2 fejezet), e típusú kivonószerek használatára is találunk példát. Ezesetben azonban a rozmaringsav természetéből adódóan általában a polárosabb tulajdonsággal rendelkező metanol hatékonyabb, amit Paniwnyk és mtsai (2009) is igazoltak munkájukkal, ugyanis vizsgálataik során a metanos rozmaring-kivonatuknak a rozmaringsav mennyisége (1,2 mg/g a száraz növényi anyagra vonatkoztatva) hatszorosa volt az etanos kivonathoz képest. Bár vizsgálataim során hasonló

tendenciát tapasztaltam, ez a megállapítás nem érvényesült minden gyógynövény esetében (ld. Eredmények 4.1.2.2 alfejezet).

Az extrakció hőmérsékletének a rozmaringsav kinyerhető mennyiségére gyakorolt hatásával kapcsolatosan ellentmondásos információkkal találkozhatunk. Ugyanis míg egyes kutatások szerint a rozmaringsav meglehetősen széles hőmérsékleti tartományban jó stabilitást mutat, különösen alkoholos kivonatok esetében, addig más munkák épp az ellenkezőjéről számolnak be. A rozmaringsavnak kávésavvá történő oxidációját Hossain és mtsai (2011) 150°C-nál nagyobb hőmérsékletek alkalmazásánál figyelték meg, addig Dent és mtsai (2013) 90°C-on, Lau és mtsai (2014) pedig már 70°C-on észlelték.

Dent és mtsai (2013), valamint Suhaimi és mtsai (2019) munkájukban szintén kiemelik az általam is tapasztalt jelenséget, vagyis, hogy a kivonás időtartamának jelentős hatása van a rozmaringsav extrakciójára, különösen nagyobb hőmérséklet alkalmazása mellett. Tanulmányom továbbá rávilágított arra a tényre is, hogy a hagyományos macerálás időtartamát, mely általában 7 nap, jelentős mértékben csökkenthetjük, ha az eljárást a rázás technikájával kombináljuk (5. táblázat). Ezen jelenség egyrészt a keverés miatt bekövetkező diffúziós határréteg csökkenésével, illetve Fick II. törvényével (ld. (2) egyenlet) magyarázható, mely kimondja, hogy bizonyos idő elteltével, egyensúly beállta figyelhető meg a szilárd mátrixban lévő hatóanyag és az oldat koncentrációja között.

Összességében ezen irányú vizsgálataim eredményeként elmondható, hogy a rendelkezésre álló nagyszámú szakirodalmi adat ellenére elsőként közöltem egy olyan átfogó tanulmányt (Sik és mtsai, 2020), mellyel bizonyítottam, hogy lehetséges egy extrakciós protokollnak

a kidolgozása a rozmaringsav kinyerésére függetlenül a Nepetoideae alcsaládba tartozó növényfajtól.

5.2 Tinktúrák eltarthatósága

Az irodalomban ezen irányú vizsgálatok a növényekben lévő polifenolos alkotókra – különösen a Lamiaceae család esetében – meglehetősen korlátozott számban állnak rendelkezésre. Ebből adódóan eredményeimnek összehasonlítása más szerzők eredményeivel meglehetősen bonyolult, mivel kevés olyan irodalmat találtam, mely hasonló mátrixban hosszú távon nyomon követné a rozmaringsavat. A család marker vegyületének a növényi kivonatokban való hosszú távú stabilitásáról ugyanis, a legjobb tudomásom szerint, csupán Shafaei és mtsai (2018) számoltak be. Kísérletükben a Lamiaceae családba tartozó vesetea etanolos kivonatában a rozmaringsav, a 3'-hidroxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavon, a szinenszetin és az eupatorin vegyületeket határozták meg 6 hónapig különböző hőmérsékleteken (30-60°C). Kutatásaik során azt tapasztalták, hogy a rozmaringsav stabilitása gyengébb a többi vizsgált markeréhez képest, ugyanis e komponens esetében 30, 40, 50 és 60°C-on 25, 52, 57 és 89%-os veszteséget tapasztaltak. Eredményeim összevetése ezen értékekkel meglehetősen bizonytalan, ugyanis, mint ismert a vegyületek reakciósebességét, ezáltal bomlási értékét a hőmérséklet nagymértékben befolyásolja. Eredményeim ezt az elvet alá is támasztják, ugyanis a kerti kakukkfű és az orvosi zsálya kivételével jóval kisebb veszteséget tapasztaltam. Vizsgálataim ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a rozmaringsav tiszta komponensként hosszú tárolási időtartam mellett jóval stabilabb, mint egyéb kísérő komponensek jelenlétében (7. táblázat). Ezen megfigyelésem összességében összhangban áll Zhang és mtsai (2012) által közölt eredményekkel, noha tanulmányukban a tiszta

rozmaringsavat, karnozolt és karnozinsavat, valamint e három antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező vegyületnek az etanolos elegyét csupán 13 napon keresztül vizsgálták. Éppen ezért nem meglepő, hogy a szerzők sem a tiszta sem a keverék oldatban nem tapasztalták a rozmaringsav bomlását. A „valódi” növényi kivonatok esetében mindezekkel ellentétben azt tapasztaltam, hogy a szóban forgó vegyület meglehetősen instabil és kezdetben gyorsan bomlik (7. táblázat). A transz-rozmaringsavnak protikus poláris szerves kivonószerekben történő gyors bomlását Razboršek (2011) is megfigyelte. A 7. táblázatban ugyanakkor az is látható, hogy a rozmaringsav bomlásának mértéke és a kávésav mennyiségének növekedése között lineáris kapcsolat nem áll fenn. Ezen jelenség egyik magyarázata, melyet vizsgálataimmal alá is támasztottam, hogy a rozmaringsav nem csupán kávésavra, hanem egyéb vegyületekre is bomlik (12. ábra). További lehetséges ok, hogy a keletkező kávésav meglehetősen instabil és szintén további komponensekre bomlik.

Az eltarthatósági vizsgálatok során a spektrofotometriás eljárások általában nem kielégítőek melynek egyik oka, hogy ezen módszerek nem specifikusak, azaz a minta egészére nem pedig az ICH Q1A (R2) Guideline előírása alapján elvárt marker, vagy terápiás hatással rendelkező vegyületre/vegyületekre vonatkozólag nyújtanak információt. Legfőbb problémát azonban egy, vagy több komponensnek az új antioxidáns jellegű vegyületekké való bomlása, illetve ezeknek a Folin-Ciocalteu reagenssel való reakciója okozza, ezáltal torzítva az eredményeket (Castro-López és mtsai, 2016). Ezen jelenségből fakadó összes polifenoltartalom növekedést vizsgálataim során a rozmaring, a borsosmenta és a citromfű esetében is konstatáltam (8. táblázat). Míg a citromfűnél a jelenséget feltételezhetően a kávésav nagyobb mértékű növekedése

okoza, addig ugyanez a rozmaringnál és a borsosmentánál nem mondható el, hiszen ahogy az a 12. ábrán is látható ezen gyógynövények esetében a kávésav mellett egyéb azonosítatlan vegyületek kromatográfiás csúcs alatti területének növekedését is megfigyeltem. Mindezek ellenére a spektrofotometriás eljárások számos kiegészítő információval szolgálhatnak egy-egy eltarthatósági vizsgálat folyamán, hiszen ezen módszerek segítségével megállapíthatjuk egy növényi kivonat jótékony hatással rendelkező vegyületének, valamint összes polifenol-tartalma és a DPPH gyökfogó aktivitása közti összefüggést. A különböző növényi tinktúrák összes polifenol-tartalma és DPPH gyökfogó aktivitás közti lineáris összefüggés tekintetében (14. ábra) eredményeim összhangban álltak Chrprová és mtsai (2010) által találtakkal. Vizsgálataimmal továbbá alátámasztottam, hogy a tinktúrák rozmaringsav-tartalma és DPPH gyökfogó aktivitása között lineáris kapcsolat áll fenn (13. ábra). Ezen eredményeimet Fletcher és mtsai (2005) is igazolták ($R^2=0,64$) különböző menta fajoknál, de hasonló összefüggést figyelt meg Lagouri és Nisteropoulou (2009) is szurokfű, kakukkfű és bazsalikom fajok esetében ($R^2=0,85$). Lamien-Meda és mtsai (2010) ugyanakkor velem ellentétben nem találtak szoros korrelációt különböző orvosi zsálya kivonatok esetében ($R^2=0,34$).

Mindent egybevéve, kísérleti adataim azt mutatják, hogy míg a kerti kakukkfű tinktúra eltarthatósági ideje kevesebb, mint 27 nap az EMA-HMPC irányelve alapján, addig a citromfű, a szurokfű és orvosi zsályából készített kivonatok akár 55 napig is tárolhatók szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen. A legjobb eltarthatósági időtartammal (≤ 113 nap) a borsosmenta és a rozmaring rendelkezett.

5.3 Rozmaringssavat tartalmazó étcsokoládék elemzéseivel kapcsolatos eredmények

Manapság a kutatók egyre nagyobb figyelmet fordítanak a természetes összetevők (fenolos savak, flavonoidok, vitaminok stb.) funkcionális tulajdonságainak kiaknázására. Ebből adódóan egyre több olyan vizsgálattal találkozhatunk ahol ezen komponensek a különböző élelmiszerekben, mint funkcionális összetevők jelennek meg (Caleja és mtsai, 2017b). Kutatásom során egy olyan teljesen új, innovatív funkcionális étcsokoládét fejlesztettem ki, mely elsősorban a kognitív funkciókat befolyásoló krónikus betegségben szenvedő egyének kiegészítő terápiájában lehet hasznos.

A csokoládétermék fejlesztése során a fogyasztói szempontból nem kívánatos organoleptikus tulajdonságok (keserű íz elkerülése) mellett nagy hangsúlyt fektettem a rozmaringsav beviteléből esetlegesen fellépő káros humán egészségi hatások elkerülésére is. Ennek szellemében az ajánlott napi fogyasztható csokoládé mennyisége (25 g) olyan mértékben tartalmazott rozmaringsavat (100 mg) mellyel korábbi vizsgálatok szerint kedvező hatásokat lehet elérni különböző kognitív károsodások esetén, ártalmas mellékhatások fellépése nélkül (Tal Friedman, 2015). Mindazonáltal fontos ismét megjegyezmem, hogy Noguchi-Shinohara és mtsai (2015) napi 500 mg ADI értéket állapítottak meg a rozmaringsav esetében. Ezen érték alapján elvégzett kockázatbecslés szerint 125 g adalékolt étcsokoládé elfogyasztása feltételezhetően még nem okoz káros hatásokat tartós fogyasztás esetén sem. Ennek ellenére ilyen mértékű napi csokoládé bevitel semmiképp nem ajánlatos, hiszen olyan problémákhoz vezethet, mint az elhízás vagy a 2-es típusú diabetes mellitus (Shah és mtsai, 2017). Az irodalomban rozmaringsavat tartalmazó növényi

szárazkivonattal adalékolt étcsokoládé vizsgálatára nem találunk példát. Ezen oknál fogva annak igazolására, hogy a bizonyítottan nagy rozmaringsavat tartalmazó citromfű (5. táblázat) alkalmas az étcsokoládé funkcionális tulajdonságainak növelésére HPLC vizsgálati módszert kellett kidolgoznom. Eredményeim minden esetben a kidolgozott RP-HPLC eljárás alkalmasságát támasztották alá. A vizsgált rendszeralkalmassági paraméterek (10. táblázat) ugyanis megfeleltek azon kritériumoknak, melyeket az anyag és módszer 3.8.2 alfejezetében Seo és mtsai (2016) által megfogalmazottak szerint felállítottam.

A rozmaringsav megfelelő extrakciós hatékonyságának elérése, illetve a HPLC elemzés során alkalmazott állófázis védelme érdekében a mintaelőkészítés során biztosítani kellett a csokoládé lipid fázisának eltávolítását. Ehhez azonban döntő jelentőségűnek bizonyult egy olyan kivonószernek az alkalmazása, mely nem befolyásolja a csokoládéhoz adott rozmaringsav mennyiségét. Mivel köztudott, hogy a fenolos savak jól oldódnak közepes, illetve nagy polaritású szerves kivonószerekben, a csokoládé lipid fázisának eltávolításához az apoláros tulajdonságokkal rendelkező n-hexánt választottam.

Mivel többen beszámoltak (Jakobek, 2015, Alu'datt és mtsai, 2017) a polifenolok és az élelmiszer-összetevők (szénhidrát, fehérje, zsír, stb.) közötti kölcsönhatásokról, célul tűztem ki annak vizsgálatát, hogy a csokoládé összetevői milyen mértékben befolyásolják a rozmaringsav mennyiségét. Ehhez azonban egy hatékony extrakciós módszer kidolgozására volt szükség, ugyanis egy nem optimalizált módszerrel kinyerhető hatóanyag mennyisége akár jóval kevesebb is lehet, mint amennyi valójában a termékben megtalálható. Ezt a feltételezést eredményeim is alátámasztották, hiszen az alkalmazott kivonószer

típusától függően az extrakció hatékonysága 16,3% és 99,5% között változott. Noha az irodalomban találunk több olyan vizsgálatot (Belščak és mtsai, 2009, Tuenter és mtsai, 2020) melyek a csokoládében lévő fenolos savak meghatározására irányulnak, arra vonatkozólag, hogy a kivonatolás során alkalmazott kivonószerek hogyan hatnak a csokoládében lévő hatóanyag kinyerhető mennyiségére, nincs adat. Az adalékolt étcsokoládében lévő rozmaringsav vizsgálata során ugyanakkor hasonló tendenciát véltem felfedezni, mint amelyet a növényi kivonatokban lévő rozmaringsav elemzésénél is tapasztaltam, s melyet Durling és mtsai (2007), valamint Paniwnyk és mtsai (2009) is megfigyeltek vizsgálataik során. Az extrakciós idő a csokoládé mátrix esetében kevésbé bizonyult meghatározó tényezőnek. A százalékban kifejezett extrakciós hatékonyságok ugyanis a MAC_s és a MAE esetében rendre 93,5%, illetve 98,7% felett voltak. Azon korábban tapasztalt jelenség, miszerint a MAE csupán az extrakciós idő tekintetében produktívabb a hagyományos kivonatolási eljárásokhoz képest a csokoládé mátrix esetében is megmutatkozott (9. táblázat). A jelenséget Dragović-Uzelac és mtsai (2012) is megfigyelték az orvosi zsályának a MAE és a forralásos visszafolyóztatással végzett extrakciója során.

A kifejlesztett csokoládétermék esetében a tinktúrákhoz hasonlóan eltarthatósági vizsgálatokat is végeztem, mely során igazoltam, hogy az étcsokoládé megfelelő hordozómátrix a növényi kivonatokban lévő fenolos komponensek, jelen esetben a rozmaringsav számára. Hasonló megállapításra jutott Muhammad és mtsai (2021) a fahéjjal, illetve Lončarević és mtsai (2018) a szederlével adalékolt fehér csokoládé esetében is. Vizsgálataim ugyanakkor a csokoládémátrix esetében is alátámasztották azt a tényt, miszerint a rozmaringsav tiszta

komponensként hosszú tárolási időtartam mellett jóval stabilabb, mint egyéb kísérő komponensek jelenlétében (12. táblázat).

Ezen irányú vizsgálataim alapján összességében elmondható, hogy a kifejlesztett termék hűtve tárolása során megtartotta a funkcionalitását fokozó és egyben terápiás hatását biztosító rozmaringsav mennyiségét. Ennek alapján eltarthatósági ideje hűtött körülmények között minimum fél év.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A rozmaringsav kedvező élettani hatásai (antioxidáns, antikarcinogén, antiallergén, gyulladáscsökkentő, stb.) mellett a neurodegeneratív rendellenességek (Alzheimer- és Parkinson-kór) kialakulását gátló tulajdonságai miatt került napjaink farmakológiai kutatásainak középpontjába.

A fenti szemlélet alapján a doktori képzésben végzett kutató munkám alapvető célkitűzése a Lamiaceae család Nepetoideae alcsaládjába tartozó növények (*M. officinalis*, *M. piperita*, *T. vulgaris*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. officinalis*) rozmaringsav-tartalmának maximális kinyerése és felhasználása volt különféle, étrend-kiegészítő és funkcionális élelmiszerek fejlesztéséhez. Ehhez első lépésként HPLC - DAD módszerrel vizsgáltam a kiválasztott növényekből MACs, HRE és MAE útján előállított kivonatok rozmaringsav összetételének változását különféle extrakciós paraméterek beállítása mellett. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a hatóanyag mennyiségét a kivonószertípusa és összetétele mellett annak pH-ja is befolyásolja. Továbbá, hogy az extrakciós idő helyes megválasztása döntő jelentőséggel bír különösen nagyobb extrakciós hőmérsékletek alkalmazása esetén. Mindemellett ezen vizsgálataim alapján azt találtam, hogy leginkább a szurokfű (*O. vulgare*) és a citromfű (*M. officinalis*) leveleiből készített kivonatok lehetnek alkalmasak funkcionális élelmiszer összetevőként, nagy rozmaringsav-tartalmuknál fogva.

Második fő célkitűzéseim között a vizsgált növényekből előállított tinktúrák stabilitásának elemzése szerepelt, ugyanis ezen típusú vizsgálatok meglehetősen alulreprezentáltak a farmakognózia területén, noha egy termék által közvetített megfelelő hatékonyság biztosítása

érdekében fontos a hatóanyag megfelelő mennyiségének garantálása az egész eltarthatósági időtartam alatt, különösen olyan készítmények esetében, ahol nem történik hatóanyag-tartalom beállítás. A 6 hónapos „otthoni” tárolási körülményeket szimuláló vizsgálatok során a terápiás hatással bíró marker komponensen (rozmaringsav) kívül a tinktúrák kávésav, összes polifenol és antioxidáns tulajdonságait is nyomon követtem. Eredményeim igazolták azon korábbi megfigyeléseket, melyek szerint a tinktúrákban lévő biológiailag aktív hatóanyagok meglehetősen rövid idő alatt bomlásnak indulnak. HPLC-DAD módszerrel ugyanis megállapítottam, hogy szobahőmérsékleten a Lamiaceae növényekből származó rozmaringsav meglehetősen instabil és tinktúra formájában csak rövid idejű minőségmegőrzési idővel tudja közvetíteni az általa elvárt kedvező élettani hatásokat. A kísérletbe bevont spektrofotometriás vizsgálatokkal továbbá rávilágítottam arra, hogy a tinktúrák összes polifenol-tartalma és antioxidáns tulajdonságai lineáris kapcsolatban állnak rozmaringsav-tartalmukkal.

Harmadik fő célkitűzésem egy újonnan kifejlesztett növényi kivonattal adalékolt funkcionális élelmiszer rozmaringsav profiljának a vizsgálata volt saját fejlesztésű RP-HPLC módszer segítségével. A kidolgozott és érvényesített módszer megfelelőségét az analitikai teljesítményjellemzők igazolták. A rozmaringsav kinyeréséhez a korábban is alkalmazott extrakciós módszereket adaptáltam, vizsgálva azon főbb extrakciós paraméterek hatását melyek befolyásolják a rozmaringsav maximálisan kinyerhető mennyiségét. Munkám utolsó szakaszában az étcsokoládéhoz adalékolt rozmaringsav stabilitását vizsgáltam. A kapott eredmények alapján megállapítottam, hogy az étcsokoládé homogén hatóanyag-eloszlást mutatott és alacsony hőmérsékletű tárolási

körülmények között „megtartotta” a funkcionalitását fokozó növényi kivonatban lévő rozmaringsav mennyiségét.

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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 kivonatólási 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 folyadékkromatográfias 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.

8 PUBLIKÁCIÓ

8.1 Értekezés alapjául szolgáló közlemények

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. (2020) Lamiaceae családba tartozó tradicionális gyógynövények fő bioaktív hatóanyagának kinyerésére szolgáló extrakciós eljárások kidolgozása. *Új Nemzeti Kiválósági Program 2019/2020 Konferencia Tanulmánykötet*, 181-188.

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: -

8.2 Értekezés témájával kapcsolatban megjelent közlemények

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 vízgőzdesztillációval. 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.

9 IRODALOMJEGYZÉK

1. 10/1987. (VIII. 19.) EüM rendelet a gyógyszernek nem minősülő gyógyhatású anyagok és készítmények nyilvántartásáról és forgalomba hozataláról.
2. 37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet az étrend-kiegészítőkről.
3. 450/2017. (XII. 27.) Korm. rendelet az emberi felhasználásra kerülő gyógyszerek forgalomba hozatalának és gyártásának engedélyezéséről.
4. 52/2005. (XI.18.) EüM rendelet az emberi alkalmazásra kerülő gyógyszerek forgalomba hozataláról.
5. A Magyar Élelmiszerkönyv 1-3-2000/36 számú előírása az emberi fogyasztásra szánt kakaó- és csokoládétermékekről.
6. Abdelmajeed NA, Danial EN, Ayad HS. (2013) The effect of environmental stress on qualitative and quantitative essential oil of aromatic and medicinal plants. *Arch Sci.*, 66, 100-120.
7. Adham AN. (2015) Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Ocimum basilicum*. *J Pharmacogn Phytochem.*, 3, 130-139.
8. Afoakwah AN, Owusu J, Adomako C, Teye E. (2012) Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global J Biosci Biotechnol.*, 1, 132-140.
9. Afonso AF, Pereira OR, Neto RT, Silva AMS, Cardoso SM (2017) Health-promoting effects of *Thymus herba-barona*, *Thymus pseudolanuginosus*, and *Thymus caespititius* decoctions. *Int J Mol Sci.*, 18, 1879. <https://doi.org/10.3390/ijms18091879>.

10. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR. (2011) Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Crit Rev Biotechnol.*, 31, 227-249.
11. Alagawany M, El-Hack MEA, Farag MR, Gopi M, Karthik K, Malik YS, Dhama K. (2017) Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim Health Res Rev.*, 18, 167-176.
12. Albak F, Tekin AR. (2014) Development of functional chocolate with spices and lemon peel powder using response surface method: development of functional chocolate. *Akademik Gida*, 12, 19-25.
13. Al-Dhabi NA, Arasu MV, Park CH, Park SU. (2014) Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. *Exp Clin Sci J.*, 13, 1192–1195.
14. Aleixandre-Tudo JL, du Toit W. (2018) The role of UV-visible spectroscopy for phenolic compounds quantification in winemaking. In.: *Frontiers and New trend in the Science of Fermented Food and Beverages*. Solís-Oviedo RL, Pech-Canul ÁDLC. (Eds.), IntechOpen, London, UK.
15. Allgrove J, Davison G. (2014) Dark chocolate/cocoa polyphenols and oxidative stress. In.: *Polyphenols in Human Health and Disease*. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. (Eds.), Academic Press, Cambridge, MA, USA.
16. Al-Mamoori F, Al-Janabi R. (2018) Recent advances in microwave-assisted extraction (MAE) of medicinal plants: a review. *Int Res J Pharm.*, 9, 22-29.
17. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamas MN, Al-Rabadi GJ, Tranchant CC, Almajwal A, Kubow S, Alli I. (2017) Occurrence, types, properties and interactions of phenolic compounds with other food

- constituents in oil-bearing plants. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 58, 3209-3218.
18. Alu'datt MH, Rababah T, Johargy A, Gammoh S, Ereifej K, Alhamad MN, Brewer MS, Saati AA, Kubow S, Rawshdeh M. (2015) Extraction, optimisation and characterisation of phenolics from *Thymus vulgaris* L.: phenolic content and profiles in relation to antioxidant, antidiabetic and antihypertensive properties. *Int J Food Sci Technol.*, 51, 720-730.
 19. Ameer K, Shahbaz HM, Kwon J-H. (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, 16, 295-315.
 20. Amorati R, Valgimigli L. (2015) Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic Res.*, 49, 633-649.
 21. Andrade JM, Faustino C, Garcia C, Ladeiras D, Reis CP, Rijo P. (2018) *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Sci OA*, 4, FSO283. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>.
 22. Arceusz A, Wesolowski M. (2013) Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *J Pharm Biomed Anal.*, 83, 215–220.
 23. Ashurst PR. (2016) Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
 24. Aydar AY. (2018) Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. In.: Statistical

-
- Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes. Silva V. (Ed.), InTech, Rijeka, Croatia.
25. Az Európai Parlament és Tanács 1334/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az élelmiszerekben és azok felületén használható aromákról és egyes, aroma tulajdonságokkal rendelkező élelmiszer-összetevőkről, valamint az 1601/91/EGK tanácsi rendelet, a 2232/96/EK és a 110/2008/EK rendelet, valamint a 2000/13/EK irányelv módosításáról.
26. Az Európai Parlament és Tanács 2001/83/EK irányelve (2001. november 6.) az emberi felhasználásra szánt gyógyszerek közösségi kódexéről.
27. Az Európai Parlament és Tanács 2002/46/EK irányelve (2002. június 10.) az étrend-kiegészítőkre vonatkozó tagállami jogszabályok közelítéséről.
28. Az Európai Parlament és Tanács 2004/24/EK irányelve (2004. március 31.) az emberi felhasználásra szánt gyógyszerek közösségi kódexéről szóló 2001/83/EK irányelvnek a hagyományos növényi gyógyszerek tekintetében történő módosításáról.
29. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J Food Eng.*, 117, 426-436.
30. Bahtiyarca Bağdat R, Coşge B. (2006) The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. *J Fac Agr.*, 21, 116-121.
31. Baj T, Błazewicz A, Świątek Ł, Wolski T, Kocjan R, Głowniak K. (2011) Analysis of phenolic acids in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.)

-
- by HPLC-DAD with *monolithic column ChromolithTM RP-18e*. *Ann Univ Mariae Curie – Skłodowska, Sectio DDD, Pharm.*, 24, 59-65.
32. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Kazemloo P. (2013) Rosmarinic acid mitigates learning and memory disturbances in amyloid β (25-35)-induced model of Alzheimer's disease in rat. *J Basic Clin Pathophysiol.*, 2, 7-14.
33. Bandoniene D, Murkovic M, Venskutonis PR. (2005) Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *J Chromatogr Sci.*, 43, 372-376.
34. Bansal A, Chhabra V, Rawal RK, Sharma S. (2014) Chemometrics: a new scenario in herbal drug standardization. *J Pharm Anal.*, 4, 223-233.
35. Barra A. (2009) Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Nat Prod Commun.*, 4, 1147-1154.
36. Basar SN, Zaman R. (2013) An overview of badranjboya (*Melissa officinalis*). *Int Res J Biol Sci.*, 2, 107–109.
37. Begum A, Sandhya S, Ali SS, Vinod KR, Reddy S, Banji D. (2013) An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci Pol Technol Aliment.*, 12, 61-73.
38. Bekut M, Brkić S, Kladar N, Dragović G, Gavarić N, Božin B. (2018) Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacol Res.*, 133, 301-314.
39. Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganić KK, Karlović D. (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in term of their bioactive composition. *Food Res Int.*, 42, 707-716.

-
40. Belwal T, Devkota HP, Ramola S, Andola HC, Bhatt ID. (2020) Optimization of extraction methodologies to recover phytonutrients from food. In.: *Phytonutrients in Food: From Traditional to Rational Usage*. Nabavi SM, Sutar I, Barreca D, Khan H. (Eds.), Woodhead publishing, Duxford, UK.
 41. Benedec D, Hanganu D, Oniga I, Tiperciuc B, Olah N-K, Raita O, Bischin C, Silaghi-Dumitrescu R, Vlase L. (2015) Assessment of rosmarinic acid content in six *Lamiaceae* species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential. *Pak J Pharm Sci.*, 28, 2297-2303.
 42. Benedec D, Oniga I, Kozma-Imre A, Hanganu D, Țărmure V, Bodoki E. (2017) Determination of rosmarinic acid by HPTLC-image analysis in medicinal teas and their biological properties. *Farmacia*, 65, 605-609.
 43. Bhatt R, Mishra N, Kumar P. (2013) Phytochemical, pharmacological and pharmacokinetics effects of rosmarinic acid. *J Pharm Sci Innov.*, 2, 28-34.
 44. Bilia AR, Bergonzi MC, Gallori S, Mazzi G, Vincieri FF. (2002) Stability of constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *J Pharm Biomed Anal.*, 30, 613-624.
 45. Binello A, Cravotto G, Boffa L, Stevanato L, Bellumori M, Innocenti M, Mulinacci N. (2017) Efficient and selective green extraction of polyphenols from lemon balm. *C R Chim.*, 20, 921-926.
 46. Blois MS. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

47. Borrás-Linares I, Stojanović Z, Quirantes-Piné R, Arráez-Román D, Švarc-Gajić J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. (2014) *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int J Mol Sci.*, 15, 20585-20606.
48. Brandšteterová E, Žiaková-Čaniová A. (2010) Phenolic Acids in Natural Plants: Analysis by HPLC. In.: *Encyclopedia of Chromatography*, Cazes J. (Ed.), Boca Raton, FL, USA.
49. Caleja C, Barros L, Prieto MA, Barreiro MF, Oliveira MBPP, Ferreira ICFR. (2017a) Extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by heat-, microwave- and ultrasound-assisted extraction techniques: a comparative study through response surface analysis. *Sep Purif Technol.*, 186, 297-308.
50. Caleja C, Ribeiro A, Barreiro MF, Ferreira ICFR. (2017b) Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. *Curr Pharm Des.*, 23, 2787-2806.
51. Calpouzios L. (1954) Botanical aspects of oregano. *Econ. Bot.*, 8, 222-233.
52. Canelas V, da Costa CT. (2007) Quantitative HPLC analysis of rosmarinic acid in extracts of *Melissa officinalis* and spectrophotometric measurement of their antioxidant activities. *J Chem Educ.*, 84, 1502-1504.
53. Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, Pintar J, Bedeković D, Čustić MH, Satovic Z. (2016) Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods – a review. *Czech J Food Sci.*, 34, 377–390.
54. Carvalho JCS, Romoff P, da Lannes SC S. (2018) Improvement of nutritional and physicochemical properties of milk chocolates

-
- enriched with kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and grape (*Vitis vinifera*). *Food Sci Technol.*, 38, 551-560.
55. Casoni D, Olah N, Soran L, Cobzac SCA. (2017) Comparison of different extraction techniques for the evaluation of polyphenols content in summer savory extracts. *Studia Univ Babeş-Bolyai Chemia*, 62, 45-56.
56. Castro-López C, Sánchez-Alejo EJ, Saucedo-Pompa S, Rojas R, Aranda-Ruiz J, Martínez-Avila GCG. (2016) Fluctuations in phenolic content, ascorbic acid and total carotenoids and antioxidant activity of fruit beverages during storage. *Heliyon*, e00152, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00152>.
57. Cattaneo L, Cicconi R, Mignogna G, Giorgi A, Mattei M, Graziani G, Ferracane R, Grosso A, Aducci P, Schininà ME, Marra M. (2015) Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PLOS One*, 10, e0132439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132439>.
58. Chan C-H, Yusoff R, Ngoh GC. (2017) An energy-based approach to scale up microwave-assisted extraction of plant bioactives. In: *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*. Grumezescu AM., Holban AM. (Eds.), Academic Press, San Diego, CA, USA.
59. Chau F, Fung K, Koon C, Lau K, Wei S, Leung P. (2011) Bioactive components in herbal medicine experimental approaches. In: *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Benzie IFF, Wachtel-Galor S. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
60. Che Mansor CNAN, Latip J, Markom M. (2016) Preparation of *Orthosiphon stamineus* enriched-extracts and evaluation of their free

-
- radical scavenging activity. AIP Conference Proceedings, 1784, 030013. <https://doi.org/10.1063/1.4966751>.
61. Chen L-Y, Cheng C-W, Liang J-Y. (2015) Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem.*, 170, 10-15.
62. Chen Q, Zhang XH-F, Massagué J. (2011) Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell.*, 20, 538-549.
63. Chew KK, Khoo MZ, Ng SY, Thoo YY, Wan Aida WM, Ho XW. (2011) Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Int Food Res J.*, 18, 1427-1435.
64. Chizzola R, Lohwasser U, Franz C. (2018) Biodiversity within *Melissa officinalis*: variability of bioactive compounds in a cultivated collection. *Molecules*, 23, Article ID 294, 13 pages. <https://doi.org/10.3390/molecules23020294>.
65. Chrprová D, Kouřimská L, Gordon MH, Heřmanová V, Roubíčková I, Pánek J. (2010) Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech J Food Sci.*, 28, 317-325.
66. Chua LS, Latiff NA, Mohamad M. (2016) Reflux extraction and cleanup process by column chromatography for high yield of andrographolide enriched extract. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 3, 64-70.
67. Ciocarlan N. (2016) Family *Lamiaceae*: main important spontaneous medicinal and aromatic species in the Republic of Moldova. *J Bot.*, 8, 86-91.

-
68. Couto RO, Conceição EC, Chaul LT, Oliveira EMS, Alves SF, Rezende KR, Bara MTF, Oaula JR. (2011) Validated HPLC-PDA method for rosmarinic acid quantification in rosemary. *Lat Am J Pharm.*, 30, 1951-1956.
 69. Craft JD, Satyal P, Setzer WN. (2017) The chemotaxonomy of common sage (*Salvia officinalis*) based on the volatile constituents. *Medicines*, 4, Article ID 47, 12 pages. <https://doi.org/10.3390/medicines4030047>.
 70. Czitrom V. (1999) One-factor-at-a-time versus designed experiments. *Am Stat.*, 53, 126-131.
 71. Dai J, Mumper RJ. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
 72. Dastmalchi K, Dorman HJD, Laakso I, Hiltunen R. (2007) Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. *LWT-Food Sci Technol.*, 40, 1655-1663.
 73. Dauqan EMA, Abdullah A. (2017) Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *J Appl Biol Biotechnol.*, 5, 017-022.
 74. Davidenco V, Seisedos L, Núñez SB, Argüello JA. (2014) Floral transition in *Origanum vulgare* L.: anatomical analysis across phenological stages in response to different photoperiodic regimes. *Chil J Agr Res.*, 74, 349-354.
 75. Davis S. (2017) Herbal antivirals: strengthen your immunity naturally. Book Publishing Company, Summertown, TN, USA.
 76. de Ciriano MG-I, Rehecho S, Calvo MI, Cavero RY, Navarro Í, Astiasarán I, Ansorena D. (2010) Effect of lyophilized water extracts of *Melissa officinalis* on the stability of algae and linseed oil-in-water

- emulsion to be used as a functional ingredient in meat products. *Meat Sci.*, 85, 373-377.
77. de Oliveira G AR, de Oliveira AE, da Conceição EC, Leles MIG. (2016) Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic acid and carnosic acids from rosemary. *Food Chem.*, 211, 465-473.
78. de Oliveira KB, de Oliveira BH. (2013) HPLC/DAD determination of rosmarinic acid in *Salvia officinalis*: sample preparation optimization by factorial design. *J Braz Chem Soc.*, 24, 85-91.
79. de Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A*, 1112, 31-63.
80. Del Ben M, Nocella C, Loffredo L, Bartimoccia S, Cammisotto V, Mancinella M, Angelico F, Valenti V, Cavarretta E, Carnevale R, Violi F. (2020) Oleuropein-enriched chocolate by extra virgin olive oil blunts hyperglycaemia in diabetic patients: Results from a one-time 2-hour post-prandial cross over study. *Clin Nutr.*, 39, 2187-2191.
81. Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Brnčić M, Bosiljkov T, Levaj B. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol Biotechnol.*, 51, 84-91.
82. Destandau E, Michel T, Elfakir C. (2013) Microwave-assisted extraction. In.: *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Rostagno MA, Prado JM. (Eds.), Royal Society Chemistry, Dorchester, UK.

-
83. Devansh M. (2012) *Salvia officinalis* Linn.: relevance to modern research drive. *Planta Activa*, 4, 203-207.
 84. Dontha S. (2016) A review on antioxidant methods. *Asian J Pharm Clin Res.*, 9, 14-32.
 85. Dragović-Uzelac V, Garofulić EI, Jukić M, Penić M, Dent M. (2012) The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols. *Food Technol Biotechnol.*, 50, 377-383.
 86. Duke JA. (2002) Handbook of medicinal herbs. CRC Press, New York, NY, USA.
 87. Duletić-Laušević S, Aradski AA, Kolarević S, Vuković-Gačić B, Oalđe M, Živković J, Šavikin K, Marin PD. (2018) Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) extracts. *J Appl Bot Food Qual.*, 91, 126–134.
 88. Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, Perry NB. (2007) Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chem.*, 101, 1417-1424.
 89. Dvorackova E, Snoblova M, Hrdlicka P. (2014) Content of phenolic compounds in herbs used in the Czech Republic. *Int Food Res J.*, 21, 1495-1500.
 90. Ellis BE, Towers GHN. (1970) Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J.*, 118, 291–297.
 91. European Medicine Agency. Committee on Herbal Medicinal products. Guideline on specifications: test procedures, herbal

- preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. EMA/HMPC/162241/2005 Rev.3, 2018.
92. Exarchou V, Troganis A, Gerothanassis IP, Tsimidou M, Boskou D. (2001) Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Agric Food Chem.*, 49, 2-8.
93. Fachel FNS, Schuh RS, Veras KS, Bassani VL, Koester LS, Henriques AT, Braganhol E, Teixeira HF. (2019) An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: a novel approach to treating neurodegenerative disorders. *Neurochem Int.*, 122, 47-58.
94. Fahr A. (2018) Voigt's Pharmaceutical Technology. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
95. Fatma Ebru K, Ayse A, Caglar K. (2018) Extraction and HPLC Analysis of sage (*Salvia officinalis*) plant. *Nat Prod Chem Res.*, 5, 8 pages. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000298>.
96. Fletcher RS, McAuley C, Kott LS. (2005) Novel *Mentha spicata* clones with enhanced rosmarinic acid and antioxidant activity. *Acta Hortic.*, 680, 31-36.
97. Fonyó Zs, Fábry Gy. (2004) Vegyipari művelettani alapismeretek. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest.
98. Fotovvat M, Radjabian T, Saboora A. (2019) HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia* L. species from Iran. *Rec Nat Prod.*, 13, 37-49.
99. Franco D, Sineiro J, Rubilar M, Sánchez M, Jerez M, Pinelo M, Costoya N, Núñez MJ. (2008) Polyphenols from plant materials:

- extraction and antioxidant power. *Elec J Env Agricult Food Chem.*, 7, 3210-3216.
100. Gadhiya D, Patel A, Prajapati JB. (2015) Current trend and future prospective of functional probiotic milk chocolates and related products – a review. *Czech J Food Sci.*, 33, 295-301.
101. Gafner S, Bergeron C. (2005) The challenges of chemical stability testing of herbal extracts in finished products using state-of-the-art analytical methodologies. *Curr Pharm Anal.*, 1, 203-215.
102. Gedikoğlu A, Sökmen M, Çivit A. (2019) Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Sci Nutr.*, 7, 1704-1714.
103. Ghanadian M, Shamaeezadeh N, Mohammadi P, Mohajeri M. (2018) A new validated high-performance liquid chromatography method for standardization of rosmarinic acid in *Salvia* extracts. *J Herbmед Pharmacol.*, 7, 44-50.
104. Ghorbani A, Esmailizadeh M. (2017) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med.*, 7, 433-440.
105. Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. (2013) Phenolic Acids. In.: Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Ramawat KG, Mérillon JM. (Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg.
106. Gonçalves S, Romano A. (2018) Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. In.: Secondary Metabolites: Sources and Applications. Vijayakumar R, Raja SSS. (Eds.), IntechOpen, London, UK.

-
107. González-Minero FJ, Bravo-Díaz L, Ayala-Gómez A. (2020) *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): an ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*, 7, 77. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040077>
108. Gökbulut A. (2015) Validated RP-HPLC method for quantification of phenolic compounds in methanol extracts of aerial parts and roots of *Thymus sipyleus* and evaluation of antioxidant potential. *Trop J Pharm Res.*, 14, 1871-1877.
109. Grdiša M, Jug-Dujaković M, Lončarić M, Carović-Stanko K, Ninčević T, Liber Z, Radosavljević I, Šatović Z. (2015) Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): a review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agric Conspec Sci.*, 80, 69-78.
110. Gul S, Ahmad M, Zafar M, Bahadur S, Sultana S, Begum N, Shah SN, Zaman W, Ullah F, Ayaz A, Hanif U. (2019) Taxonomic study of subfamily Nepetoideae (Lamiaceae) by polynomorphological approach. *Microsc Res Tech.*, 82, 1021-1031.
111. Gulcin İ. (2020) Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.*, 94, 651-715.
112. Gutiérrez-Grijalva EP, Picos-Salas MA, Leyva-López N, Criollo-Mendoza MS, Vazquez-Olivo G., Heredia JB. (2018) Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7. Article ID 2, 23 pages. <https://doi.org/10.3390/plants7010002>.
113. Habtemariam S. (2016) The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Evid Based Complement Alternat Med.*, Article ID 2680409, 14 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2680409>.

-
- 114.Habtemariam S. (2018) Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: potential seeds for Alzheimer's and vascular dementia drugs. *Int J Mol Sci.*, 19, Article ID 458, 25 pages. <https://doi.org/10.3390/ijms19020458>.
- 115.Hamrouni-Sellami I, Rahali FZ, Rebey IB, Bourgou S, Limam F, Marzouk B. (2012) Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food Bioproc Tech.*, 6, 806-817.
- 116.Han Y, Ma L, Zhao L, Feng W, Zheng X. (2019) Rosmarinic inhibits cell proliferation, invasion and migration via up-regulating miR-506 and suppressing MMP2/16 expression in pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother.*, 115, 108878. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108878>
- 117.Handa SS. (2008) An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In.: Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. (Eds.), International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy.
- 118.Harley RM, Atkins S, Budantsev AI, Cantino PD, Conn BJ, Grayer R, Harley MM, De Kok R, Krestovskaja T, Morales R, Paton AJ, Ryding O, Upson T. (2004) Labiatae. In.: The Families and Genera of Vascular Plants. Kubitzki K. (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg.
- 119.Harnly JM, Bhagwat S, Lin LZ. (2007) Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Anal Bioanal Chem.*, 389, 47-61.

-
- 120.Hasanein P, Zaheri ML. (2014) Effects of rosmarinic acid on an experimental model of painful diabetic neuropathy in rats. *Pharm Biol.*, 52, 1398-1402.
- 121.Hasbay I, Galanakis CM. (2018) Recovery technologies and encapsulation techniques. In.: Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Galanakis CM. (Ed.), Woodhead Publishing, Cambridge, MA, USA.
- 122.Hase T, Shishido S, Yamamoto S, Yamashita R, Nukima H, Taira S, Toyoda T, Abe K, Hamaguchi T, Ono K, Noguchi-Shinohara M, Yamada M, Kobayashi S. (2019) Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci Rep.*, 9, 8711. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45168-1>.
- 123.He D, Wang Z, Yang L, Liu T, Yao Y, Mao Z. (2016) Modeling and optimization of the drug extraction production process. *Sci Program.*, Article ID 3279423, 15 page. <https://dx.doi.org/10.1155/2016/3279423>.
- 124.Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP. (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem.*, 126, 339-346.
- 125.Hou Y, Wu J, Huang Q, Guo L. (2009) Luteolin inhibits proliferation and affects the function of simulated rat synovial fibroblasts. *Cell Biol Int.*, 33, 135-147.

-
- 126.Huang D, Liu YQ, Liang Y, Mao X. (2014) Optimization of extracting condition of active components in Perilla by ultrasonic. *Adv Mat Res.*, 1033-1034, 713-716.
- 127.Hussain SA, Panjagari NR, Singh RRB, Patil GR. (2015) Potential herbs and herbal nutraceuticals: food applications and their interactions with food components. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 55, 94-122.
- 128.ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1A(R2). Stability testing of new Drug Substances and Products, 2003.
- 129.ISO 9909:1997: Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.).
- 130.Jakobek L. (2015) Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.*, 175, 556-567.
- 131.Janicsák G, Máthé I, Miklóssy-Vári V, Blunden G. (1999) Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem Syst Ecol.*, 27, 733-738.
- 132.Jarić S, Mitrović M., Pavlović P. (2015) Review of Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Study of *Thymus serpyllum* L. Evid. Based. Complement. Alternat. Med., Article ID 101978. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/101978>
- 133.Jassbi AR, Miri R, Alizadeh M, Asadollahi M, Massrorbabanari M, Baldwin IT. (2014) Quantification of phenolic diterpenoids and rosmarinic acid in *Salvia eremophila* and *Salvia santolinifolia* by LC-DAD-MS. *Austin Chromatography*, 1, 1-5.
- 134.Javed H, Erum S, Tabassum S, Ameen F. (2013) An overview on medicinal importance of *Thymus vulgaris*. *J Asian Sci Res.*, 3, 974-982.

135. Jirovský D, Kosina P, Myslíňová M, Stýskala J, Ulrichová J, Šimánek V. (2007) HPLC analysis of rosmarinic acid in feed enriched with aerial parts of *Prunella vulgaris* and its metabolites in pig plasma using dual-channel coulometric detection. *J Agric Food Chem.*, 55, 7631-7637.
136. Kaufmann B, Christen P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal.*, 13, 105-113.
137. Kedare SB, Singh RP. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 48, 412-422.
138. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
139. Kim YB, Kim JK, Uddin MR, Xu H, Park WT, Tuan PA, Li X, Chung E, Lee J-H, Park SU. (2013) Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. *PLOS One*, 8, e64199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.006419>.
140. Kim YB, Uddina MR, Kim Y, Park CG, Park SU. (2014) Molecular cloning and characterization of tyrosine aminotransferase and hydroxyphenylpyruvate reductase, and rosmarinic acid accumulation in *Scutellaria baicalensis*. *Nat Prod Commun.*, 9, 1311-1314.
141. Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. (2015) Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med.*, Article ID 403950, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2015/403950>.
142. Kivilompolo M, Hyötyläinen T. (2007) Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs:

- characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatogr A*, 1145, 155-164.
- 143.Korkes Zs. (2004) Rozmaring a magyarországi ünnepekben. In.: A Magyar Mezőgazdasági Múzeum Közleményei 2001-2004. Fehér Gy. (Szerk.), Magyar Mezőgazdasági Múzeum, Budapest.
- 144.Koşar M, Dorman HJD, Hiltunen R. (2005) Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.*, 91, 525-533.
- 145.Kovács R, Sziládi K, Keszthelyi-Szabó G., Beszédes S. (2017) Mérési körülmények hatásának vizsgálata folyadékok dielektromos jellemzőinek meghatározásánál. *Jelenkori társadalmi és gazdasági folyamatok*, 4, 49-59.
- 146.Kremmer T, Torkos K. (2010) Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- 147.Kumadoh D, Ofori-Kwakye K. (2017) Dosage forms of herbal medicinal products and their stability considerations – an overview. *J Crit Rev.*, 4, 1-8.
- 148.Kumar DS. (2016) Herbal bioactives and food fortification: extraction and formulation. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- 149.Kumar S, Pandey AK. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J.*, Article ID 162750, 16 pages. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
- 150.Lagouri V, Nisteropoulou E. (2009) Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. *J Food Lipids*, 16, 484-498.
- 151.Lahtinen SJ, Ouwehand AC, Salminen SJ, Forssell P, Myllärinen P. (2007) Effect of starch- and lipid- based encapsulation on the

-
- culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Lett Appl Microbiol.*, 44, 500-505.
- 152.Lamien-Meda A, Nell M, Lohwasser U, Börner A, Franz C, Novak J. (2010) Investigation of antioxidant and rosmarinic acid variation in the sage collection of the genebank in Gatersleben. *J Agric Food Chem.*, 58, 3813-3819.
- 153.Lamuela-Raventós RM. (2017) Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In.: *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trend and Applications*. Apak R, Capanoglu E, Shahidi F. (Eds.), Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- 154.Lau CH, Chua LS, Lee CT, Aziz R. (2014) Optimization and kinetic modeling of rosmarinic acid extraction from *Orthosiphon stamineus*. *Curr Bioact Compd.*, 10, 271-285.
- 155.Leal F, Taghouti M, Nunes F, Silva A, Coelho AC, Matos M. (2017) *Thymus* plants: a review-micropropagation, molecular and antifungal activity. In.: *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*. El-Shemy H. (Ed.), InTech, Rijeka, Croatia.
- 156.Lee HS. (2000) HPLC analysis of phenolic compounds. In.: *Food Analysis by HPLC*. Nollet LML, Dekker M. (Eds.), CRC Press, New York, NY, USA.
- 157.Leja KB, Czaczyk K. (2016) The industrial potential of herbs and spices – a mini review. *Acta Sci Pol Technol Aliment.*, 15, 353-365.
- 158.Liang Y. (2018) Diffusion. In.: *Encyclopedia of Geochemistry*. White, WM. (Ed.), Springer, Ithaca, NY, USA.
- 159.Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, Kong M, Li L, Zhang Q, Liu Y, Chen H, Qin W, Wu H, Chen S. (2016) An overview of plant

- phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21, 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>.
- 160.Liu J, Wan Y, Zhao Z, Chen H. (2013) Determination of the content of rosmarinic acid by HPLC and analytical comparison of volatile constituents by GC-MS in different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Chem Cent J.*, 7, 61. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-61>
- 161.Liu T, Sui X, Zhang R, Yang L, Zu Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang Z. (2011) Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *J Chromatogr A*, 1218, 8480-8489.
- 162.Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, 4, 118-126.
- 163.Lončarević I, Pajin B, Fišteš A, Šaponjac VT, Petrović J, Jovanović P, Vulić J, Zarić D. (2018) Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. *LWT-Food Sci Technol.*, 92, 458-464.
- 164.Lopresti AL. (2017) Salvia (sage): a review of its potential cognitive-enhancing and protective effects. *Drugs R D.*, 17, 53-64.
- 165.Lovrić V, Putnik P, Kovačević DB, Jukić M, Dragović-Uzelac V. (2017) Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol Biotechnol.*, 55, 243-250.

-
166. Luis JC, Johnson CB. (2005) Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their *in vitro* antiradical activity. *Span J Agric Res.*, 3, 106-112.
167. Mahboubi M. (2021) *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *J. Tradit. Complement Med.*, 11, 75-81.
168. Mahendran G, Rahman L-U. (2020) Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha x piperita* L.) – a review. *Phytother. Res.*, 34, 2088-2139.
169. Makri O, Kintzios S. (2004) In vitro rosmarinic acid production: an update. In.: *Biotechnology of Medicinal Plants: Vitalizer and Therapeutic*. Ramawat KG. (Ed.), CRC Press, Enfield, CT, USA.
170. Mandal S, Hati S, Puniya AK, Singh R, Singh K. (2012) Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *J Food Process Preserv.*, 37, 1031-1037.
171. Manousi N, Sarakatsianos I, Samanidou V. (2018) Extraction techniques of phenolic compounds and other bioactive compounds from medicinal and aromatic plants. In.: *Engineering Tools in The Beverage Industry*. Grumezescu AM, Holban AM (Eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, MA, USA.
172. Mărculescu A, Vlase L, Hanganu D, Drăgulescu C, Antonie I, Neli-Kinga O. (2007) Polyphenols analysis from *Thymus* species. *Proc Rom Acad, Series B*, 3, 117-121.
173. Maróti P, Laczkó G. (2013) *Bevezetés a biofizikába*. JATE Press, Szeged.
174. Mehrabani M, Ghassemi N, Sajjadi E, Ghannadi A, Shams-Ardakani M. (2005) Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum*

- fisch. and C.A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. *Daru*, 13, 65-69.
175. Mekinić IG, Skroza D, Ljubenkov I, Šimat V, Možina SS, Katalinić V. (2014) *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: a correlation study. *Food Technol Biotech.*, 52, 119-127.
176. Mena P, Cirlini M, Tassotti M, Herrlinger KA, Dall’asta C, Del Rio D. (2016) Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Molecules*, 21, Article ID 1576, 15 pages. <https://doi.org/10.3390/molecules21111576>.
177. Milevskaya VV, Temerdashev ZA, Butyl’skaya TS, Kiseleva NV. (2017) Determination of phenolic compounds in medicinal plants from the Lamiaceae family. *J Anal Chem.*, 72, 342–348.
178. Mishra LK, Sarkar D, Shetty K. (2020) Human health-relevant bioactives and associated functionalities of herbs in the Lamiaceae family. In: Shetty K, Sarkar D (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
179. Mohamadi M, Mostafavi A, Torkzadeh-Mahani M. (2015) Voltammetric determination of rosmarinic acid on chitosan/carbon nanotube composite-modified carbon paste electrode covered with DNA. *J Electrochem Soc.*, 162, B344-B349.
180. Moini J. (2015) Fundamental pharmacology for pharmacy technicians, Cengage Learning, Mason, OH, USA.
181. Montagna MT, Diella G, Triggiano F, Caponio GR, De Giglio O, Caggiano G, Di Ciaula A, Portincasa P. (2019) Chocolate, “food of

- the gods”: history, science, and human health. *Int J Environ Res Public Health*, 16, 49560. <https://doi.org/10.3390/ijerph16244960>.
182. Moon H-K, Smets E, Huysmans S. (2010) Phylogeny of tribe Mentheae (Lamiaceae): the story of molecules and micromorphological characters. *Taxon*, 59, 1065-1076.
183. Moore J, Megaly M, MacNeil AJ, Klentrou P, Tsiani E. (2016) Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. *Biomed Pharmacother.*, 83, 725-732.
184. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A, Meftahizade H. (2010) *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: a review. *J Med Plant Res.*, 4, 2753-2759.
185. Moss GP. (2000) Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC recommendations 2000). *Pure Appl Chem.*, 72, 1493-1523.
186. Mourtzinos I, Goula A. (2019) Polyphenols in agricultural byproducts and food waste. In.: Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA.
187. Muhammad DRA, Tuener E, Patria GD, Foubert K, Pieters L, Dewettinck K. (2021) Phytochemical composition and antioxidant of *Cinnamomum burmannii* Blume extracts and their potential application in white chocolate. *Food Chem.*, 340, 127983. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127983>.
188. Murray MT. (2020) *Mentha piperita* (Peppermint). In.: Textbook of Natural Medicine. Pizzorno J.E and Murray M.T. (Eds.), Churchill Livingstone, London, UK.

-
- 189.Müller J, Heindl A. (2006) Drying of medicinal plants. In.: Medicinal and Aromatic Plants – Agricultural, Commercial, Ecological, Legal, Pharmacological and Social Aspects. Bogers RJ, Craker, LE, Lange D. (Eds.), Springer, New York, NY, USA.
- 190.Nair AT, Makwana AR, Ahammed MM. (2014) The use of response surface methodology for modelling and analysis of water and wastewater treatment processes: a review. *Water Sci Technol.*, 464-478.
- 191.Nemes A, Stefanovitsné-Bányi É, Remenyik J. (2015) Új mérési eljárás fejlesztése a növényi antioxidáns státusz meghatározására. *Agrártud Közl.*, 63, 105-112.
- 192.Ngaha Njila MI, Mahdi E, Massoma Lembe D, NDE, Z., Nyonseu, D. (2017) Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites. 7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences (ACBES-2017) May 22-24, 2017 Kuala Lumpur (Malaysia).
- 193.Ngo YL, Lau CH, Chua LS. (2018) Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food Chem Toxicol.*, 121, 687-700.
- 194.Noguchi-Shinohara M, Ono K, Hamaguchi T, Iwasa K, Nagai T, Kobayashi S, Nakamura H, Yamada M. (2015) Pharmacokinetics, safety and tolerability of *Melissa officinalis* extract which contained rosmarinic acid in healthy individuals: a randozimed controlled trial. *PLOS One*, 10, e0126422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126422>.

- 195.Nour V, Trandafir I, Cosmulescu S. (2013) HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. *J Chromatogr Sci.*, 51, 883-890.
- 196.Olennikov DN, Tankhaeva LM. (2010) Quantitative determination of phenolic compounds in *Mentha piperita* leaves. *Chem Nat Compd.*, 46, 22-27.
- 197.Oliveira AS, Ribeiro-Santos R, Ramos F, Castilho MC, Sanches-Silva A. (2018) UHPLC-DAD multi-method for determination of phenolics in aromatic plants. *Food Anal Methods*, 11, 440-450.
- 198.Ondrejovič M, Benkovičová H, Šilhár S. (2009) Optimization of rosmarinic acid extraction from lemon balm (*Melissa officinalis*). *Nova Biotechnol.*, 9, 175-182.
- 199.Oniga I, Pușcaș C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, Marcus I, Sevastre-Berghian AC, Benedec D, Pop CE, Hanganu D. (2018) *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: chemical composition and biological studies. *Molecules*, 23, 2077. <https://doi.org/10.3390/molecules23082077>.
- 200.Oniszczyk A, Hawryl A. (2011) Sample preparation of plant material. In.: High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Hajnos MW, Sherma J. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- 201.Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. (2019) Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. In.: Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Watson RR. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA.

- 202.Ozarowski M, Mikolajczak PL, Piasecka A, Kachlicki P, Kujawski R, Bogacz A, Bartkowiak-Wieczorek J, Szulc M, Kaminska E, Kujawska M, Jodynis-Liebert J, Gryszczynska A, Opala B, Lowicki Z, Seremak-Mrozikiewicz A, Czerny B. (2016) Influence of the *Melissa officinalis* leaf extract on long-term memory in scopolamine animal model with assessment of mechanism of action. *Evid Based Complement Alternat Med.*, Article ID 9729818, 17 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9729818>.
- 203.Ozcan T, Akpinar-Bayizit A, Yilmaz-Ersan L, Delikanli B. (2014) Phenolics in human health. *Int J Chem Eng Appl.*, 5, 393-396.
- 204.Pakowski Z, Mujudar AS. (2007) Drying of pharmaceutical products. In.: Handbook of Industrial Drying. Mujumdar AS. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- 205.Pandey KB, Rizvi SI. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.*, 2, 270-278.
- 206.Paniwnyk L, Cai H, Albu S, Mason TJ, Cole R. (2009) The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrason Sonochem.*, 16, 287-292.
- 207.Papoti VT, Totomis N, Atmatzidou A, Zinoviadou K, Androulaki A, Petridis D, Ritzoulis C. (2019) Phytochemical content of *Melissa officinalis* L. herbal preparations appropriate for consumption. *Processes*, 7, 88. <https://doi.org/10.3390/pr7020088>.
- 208.Parnham MJ, Kesselring K. (1985) Rosmarinic acid. *Drug Future*, 10, 756-757.
- 209.Peev G, Penchev P, Peshev D, Angelov G. (2011) Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by

- nanofiltration: effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide. *Chem Eng Res Des.*, 89, 2236-2243.
- 210.Percival SS, Turner RE. (2001) Applications of herbs to functional foods. In.: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Wildman REC. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- 211.Pereira OR, Peres AM, Silva AMS, Domingues MRM, Cardoso SM. (2013) Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x Citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method. *Food Res Int.*, 54, 1773-1780.
- 212.Petkova N, Ivanov I, Mihaylova D, Krastanov A. (2017) Phenolic acids content and antioxidant capacity of commercially available *Melissa officinalis* L. teas in Bulgaria. *Bulg Chem Commun.*, 49, 69-74.
- 213.Petri G. (2006) Gyógynövények és készítményeik a terápiában. Galenus Kiadó, Budapest.
- 214.Petrovska BB. (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev.*, 6, 1-5.
- 215.Petyaev IM, Bashmakov YK. (2017) Dark chocolate: opportunity for and alliance between medical science and the food industry? *Front Nutr.*, 4, Article ID 43, 8 pages. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00043>.
- 216.Ph.Hg. VIII. (2002a) Thymi aetheroleum. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 04/2002:1374.
- 217.Ph.Hg. VIII. (2009) Melissae folium, VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 04/2009:1447.
- 218.Ph.Hg. VIII. (2014) Thymi herba. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 07/2014:0865.

-
- 219.Ph.Hg.VIII (2002c) Rosmarini folium. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 01/2002:1560.
- 220.Ph.Hg.VIII (2002d): Rosmarini aetheroleum. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 04/2002:1846.
- 221.Ph.Hg.VIII. (2002b) Salviae tinctura. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 04/2002:1889.
- 222.Ph.Hg.VIII. (2008a) Origani herba. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 01/2008:1880.
- 223.Ph.Hg.VIII. (2008b) Kivonatok. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 04/2008/0765.
- 224.Ph.Hg.VIII. (2010a) Menthae piperitae folium. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 01/2010:0406.
- 225.Ph.Hg.VIII. (2010b) Melissa folii extractum siccum. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 01/2010:2524.
- 226.Ph.Hg.VIII. (2012a) Menthae piperitae aetheroleum. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 07/2012:0405.
- 227.Ph.Hg.VIII. (2015) Salviae officinalis folium. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 01/2015:1370.
- 228.Ph.Hg.VIII. (2017) Menthae piperitae folii extractum siccum. VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, 07/2017:2382.
- 229.Polereczki Zs, Barna F, Prokisch L, Kovács S, Kontor E, Szakály Z. (2019) A gyógynövények fogyasztásának jellemzői Magyarországon. *ÉVIK.*, 65, 1-18.
- 230.Poós T, Varju E. (2017) Drying characteristics of medicinal plants. *Int Rev Appl Sci Eng.*, 8, 83-91.

231. Possemiers S, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T. (2010) Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *Int J Food Microbiol.*, 141, 97-103.
232. Poştaru M, Kloetzer L, Galaction AI, Blaga AC, Caşcaval D. (2014) Comparative study on rosmarinic acid separation by reactive extraction with amberlite LA-2 and D2EPHA2. kinetics of the interfacial reactions. *Environ Eng Manag J.*, 13, 1473-1482.
233. Prosen H, Pendry B. (2016) Determination of shelf life of *Chelidonium majus*, *Sambucus nigra*, *Thymus vulgaris* and *Thymus serpyllum* herbal tinctures by various stability-indicating tests. *Phytochem Lett.*, 16, 311-323.
234. Putnik P, Kovačević DB, Penić M, Fegeš M, Dragović-Uzelac V. (2016) Microwave-assisted extraction (MAE) of Dalmatian Sage leaves for the optimal yield of polyphenols: HPLC-DAD identification and quantification. *Food Anal Methods*, 9, 2385-2394.
235. Qu X, Wu CFJ. (2005) One-factor-at-a-time designs of resolution V. *J Stat Plan Inference*, 131, 407-416.
236. Rácz G, Rácz-Kotilla E, Szabó LGy. (2012) Gyógynövények ismerete - a fitoterápia és az alternatív medicina alapjai. Galenus Kiadó, Budapest.
237. Radušienė J, Ivanauskas L, Janulis V, Jakštis V. (2008) Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania. *Biologija*, 54, 45-49.
238. Rajbhar K, Dawda H, Mukundan U. (2015) Polyphenols: methods of extraction. *Sci Revs Chem Commun.*, 51, 1-6.
239. Ramanauskienė K, Raudonis R, Majiene D. (2016) Rosmarinic acid and *Melissa officinalis* extracts differently affect glioblastoma cells.

Oxid Med Cell Longev., Article ID 1564257, 9 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1564257>.

240. Randhir R, Lin Y-T, Shetty K. (2004) Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.*, 39, 637-646.
241. Raudone L, Zymone K, Raudonis R, Vainoriene R, Motiekaityte V, Janulis V. (2017) Phenological changes in triterpenic and phenolic composition of *Thymus L.* species. *Ind Crops Prod.*, 109, 445–451.
242. Razboršek MI. (2011) Stability studies on *trans*-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product. *J Pharm Biomed Anal.*, 55, 1010-1016.
243. Rita P, Animesh DK. (2011) An updated overview on peppermint (*Mentha piperita L.*). *Int Res J Pharm.*, 2, 1-10.
244. Robbins RJ. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.*, 51, 2866-2887.
245. Rogovská V, Čukanová M. (2015) Chocolate as a functional food. Article was published within conference: Era of Science Diplomacy: Implications for Economics, Business, Management and Related Disciplines (EDAMBA 2015). *Vydavateľstvo Ekonom*, Slovakia.
246. Romm A, Ganora L, Hoffmann D, Yarnell E, Abascal K, Coven M. (2010) Fundamental principles of herbal medicine. In.: *Botanical Medicine for Women's Health*. Romm A. (Ed.), Churchill Livingstone, London, UK.
247. Routray W, Orsat V. (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technol.*, 5, 409-424.

248. Runha FP, Cordeiro DS, Pereira CAM, Vilegas J, Oliveira WP. (2001) Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation. *Food Bioprod Process.*, 79, 160-168.
249. Runtuwene J, Cheng K-C, Asakawa A, Amitani H, Amitani M, Morinaga A, Takimoto Y, Kairupan BHR, Inui A. (2016) Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCCK and GLUT4. *Drug Des Devel Ther.*, 10, 2193-2202.
250. Sadeghi A, Hakimazdeh V, Karimifar B. (2017) Microwave assisted extraction of bioactive compounds from food: a review. *Int J Food Sci Nutr Eng.*, 7, 19-27.
251. Sagarika N, Prince MV, Sreeja R. (2017) Review on microwave assisted extraction technique. *Int J Pure Appl Biosci.*, 5, 1065-1074.
252. Salehi B, Stojanović-Radić Z, Matejić J, Sharopov F, Antolak H, Kręgiel D, Sen S, Sharifi-Rad M, Acharya K, Sharifi-Rad R, Martorell M, Sureda A, Martins N, Sharifi-Rad J. (2018) Plants of genus *Mentha*: from farm to food factory. *Plants*, 7, Article ID 70, 36 pages. <https://doi.org/10.3390/plants7030070>.
253. Salihovic M, Dilberovic B, Toromanovic J, Tahirovic I, Krvavac J, Sofic E. (2010) Quantification of rosmarinic acid and caffeic acid in some plants of family Lamiaceae using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Planta Med.*, 76, Article ID 12. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1264588>.
254. Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. (2013) The Folin-Ciocalteu assay revisited:

- improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods*, 5, 5990-5999.
- 255.Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, Gonzalez-Paramas AM. (2012) Extraction and isolation of phenolic compounds. In.: Natural Products Isolation – Methods in Molecular Biology. Sarker S, Nahar L. (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- 256.Santos-Buelga C, González-Paramás AM, Oludemi T, Ayuda-Durán B, González-Manzano S. (2019) Plant phenolics as functional food ingredients. *Adv Food Nutr Res.*, 90, 183-257.
- 257.Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 8, 1-10.
- 258.Satyaj P, Murray BL, McFeeters RL, Setzer W.N. (2016) Essential oil characterization of *Thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods*, 5, 70. <https://doi.org/10.3390/foods5040070>.
- 259.Scheckel KA, Degner SC, Romagnolo DF. (2008) Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr.*, 138, 2098-2105.
- 260.Seidel V. (2006) Initial and bulk extraction. In.: Natural Products Isolation. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- 261.Seo JH, Kim JE, Shim JH, Yoon G, Bang MA, Bae CS, Lee KJ, Park DH, Cho SS. (2016) HPLC analysis, optimization of extraction conditions and biological evaluation of *Corylopsis coreana* uyeki flos. *Molecules*, 21, 94. <https://doi.org/10.3390/molecules21010094>.

262. Shafaei A, Saeed MAA, Hamil MSR, Ismail Z. (2018) Application of high performance liquid chromatography and Fourier-transform infrared spectroscopy techniques for evaluating the stability of *Orthosiphon aristatus* ethanolic extract and its nano liposomes. *Rev Bras Farmacogn.*, 28, 658-668.
263. Shah SR, Alweis R, Najim NI, Dharani AM, Jangda MA, Shahid M, Kazi AN, Shah SA. (2017) Use of dark chocolate for diabetic patients: a review of the literature and current evidence. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.*, 7, 218-221.
264. Shahidi F, Yeo JD. (2016) Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21, 1216. <https://doi.org/10.3390/molecules21091216>.
265. Shakeri A, Sahebkar A, Javasi B. (2016) *Melissa officinalis* L. – a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, 188, 204-228.
266. Sharifi-Rad M, Ozcelik B, Altın G, Daşkaya-Dikmen C, Martorell M, Ramírez-Alarcón K, Alarcón-Zapata P, Morais-Braga MFB, Carneiro JNP, Leal ALAB, Coutinho HDM, Gaywali R, Tahergorabi R, Ibrahim SA, Sahrifi-Rad R, Sharopov F, Salehi B, del Contreras MM, Segura-Carretero A, Sen S, Acharya K, Sharifi-Rad J. (2018) *Salvia* spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends Food Sci Technol.*, 80, 242-263.
267. Sharma OP. (2009) Plant Taxonomy. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, West Patel Nagar, New Delhi.
268. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. (2012) Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiateae family. *Pharmacogn Mag.*, 8, 37-41.

-
269. Shen T, Wang X-N, Lou H-X. (2009) Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep.*, 26, 916-935.
270. Sik B, Hanczné EL, 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>.
271. Sim LY, Abd Rani NZ, Husain K. (2019) Lamiaceae: an insight on their anti-allergic potential and its mechanism of actions. *Front Pharmacol.*, 10, Article ID 677, 36 pages. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00677>.
272. Singh A, Orsat V. (2015) Key considerations in the selection of ingredients and processing technologies for functional foods and nutraceutical products. In.: *Nutraceutical and Functional Food Processing Technology*. Boye JI. (Ed.), Wiley Online Library, Hoboken, NJ, USA.
273. Singh J. (2008) Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In.: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. (Eds.), International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy.
274. Singh P, Kothiyal P, Ratan P. (2018) Pharmacological and phytochemical studies of *Origanum vulgare*: a review. *Int Res J Pharm.*, 9, 30-35.
275. Singh R, Shushni MAM, Belkheir A. (2015) Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab J Chem.*, 8, 322-328.

-
276. Singletary K. (2010) Oregano: overview of the literature on health benefits. *Nutr Today*, 45, 129-138.
277. Singleton VL, Rossi JA. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.*, 16, 144-158.
278. Sirerol JA, Rodríguez ML, Mena S, Asensi MA, Estrela JM, Ortega AL. (2016) Role of natural stilbenes in the prevention of cancer. *Oxid Med Cell Longev.*, Article ID 3128951, 15 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3128951>.
279. Skendi A, Irakli M, Chatzopoulou P. (2017) Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 6, 62-69.
280. Skowyra M, Falguera V, Azman NAM, Segovia F, Almajano MP. (2014) The effect of *Perilla frutescens* extract on the oxidative stability of model food emulsions. *Antioxidants*, 3, 38-54.
281. Suhaimi SH, Hasham R, Idris MKH, Ismail HF, Ariffin NHM, Majid FAA. (2019) Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions followed by solid phase extraction fractionation from *Orthosiphon stamineus Benth (Lamiaceae)* leaves for antiproliferative effect on prostate cancer cells. *Molecules*, 24, Article ID 4183, 20 pages. <https://doi.org/10.3390/molecules24224183>.
282. Sundaram S, Tripathi A, Gupta DK. (2010) Metabolic modeling of rosmarinic acid biosynthetic pathway. *Bioinformation*, 5, 168-172.
283. Suwanchaikasem P, Chaichantipyuth C, Sukrong S. (2014) Antioxidant-guided isolation of rosmarinic acid, a major constituent from *Thunbergia laurifolia*, and its use as a bioactive marker for standardization. *Chiang Mai J Sci.*, 41, 117-127.

284. Suzuki S, Umezawa T. (2007) Biosynthesis of lignans and norlignans. *J Wood Sci.*, 53, 273-284.
285. Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A. (2018) Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 102, 7775-7793.
286. Świsłocka R, Regulska E, Karpińska J, Świdorski G, Lewandowski W. (2019) Molecular structure and antioxidant properties of alkali metal salts of rosmarinic acid. Experimental and DFT studies. *Molecules*, 24, Article ID 2645, 22 pages. <https://doi.org/10.3390/molecules24142645>.
287. Szőke É, Balázs A, Blázovics A, Kéry Á, Kursinszki L, Lemberkovics É, Then M, Alberti-Dér Á, Balogh Gy, Bányai P, Blazics B, Böszörményi A, Kalász H, Köczöl Á, Lugasi A, Szarka Sz, Szentmihályi K, Vasas G. (2012) Gyógynövény és drogismeret farmakognózia – fitokémia, gyógynövények alkalmazása. Semmelweis Egyetem, Budapest.
288. Takano H, Osakabe N, Sanbongi C, Yanagisawa R, Inoue K-I, Yasuda A, Natsume M, Baba S, Ichiishi E-I, Yoshikawa T. (2004) Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp Biol Med.*, 229, 247-254.
289. Tal Friedman ND. (2015) The effect of rosmarinic acid on immunological and neurological systems: a basic science and clinical review. *J Restor Med.*, 4, 50-59.
290. Tamsamani H, Krisa S, Mérillon J-M, Richard T. (2015) Promising neuroprotective effects of oligostilbenes. *Nutr Aging.*, 3, 49-54.

291. Tohma H, Köksal E, Kılıç Ö, Alan Y, Yılmaz MA, Gülçin İ, Bursal E, Alwasel SH. (2016) RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia* L. species. *Antioxidants*, 5, Article ID 38, 15 pages. <https://doi.org/10.3390/antiox5040038>.
292. Tomaz I, Huzanić N, Preiner D, Stupić D, Andabaka Ž, Malatić E, Kontić JK, Ašperger D. (2019) Extraction methods of polyphenol from grapes: extraction of grape polyphenols. In.: *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Watson RR. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA.
293. Tóth J, Mrlianová M, Tekel'ová D, Koreňová M. (2003) Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Acta Fac Pharm Univ Comen.*, 50, 139-146.
294. Trivellini A, Lucchesini M, Maggini R, Mosadegh H, Villamarin TSS, Vernieri P, Mensuali-Sodi A, Pardossi A. (2016) *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Ind Crops Prod.*, 83, 241–254.
295. Trute A, Nahrstedt A. (1996) Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and determination of rosmarinic acid in *Hedera helix*. L. *Phytochem Anal.*, 7, 204-208.
296. Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
297. Tuenter E, Sakavitsi ME, Rivera-Mondragón A, Hermans N, Foubert K, Halabalaki M, Pieters L. (2020) Ruby chocolate: a study of its phytochemical composition and quantitative comparison with dark,

-
- milk and white chocolate. *Food Chem.*, 128446, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128446>.
298. Turcsányi G. (1995) Mezőgazdasági növénytan. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
299. Tzima K, Brunton NP, Rai DK. (2018) Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in *Lamiaceae* plants – a review. *Plants*, **7**, Article ID 25, 30 pages. <https://doi.org/10.3390/plants7020025>.
300. Urbańska B, Derewiaka D, Lenart A, Kowalska J. (2019) Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *Eur Food Res Technol.*, **245**, 2101-2112.
301. Veggi PC, Martinez J, Meireles AA. (2013) Fundamentals of microwave extraction. In.: Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice. Chemat F, Cravotto G. (Eds.), Springer, New York, NY, USA.
302. Venkatachalam K, Gunasekaran S, Jesudoss VAS, Namasivayam N. (2013) The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Exp Toxicol Pathol.*, **65**, 409-418.
303. Verma N. (2016) Current regulatory challenges and approaches in the registration of herbal drugs in Europe. *Clin Res Regul Aff.*, **33**, 9-24.
304. Wahid Z, Nadir N. (2013) Improvement of one factor at a time through design of experiments. *World Appl Sci J.*, **21**, 56-61.
305. Walch SG, Tinzoh LN, Zimmermann BF, Stühlinger W, Lachenmeier DW. (2011) Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality indicators for aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Front Pharmacol.*, **2**, Article ID 79, 6 pages. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00079>.

306. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.*, 87, 307-311.
307. Wang ZL, Finlay WH, Pepler MS, Sweeney L.G. (2006) Powder formation by atmospheric spray-freeze-drying. *Powder Technol.*, 170, 45-52.
308. WHO, 2019. WHO global report on traditional and complementary medicine. World Health Organization, Geneva.
309. Widmer TL, Laurent N. (2006) Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. *Eur J Plant Pathol.*, 115, 377–388.
310. Wollinger A, Perrin É, Chahboun J, Jeannot V, Touraud D, Kunz W. (2016) Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *C R Chim.*, 19, 754-765.
311. Wu C-F, Hong C, Klauck SM, Lin Y-L, Efferth T. (2015) Molecular mechanisms of rosmarinic acid from *Salvia miltiorrhiza* in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Ethnopharmacol.*, 176, 55-68.
312. Xu C-C, Wang B, Pu Y-Q, Tao J-S, Zhang T. (2017) Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chin J Nat Med.*, 15, 721-731.
313. Yam MF, Mohamed EAH, Ang LF, Pei L, Darwis Y, Mahmud R, Asmawi MZ, Basir R, Ahmad M. (2012) A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of sinensetin, eupatorin, and 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone in *Orthosiphon stamineus* extracts. *J Acupunct Meridian Stud.*, 5, 176-182.

314. Yang YK, Lee SY, Park WT, Park NI, Park SU. (2010) Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Nepeta cataria* L. *Plant Omics*, 3, 190-193.
315. Zangeneh N, Azizian A, Lye L, Popescu R. (2002) Application of response surface methodology in numerical geotechnical analysis. 55th Canadian Society for Geotechnical Conference, Hamilton, Ontario
316. Zgórká G, Główniak K. (2001) Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *J Pharm Biomed Anal.*, 26, 79-87.
317. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.*, 13, Article ID 20, 26 pages. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
318. Zhang Y, Smuts JP, Dodbiba E, Rangarajan R, Lang JC, Armstrong DW. (2012) Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *J Agric Food Chem.*, 60, 9305-9314.
319. Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, Tamura H. (2014) Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from Perilla leaves. *J Agric Food Chem.*, 62, 885–892.
320. Ziaková A, Brandšteterová E. (2003) Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some *Lamiaceae* family plants. *J Liq Chrom Relat Tech.*, 26, 443-453.
321. Zimmermann BF, Walch SG, Tinzoh LN, Stühlinger W, Lachenmeier DW. (2011) Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous

infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *J Chromatogr B*, 879, 2459–2464.

322. Zorić Z, Markić J, Pedisić S, Bučević-Popović V, Generalić-Mekinić I, Grebenar K, Kulišić-Bilušić, T. (2016) Stability of rosmarinic acid in aqueous extracts from different Lamiaceae species after in vitro digestion with human gastrointestinal enzymes. *Food Technol Biotechnol.*, 54, 97-102.
323. Zu G, Zhang R, Yang L, Ma C, Zu Y, Wang W, Zhao C. (2012) Ultrasound - assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. *Int J Mol Sci.*, 13, 11027-11043.

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani az Élelmiszertudományi Tanszék vezetőjének Hanczné Dr. Lakatos Erikának, hogy biztosította a feltételeket doktori munkám elvégzéséhez továbbá, hogy segítségével megismerhettem a tanszék és a kutatómunka világát azáltal, hogy korábbi tanulmányaim során, mint témavezetőm mindig mellettem állt.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Ajtony Zsoltnak, aki végig kiemelt figyelemmel és fáradtságot nem kímélve irányította munkámat, ellátott ötletekkel, konstruktív kritikákkal. Köszönöm neki a munkámhoz szükséges szakmai tudásának átadását.

Köszönöm Dr. Kapcsándi Viktóriának, hogy pozitív gondolkodásmódjával és segítő támogatásával, mint társtémavezető egyengette utamat.

Hálával tartozom Dr. Székelyhidi Rita egyetemi adjunktusnak, hogy a doktoranduszi képzésem utolsó évében segítségemre volt az élelmiszerkémia oktatási feladatok ellátásában, ezáltal jelentős mértékben hozzájárulva ahhoz, hogy dolgozatom még tökéletesebb legyen.

Köszönet illeti a jelenlegi és volt hallgatóimat, akiktől jómagam is sokat tanulhattam.

Külön köszönöm a hegyeshalmi Adler Gyógyszertár dolgozóinak, hogy rendelkezésemre bocsátották a jelenleg hatályban lévő VIII. Magyar Gyógyszerkönyvet.

Továbbá köszönetemet fejezem ki a Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék minden munkatársának, hogy emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban hálás vagyok családomnak és páromnak, akik mindvégig támogattak és bíztak bennem. Külön köszönöm nekik mindazt a szeretetet és türelmet, mely biztosította, hogy ideáig eljuthassak.

A kutatás az ÚNKP-19-3-I-SZE-11, az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 és az EFOP-3.6.2-16-2017-00012 azonosítószámú projektek támogatásával jöhetett létre.