

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék

**Alkaloid koncentráció szabályozása macskakarom (*Uncaria
Tomentosa* [Willd.] DC) kivonatokban hagyományos kevertetés
extrakcióval**

TDK Dolgozat

Készítette:

DÉVÉNYI DÁNIEL

BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Székely Edit

Egyetemi docens

Konzulens:

Calvo García Alba

Doktoráns

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	4
1 Bevezetés és célkitűzés	5
2 Irodalmi áttekintés	6
2.1 Macskakarom	6
2.1.1 A macskakarom főbb hatóanyagai	8
2.1.1.1 <i>Alkaloidok</i>	8
2.1.1.1.1 Alkaloidok analitikai vizsgálata	10
2.1.1.2 <i>Tanninok</i>	11
2.1.1.3 <i>Triterpének</i>	11
2.1.2 A macskakarom jellemző biológiai hatásai.....	12
2.1.2.1 <i>Immunstimuláló hatás</i>	12
2.1.2.2 <i>Gyulladáscsökkentő hatás</i>	13
2.1.2.3 <i>Antioxidáns hatás</i>	13
2.1.2.4 <i>Rákellenes hatás</i>	13
2.1.2.5 <i>Kivonatok toxicitása és biztonságos használata</i>	14
2.1.3 Macskakarom alapú termékek.....	15
2.2 Extrakció	15
2.2.1 Fogalma és csoportosítása	15
2.2.2 Szilárd – folyadék az ún. diffúziós extrakció.....	15
2.2.3 Oldószer kiválasztás szempontjai.....	17
2.2.4 Kevertetési extrakció az ún. macerálás	18
2.2.4.1 <i>Macskakarom kevertetési extrakciójának optimalizálása</i>	20
2.2.5 Citromsav hatása az extrakcióra és a kivonatra.....	20
3 Anyagok és módszerek	22
3.1 Felhasznált anyagok	22
3.2 Szárazanyag-tartalom mérése.....	23
3.3 Extrakció	23
3.4 Alkaloidok mennyiségi meghatározása.....	24
3.4.1 Mintaelőkészítés	24
3.4.2 HPLC módszer	25
3.5 Szabadgyök-fogó képesség mérése	27
3.6 Tannin vizsgálata a mintákban	27
3.6.1 Meghatározási módszer leírása.....	28
3.7 Számítási módszerek	28

4	Eredmények	30
4.1	Drog – oldószer arány vizsgálata	30
4.2	Hőmérséklet és extrakciós lépésszám hatása az extrakcióra.....	30
4.3	Az extrakció idejének hatása a kihozatalra	32
4.4	Citromsav és az etanol együttes hatása az extrakcióra.....	33
4.5	Szabadgyök-fogó képesség	38
4.6	Tanninok mennyisége.....	39
5	Összefoglalás	42
6	Irodalomjegyzék	44

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban Dr. Székely Editnek szeretnék köszönetet mondani a rengeteg segítségért és hogy a kutatócsoportban lehetőséget biztosított.

Köszönöm Calvo García Alba doktorandusznak, hogy tanácsaival és tapasztalataival segítette a munkámat, továbbá az általa biztosított barátságos légkörért a laborban.

Hálával tartozom Benkéné Lődy Ilonának a számtalan technikai segítségért és a tanácsaiért.

Köszönet illeti Kószó Bence Dávidot az analitikai mérésekben nyújtott segítségért.

Köszönöm továbbá Höltzlné Plánder Szabina, Kormos Nóra, Kőrösi Márton, Ricardo Borges és Varga Zsófia segítségét.

Végző soron szeretném megköszöni családomnak és barátaimnak a támogatást.

Dolgozatomat édesapám emlékének ajánlom.

1 Bevezetés és célkitűzés

Az elmúlt években egyre jelentősebb érdeklődés mutatkozik a természetes növényi eredetű termékek iránt, amely köszönhető az egészséges táplálkozásra való törekvés, illetve a természetes gyógyszertermékek iránti kereslet erősödésének.

A gyógynövények története egyidős az emberiséggel. Kezdetben csak táplálkozási célokra, később, miután felfedezték jótékony hatásukat, bizonyos betegségek ellen és az egészség fenntartása érdekében fogyasztották számos közösségben. [1] A fennmaradt tradicionális népi jegyzékek alapján elmondható, hogy Ázsiában alakultak ki a legnagyobb gyógynövényt gyógyításra használó kultúrák, mint India és Kína, amely annak köszönhető, hogy a jó éghajlati adottságuk miatt a gyógynövények száma igen nagy.[2] A görögöknél Hippokratész idején élte virágzását a gyógynövény ismeret. [3] Hazánkban legkorábbról fent maradt gyógynövényeket tartalmazó könyvet a Herbariumot 1578-ban Kolozsvárott nyomtatták. Ebben 1236 magyar növénynév szerepelt, amelyek közül több mint 100 ma is gyógynövényként ismert.[4] Miután a 20. században általánossá váltak a szintetikus úton előállított hatóanyagok, fokozatosan leváltották a gyógyhatású növényeket, melynek fő oka a költségekben és a termelékenységben keresendő. Napjainkban azonban a szintetikus gyógyszerekbe vetett hit gyengül és mellékhatásaik miatt is egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a gyökereinkhez való visszatérésre, a tradicionális gyógymódokhoz.

A macskakarom egy az Amazonas őserdőben termő gyógynövény, amelyet a perui Asháninka indiánok kezdték el használni. Szerteágazó gyógyhatású növényként jellemzik, köszönhetően vírusellenes, rákellenes és gyulladáscsökkentő hatásának. Érdeklődés középpontjába a 20. század második felében került, ekkor indultak el a kutatások a hatóanyagjai iránt. A macskakaromban nagyszámú, közel 50 féle hatóanyagot mutattak ki, többek között pentaciklusos alkaloidokat, triterpéneket, flavanoidokat, tanninokat és polifenolokat.[5]

Kutatócsoportunkban 2013 óta foglalkoznak hagyományos (Soxhlet, töltött oszlop) és szuperkritikus CO₂ extrakcióval készített macskakarom kivonatokkal. A TDK dolgozatom a kivonatokban az egyéb hatóanyagok megtartása mellett az alkaloid koncentráció szabályozását célzó kutatómunkához kapcsolódik.

Munkám során a macskakaromból hagyományos kevertetési extrakcióval történő pentaciklusos alkaloid kinyerést vizsgáltam. Méréseket végeztem különböző hőmérsékleteken, eltérő extrakciós idővel és különböző koncentrációjú citromsavat tartalmazó vizes és etanolos oldószerrel. Eredményeim útmutatást nyújthatnak a jövőbeli étrend-kiegészítőként való felhasználható, üzemi szinten előállított macskakarom kivonatok előállításához.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Macskakarom

Uncaria Tomentosa (Willdenow ex Roemer and Schultes) De Candolle[6], melynek az *Uncaria Tomentosa* (Willd.) DC. rövidítését használják az irodalomban. Angol nyelvterületeken cat's claw, míg spanyol ajkú országokban az una da gato néven illetik, további ismert elnevezései: cat's crew, saventaro, hawk's claw, samento, garabeto amarillo, Katzenkralle és Vilcacora. A gyógynövény magyar nyelven macskakaromként terjedt el. A növény a nevét a kinézetének köszönheti, mivel hajlított kampó alakú tövisek találhatóak a növény hajtásain. A macskakarom szőlőtőke szerű növény, melynek szárai több méter hosszúra is megnőhetnek, amelyen 10 cm nagyságú ovális levelek találhatóak.[7] A macskakarom a buzérfélék (Rubiaceae) családjába tartozik, azon belül is az *Uncaria* alcsalád tagja. Az *Uncaria* alcsalád 34 fajt foglal magába, melyek közül a legtöbb Ázsiában található, míg a macskakarom és a rokon *Uncaria Guianensis* tövises kúszónövények a Közép- és Dél Amerikai dzsungelokban (Peru, Columbia, Ecuador, Venezuela, Guatemala, Costa Rica stb.) fordulnak elő.[8]

Felhasználást tekintve az első feljegyzések az Ashánika törzstől maradtak fent, mely a legnagyobb bennszülött csoport Peruban. A macskakarom a törzs sámánjai használták, manapság pedig népi és kiegészítő gyógyászatban fordul elő. A macskakarom és komponensei iránti kutatások már számos éve folynak kifejezetten az alábbi kutatási irányokban: botanikus, gazdasági és gyógyhatás. *Uncaria Tomentosa*-t bemutatja például a WHO Gyógynövény Monográfia és a legfontosabb európai gyógyszerkönyv a Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis.[8]

A macskakarom (*I. ábra*) leveleit és vékony hajtásait a népi gyógyászatban hasmenés ellen használták.[7] 1997-ben már több mint 50 macskakaromból készült étrend-kiegészítő terméket gyártó volt megtalálható az Egyesült Államokban. Terápiás kezeléseként az alábbi esetknél használható: tályog, ízületi gyulladás, asztma, rák, kemoterápiás mellékhatások, fogamzásgátlás, láz, fekély, menstruációs panaszok és gyulladások ellen.[9] Manapság a legnagyobb mértékben kutatott területek a növény biológiai hatásaival kapcsolatban a rákellenes hatása, ezen belül is a leukémia-elleni, HIV vírusellenes és a gyulladáscsökkentő hatása. A perui törzs az alábbi módon használta a macskakarom: 20 g felszeletelt gyökér kérget 1 l forrásban lévő vízbe helyeztek 45 percre. Az idő elteltével dekantálták, majd az elpárolgott vizet kiegészítvén a kapott főzetet 10 napos adagként használták, mely napi 4 mg oxindol alkaloidot tartalma-

zott.[9] Manapság tradicionálisan kivonatként 20 – 350 mg/nap vagy tablettá/kapszula formájában naponta 300 – 500 mg 2-3 részletben, valamint gyógyhatású készítményként 100 mg/száraz kivonat/tabletta formában naponta legfeljebb háromszor használják fel. [10]



1. ábra. Macskakarom [11]

Az alkaloidoknak két kemotípusát fedezték fel a növényben, a tetraciklusos és a pentaciklusos alkaloidokat. Jelentős kutatások folytak és folynak az alkaloidok vírusellenes, gyulladás csökkentő, rákellenes és általános immunerősítő hatásai miatt. Fontos szempont, hogy a két alkaloid keverékének arányát ismerni kell, mivel antagonista viselkedést mutatnak, például amíg a tetraciklusos alkaloid a központi idegrendszert befolyásolja, addig a pentaciklusos alkaloid a sejtes immunrendszerre hat.[7] Alkaloid tartalmat tekintve a fiatal levelek [12] majd a gyökér és a kéreg tartalmazza a legtöbbet. Az összetétel függ a földrajzi elhelyezkedéstől és az évszaktól. Felhasználás céljából a kérget hasznosíthatják az üzemek, mivel a macskakarom legnagyobb exportőre Peru megtiltotta a gyökér exportját a populáció csökkenés megelőzése végett. A növény kifejlődéséhez 8 év szükséges és a természetes előfordulása az Amazonas őserdőben hektáronként csak 2 – 8 egyed, míg az ember által telepített erdőben körülbelül 17 darab hektáronként.[13,14]

2.1.1 A macskakarom főbb hatóanyagai

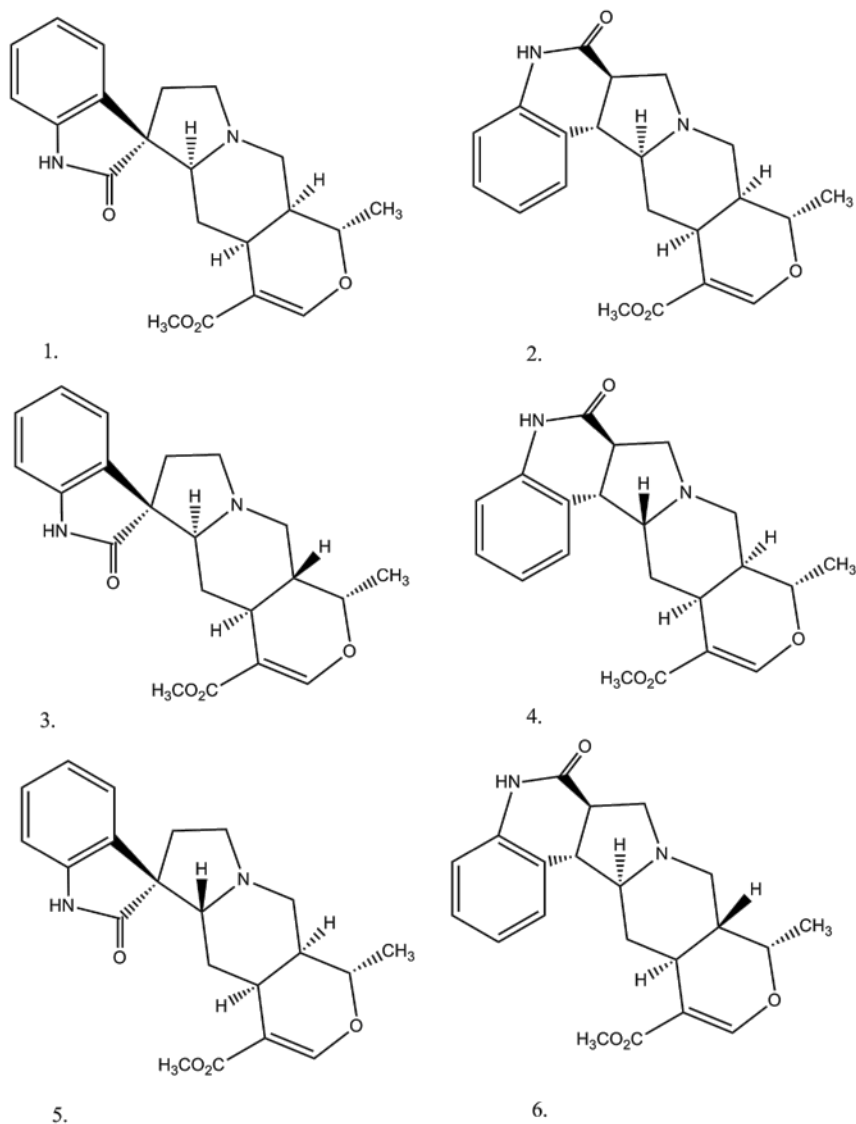
2.1.1.1 Alkaloidok

1821-ben Meissner 'alkaloide' kifejezéssel jelölt meg egy csoport nitrogéntartalmú anyagot, amely élőlényekben keletkezik és bázikus jellegű. 1950-ben Mothes úgy fogalmazta meg, hogy az alkaloid bázikus növényi anyagok, túlnyomórészt heterociklusosan beépített aminos nitrogénnel, amelyek erős, rendszerint nagyon specifikus hatást gyakorolnak az idegrendszer különböző területeire.[15]

A macskakaromban két kemotípusú alkaloid van jelen, az indol és oxindol alkaloidok.[9] Mindkét csoport felosztható tetraciklusos és pentaciklusos alkaloidokra (1. táblázat), ahol a ciklusok száma a szerkezetben található gyűrűk számára utal. A pentaciklusos oxindol alkaloid csoportba tartozó vegyületek szerkezete a 2. ábrán látható.

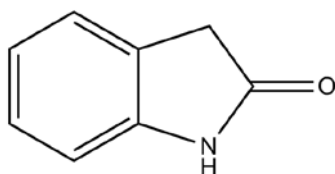
	Pentaciklusos alkaloidok	Tetraciklusos alkaloidok
Oxindol alkaloidok	pteropodin (uncaria C)	rinchofillin
	izopteropodin (uncaria E)	izorinchofillin
	speciofillin (uncaria D)	corinoxein
	uncaria F	izocorinoxein
	mitrafillin	
	izomitrafillin	
Indol alkaloidok	akuammigin	hirszutin
	tetrahydroalsztonin	dihidrokorinantein
	izoajmalicin	hirszutein
		korinantein

1. táblázat. Macskakaromból izolált alkaloidok[9]



2. ábra. Izopteropodin (1.), Pteropodin (2.), Izomitrafillin (3.), Uncaria F (4.), Speciofillin (5.), Mitrafillin (6.) [16]

Az oxindol alkaloidok, melynek alap szerkezete a 3. ábrán látható, izomerizációra könnyedén hajlamosak, ez az úgy nevezett spiro szerkezetükből adódik.



3. ábra. Oxindol gyűrű [15]

A feltételezett mechanizmus az izomerizáció során magába foglal egy retro - Mannich gyűrű felnyitást, rotációt nyílt-zárt ikerionnal [17] és Mannich gyűrű záródást. Az átalakulások protonálódással és oldószer polaritásának csökkentésével lassítható. Az izomerizáció miatt

tiszta anyagként nem hozhatók forgalomba, mint gyógyszer-hatóanyagok.[9] Az átalakulások miatt a macskakarom tényleges alkaloid összetétele nehezen határozható meg, továbbá magas hőmérsékleten végzett extrakció során kapott kivonatok biológiai aktivitása eltérőek lehetnek a hasonló módszerrel, de alacsonyabb hőmérsékleten végzetthez képest.[6] S. Kaiser és munkatársai vizsgálták az izomerizációt befolyásoló tényezőket, mint a pH, a hőmérséklet és az oldószer polaritás. A kutatás során többféle extrakciós típust használtak, ebből a kevertetési extrakció során kapott eredményeket emelném ki. Vizsgálataik során 40 %-os etanollal végzett 23 ± 1 °C-on végzett extrakciót követően megállapították, hogy a kevertetési extrakció során a növény tényleges totál alkaloid tartalmához és a kivonatban lévő között nincs szignifikáns különbség, csak az alkaloid összetétel változott meg. Ezt követően hő stressznek vetették alá refluxáltatás mellett a kivonat oldatát, ahol is arra a következtetésre jutottak, hogy az alkaloid összetétel megváltozik. Statisztikailag igazolták, hogy a kölcsönösen átalakítható mitrafillin, izorinchofillin csökkenés mellett ugyanolyan mértékű izomitrafillin, rinchofillin növekedés következik be. A speciofillin, uncaria F és pteropodin alkaloidok mennyiségének csökkenése és az izopteropodin egyidejű növekedése mellett képet kaphatunk arról, hogy energia befektetést követően termodinamikailag mely alkaloidok stabilabbak. Az alkaloidok egymásba alakulása, előbb leírtak miatt endoterm folyamatnak tekinthetőek. Fontos megjegyezni, hogy más extrakciós módszereknél az izomerizáció foka eltérő lehet, tehát figyelembe kell venni a macskakarom biológiai aktivitásának tárgyalásakor feldolgozásának módját, mivel a közti és végtermék minősége függ az extrakciós folyamattól.[17] Az előbb leírtak miatt fontosak, mert például a speciofillin, Uncaria F és az izopteropodin, az ugyancsak macskakaromban megtalálható flavanoidokkal együtt felelősek a központi idegrendszer nyugtató hatásáért. [18] Egyes vizsgálatok szerint a mitrafillinek van jelentős gyulladáscsökkentő hatása. [19] Izomitrafillin, izopteropodin, izorinchofillin és a pteropodin emeli a fagociták aktivitását egyes in vitro és in vivo körülmények között elvégzett vizsgálatok alapján. [20] Izopteropodin és a pteropodin rendelkeznek gyenge, de ellentmondás mentes citotoxikus hatással emberi sejt tumor vonalakra, mint például a méhnyakrák és a prosztatatarák. [21]

2.1.1.1.1 Alkaloidok analitikai vizsgálata

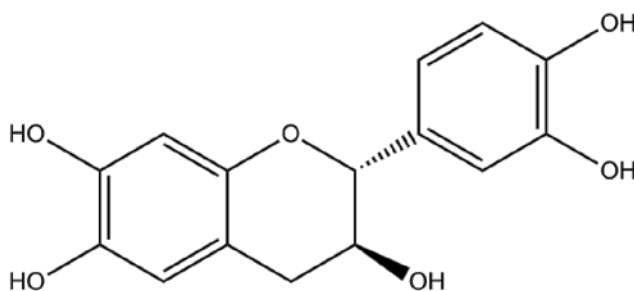
A macskakarom extraktok elemzésére legelterjedtebb módszer a fordított fázisú nagy nyomású folyadék kromatográfia (HPLC). A macskakarom pentaciklusos alkaloid vizsgálatának céljából először acetonitril, metanol és foszfát puffer eluenseket oldószer-gradiens módszerben használták. A detektálásra UV - VIS detektort használnak [16], mely során az alkaloi-

dokra abszorbancia maximumát 243 és 247 nm hullámhossz között találták.[22] Más publikációk alapján eltérés mutatkozik az eluens összetételében és az alkalmazott kolonna hőmérsékletében, például Kaiser és társai a vizsgálataikat ammónium-acetát puffer (pH 7,0) és acetonitril oldószerek felhasználása mellett, lineáris gradiens módszerben, 1ml/perc áramlási sebességgel 23 ± 1 °C-on végezték. [23] A közös a különböző publikált módszerekben a felhasznált puffer pH (6,5 – 7,0) értékében van. [12], [16], [22]–[24]

A mintaelőkészítésről csak kevés publikációban esik szó. Egy esetben a kivonatot 0,1 M H₂SO₄-al savasították, majd 3x extrahálták etil-acetáttal. Ezt követően lúgosították 10 %-os NH₃-val majd 4x extrahálták etil-acetáttal. A kapott etil-acetátos fázist szárazra pároolták és metanolban feloldották..[16]

2.1.1.2 Tanninok

A tannin a német Tanne (jegenyefenyő) szóból származik. A tanninok, más néven cseresavak növényi eredetű polifenolok, amelyek a cserzőanyagok csoportjába tartoznak. Erős összehúzó (adsztringens) hatású, nem csak állati nyersbőröket cserzi, hanem az élő szervezeteken is képes enyhe kisméretű felületi sebek kezelésére. Vízben és alkoholban jól oldódnak, nem mérgezőek. [15] Két fő csoportba sorolhatóak: hidrolizálható és a nem hidrolizálható tanninok. Utóbbi csoportba tartozó tanninok flavánvázis proantocianidinek és/vagy katechinek (4. ábra) származékai [25], amelyeket a macskakaromból izoláltak. A proantocianidinek antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek.[8]

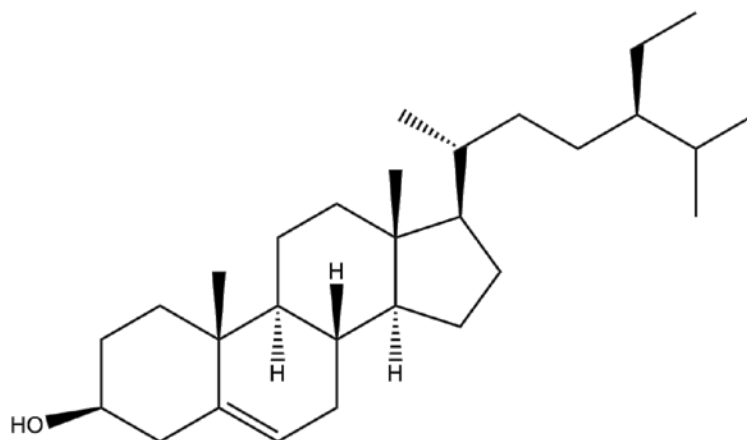


4. ábra. Katechin, a proantocianidint felépítő egyik vegyülete

2.1.1.3 Triterpének

A triterpének 30 szénatomszámú terpenoidok, melyek széleskörű megoszlással előfordulnak az emberi szervezetben, növényekben, főleg kétszikűekben és gombákban, továbbá baktériumokban, korallokban és kétéltűekben. A triterpének közé tartozik számos fontos molekula, mint pl.: a szteroidok. Kémiai szerkezetük és fizikai, biológiai tulajdonságaik alapján több csoportba sorolhatóak. [26] A macskakaromban előfordulnak a fitoszterol csoportba tartozó β -

szitoszterol (5. ábra), sztigmaszterol és kampezszerol vegyületek, illetve a pentaciklusos triterpénsavak (urzolsav, oleanolsav) és a pentaciklusos triterpénglikozidok (kinovasav-glikozidok). [5, 8]



5. ábra. β -szitoszterol szerkezete

Urzol- és oleanolsav antioxidáns, tumor-ellenes, gyulladás-elleni, vírusellenes, májvédő és nyugtató hatásokkal rendelkeznek.[8]

2.1.2 A macskakarom jellemző biológiai hatásai

A 90-es években kezdődött el a macskakarom kutatása in vivo és in vitro körülmények között. Számos publikáció készült az *Uncaria Tomentosa* farmakológiai előnyeiről, mint az antimutagén [27, 28], gyulladáscsökkentő hatásáról, antioxidáns tulajdonságáról, továbbá leukémia-elleni ismérével kapcsolatban is számos kutatások folytak és folynak napjainkban is.

2.1.2.1 Immunstimuláló hatás

A macskakarom antivirális hatásával kapcsolatban, melyek között a kutatások többek között a pentaciklusos alkaloidok HIV (Human Immunodeficiency Virus, magyarul immunhiányt előidéző vírus) az AIDS nevű betegség kórokozója elleni hatását bizonyították. HIV pozitív betegeknél az immunrendszer gyengül, a limfociták mennyisége lecsökken. Tehát a betegek, akik elkapták a vírust, nem magába a vírusba halnak bele, hanem a legyengült immunrendszer okozta betegségekbe. A macskakarom kivonatokkal HIV pozitív embereken végzett kísérletek során szignifikánsan nőtt a limfociták mennyisége, így erősíthető a HIV betegek immunrendszere. [9]

2.1.2.2 Gyulladáscsökkentő hatás

Uncaria Tomentosa gyökér és kéreg kivonatokat számos gyulladásos betegség kezelése használják.[29] Az előnyös hatása a gyulladást okozó citokin TNF α gátló és az NF- κ B nukleáris transzkripciós faktor aktiválása miatt származik.[5, 6] Egyes szerzők szerint a gyulladáscsökkentő hatás a pentaciklusos oxindol alkaloidoktól és a kinovasav-glikozidoktól származik [9, 30], azonban egyéb komponensek pl. triterpének is ismert gyulladáscsökkentők. Etanolos és vizes kivonatok vizsgálata során az előbbi eredményezett nagyobb aktivitást, miközben a teljes oxindol alkaloid tartalom is nagyobb volt. A macskakaromnak erős gyulladás-elleni hatását a komponensek szinergikus hatásával magyarázzák.[27]

2.1.2.3 Antioxidáns hatás

Korábbi tanulmányok az *Uncaria* fajokban a tanninok és polifenolok jelenlétét állapították meg, melyek antioxidáns hatással rendelkeznek. [24, 31] Antioxidáns hatás szempontból az alkoholos kivonatokat jobbnak találták, mint a vizes kivonatokat. A szabadgyök-fogó képesség szempontjából tekintve a macskakarom kiemelkedik a többi étrend-kiegészítő növény közül. Fontos megemlíteni, hogy magas tannin tartalmú alkoholos kivonatok nem kívánatos hatásai lehetnek a gyomorra, de szabályozható a mennyisége, ha az extrakció során az etanol mennyiségét változtatjuk.[24] Egyes eredmények a macskakarom metanolos kivonatát Alzheimer-kór megelőzésére és kezelésre ajánlják, azonban a hatásért felelős vegyületet nem nevezték meg. [32]

2.1.2.4 Rákellenes hatás

Manapság a leginkább kutatott betegségek a különböző rákos elváltozások és gyógyítási lehetőségeik. A mai napig dollár milliárdokat költenek a gyógyszeripari óriásvállalatok az elenszer kifejlesztésére, illetve a rákos betegek életminőségének javítását célzó termékek kifejlesztésére. Az érdeklődési körbe a macskakarom, mint gyógynövény is bekerült annak jótékony, leukémia-ellenes tulajdonságai miatt. [6, 8-9] A leukémiát fehérvérűségnek vagy vérráknak is nevezik, mely a vérképző rendszer rosszindulatú daganatos megbetegedése, mely során a csontvelőből kiszabaduló érett vagy éretlen sejtek szabályozatlan szaporodása miatt alakul ki. A leukémia a felnőttek esetében az összes daganatos betegségből eredő halálozás 9%-át, a 15 évnél fiatalabb gyermekeknél pedig körülbelül 40%-át adják. [33]

A vizsgálatok során eredményt értek el a HL60 és U-937 leukémiás sejtek növekedés gátlásában a pentaciklusos alkaloidok jelenléte mellett, továbbá a leukémiás és normál sejtek közötti szelektivitásukat is megállapították. [34] Más kutatócsoportok a pentaciklusos alkaloidok endoteliális sejtekre való élénkítő hatását állapították meg, ennél fogva a sejtek a limfocita

szaporodást szabályozó ismeretlen faktort termelnek. [9] Az endoteliális sejtek az erek legbelső rétegét alkotó egyrétegű laphámsejtek melyek már annyira laposak, hogy a sejtmagjuk bedomborodik az ér lumenébe. Utóbbi sejtek számos funkciót látnak el, többek között olyan anyagot termelnek, melyek az erek átmérőjét változtatja és segítik a fehérvérsejtek vándorlását. [33]

Pilarski és társai vizsgálták különböző oxindol alkaloid összetételű macskakarom vízzel, 96 %-os etanollal és diklórmetánnal készült kivonatok rák ellenes aktivitását. Legnagyobb mennyiségben oxindol alkaloidot a diklórmentánnal végzett extrakcióval nyertek ki, a kivonat 50 %-a oxindol alkaloid volt, míg legkisebb mennyiséget vízzel. In vitro kísérletek alapján a 96 %-os etanos kivonat bizonyos ráksejt vonalakra kiemelkedő sejtszaporodást gátló hatást mutatott, mint például a méhnyakrák ellen, azonban a mellrák esetén szinte rezisztens volt az extrakt. A vizes kivonatoknak gyenge sejtszaporodás elleni hatása volt. In vivo kísérletek egerekben szignifikáns hatást mutatott a vizes macskakarom kivonat használata és a tumor növekedés gátlásában, míg a másik két oldószerrel készített kivonat esetén ez nem mondható el. Előbb leírtak alapján nem biztos, hogy helyes párosítani az alkaloid mennyiséget és a rák ellenes hatást.[6]

A rákos megbetegedések potenciális ellenszereként olyan vegyületek érdekesek, melyek a rákos sejtek apoptózisát segítik és sejtszaporodására gátló hatással rendelkeznek. A pentaciklusos alkaloidok előbbi tulajdonságokkal rendelkeznek, tehát rákos betegek számára előnyös lehet a macskakarom kivonatok szedése, például kemoterápia hatékonysága nő macskakarom kivonat szedése mellett.

2.1.2.5 Kivonatok toxicitása és biztonságos használata

K. Keplinger és társai egereken végzett in vivo kísérleteket vizes gyökér kivonatokon, mely során a napi dózis 35 mg totál pentaciklusos alkaloid volt. Az 5 napos kúrát követően a túlélő egyedeken semmilyen elváltozás nem mutatkozott a külső megjelenésükben és viselkedésükben, egyedül a limfocita szám mérséklése következett be. Az akut letális dózist (LD₅₀) egerekre vonatkozólag vizes extrakt esetén nagyobbak találták per os alkalmazás esetén, mint 16 g extrakt/ kg testsúly.[35] Patkányokon mért LD₅₀ érték ennél alacsonyabb a 8 g extrakt/ kg testsúly értékével.[36] A toxicitásért felelős tetraciklusos alkaloidokra vonatkozó LD₅₀ érték 165 mg/ kg testúly. [37] A kivonatok használatakor figyelembe kell venni, hogy a pentaciklusos alkaloidok kis mértékben oldódnak vízben, míg jól savakban és alkoholokban. [8]

2.1.3 Macskakarom alapú termékek

A macskakarom alapú termékek hatásáról elsősorban a gyártók által készített klinikai vizsgálatok beszámolóí állnak rendelkezésre, illetve tudományos állásfoglalások az állami intézményektől, utóbbit Magyarországon is adott ki az Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet (OÉTI). A vizsgálat alapján megállapították, hogy az *Uncaria Tomentosa* kéreg étrend-kiegészítőkből és egyéb anyagokkal dúsított élelmiszerek alkalmazására nem javasolt, annak ellenére, hogy Európai Unió egyes tagállamaiban (pl.: Szlovákia, Olaszország, Ausztria, Németország) engedélyezett. A szakértői testület döntését a felhasznált szakirodalmak alapján indokolja, illetve a különböző oldószerrel kapott kivonatok esetén az alkaloid tartalom jelentősen eltérhet és az oxindol alkaloidokra vonatkozó biztonságos szintje nem határozható meg. Továbbá a toxikológiai szempontból nagyobb kockázatú tetraciklusos alkaloidokra vonatkozó megengedhető maximális szintjére vonatkozó adatok ellentmondásosak, így nem engedélyezhető a macskakarom felhasználása. [10]

A macskakaromból készült készítmények felhasználását 3 éves kor alatt nem ajánlják, mivel ebben a korosztályban nem állnak rendelkezésre klinikai vizsgálati eredmények. A gyógynövény immunstimuláló hatásának szemszögéből tekintve nem ajánlott transzplantáción átesett vagy az előtt álló betegeknek, illetve várandósoknak. Az immunrendszer erősítő hatása miatt szervkilökődést okozhat.[8, 33] Felnőtteknek Németországban és Ausztriában a standardizált por extraktokat 20-60 mg dózisban napi 2-3 alkalommal való bevételét javasolják.[8]

2.2 Extrakció

2.2.1 Fogalma és csoportosítása

Az extrakció olyan anyagátadási művelet, mely során a kiindulási anyagból valamelyik komponensét szelektív módon kioldjuk oldószer segítségével. A kiindulási anyag és az oldószer mikéntjének szempontjából tekintve három fő csoportba sorolhatóak az extrakciós műveletek [39]:

- Folyadék – folyadék extrakció
- Szilárd – folyadék extrakció
- Szuperkritikus extrakció

2.2.2 Szilárd – folyadék az ún. diffúziós extrakció

Kilúgozásnak is nevezett műveleti csoport, mely során szilárd vázanyagból oldószer segítségével vonunk ki különböző komponenseket. A diffúziós extrakció elnevezés onnan adó-

dik, hogy a sejtben, illetve sejt között részben található anyagok kiáramlási sebességét meghatározó folyamat részben vagy egészben a diffúzió. A vázanyag gyakran növényi eredetű, legelterjedtebb felhasználása a cukoriparban a répacukor feldolgozása. A gyógyszeripar a másik iparág, ahol elterjedten alkalmazzák a diffúziós extrakciót, például természetes eredetű hatóanyagok-kinyerésére. A gyógynövények szárított részeiből (pl. gyökér, levél, virág stb.), amelyeket drogoknak nevezünk, nem illékony hatóanyagait (pl. alkaloidok) szilárd – folyadék extrakcióval nyerik ki, elterjedtebb nevén drogextrakcióval. Számos extrakciós technika létezik a kinyerhető növényi komponensek és az oldhatatlan sejtes anyag szeparációjára. A cél a standardizált drogextrakciós módszerek, amely során a terápiás célokból előnyös anyagkinyerése és a nem kívánt komponensek csökkentése érhető el szelektív oldószeres kezeléssel. Az extrakciós módszer standardizálásának előnye, hogy a különböző időben készült kivonatok hozzávetőlegesen egységes összetételűek lesznek. Az így kapott kivonatot megfelelő szabványosítás után lehetséges gyógyászati hatóanyagként vagy tinktúra formájában forgalomba hozni és felhasználni. A hatóanyagok további feldolgozás után más anyagokkal keverve meghatározott dózisokban felhasználható például tablettá és kapszula formájában.

A hatóanyag-kinyerés lépései az előkészítés, extrakció, oldószer elválasztása és visszanyerése, valamint a kivonat szárítása. Az előkészítés során a növényt szárítják, ezáltal a biológiai folyamatok leállnak, majd aprítják így a fajlagos felület nő, ezáltal az extrakció határfoka is nő. A szemcseméretnek egy bizonyos határok között kell lennie, mert ha túl kicsi, akkor az extrakció során iszapossá válhat az oldat, amely a szűrést igen megnehezíti, míg ha túl nagy, akkor csökken a kitermelés és nő az extrakciós idő.[2, 39-40]

Az drogextrakciót leginkább befolyásoló tényezők a feldolgozandó növény mátrix tulajdonságai, az oldószer, a műveleti hőmérséklet, a nyomás és az idő. Az extrakciós technikákat két csoportba sorolják: hagyományos (Soxhlet–extrakció, kevertetéses extrakció, töltött oszlop) és nem hagyományos módszerek (szuperkritikus extrakció, ultrahanggal segített extrakció, mikrohullámmal segített extrakció, enzimmel segített extrakció, nyomás alatti folyadék extrakció). A nem hagyományos módszerek jóval környezetbarátabbak köszönhetően a kisebb mennyiségben felhasznált szintetikus és szerves anyagoknak, illetve a működési idejük kevesebb, emellett pedig a kitermelés nagyobb és a kivonatok minősége jobb. Azonban a hagyományos eljárásokat mégis mai napig használják, ezek többnyire sokkal olcsóbban és egyszerűbb eszközökkel megvalósíthatóak.[41]

2.2.3 Oldószer kiválasztás szempontjai

Az extrakció hatékonysága minden hagyományos módszer esetén jelentősen függ az oldószer választásától, mely során a fő szempont a kioldandó anyag polaritása (2. táblázat). Az általános táblázatot összevetve a 2.1 fejezetben bemutatott macskakaromra vonatkozó részletes kutatási eredményekkel egyértelművé, hogy az oldóképességre vonatkozó tapasztalatok csak főszabályként, és kiindulási pontként használhatóak természetes anyagok esetében. Nem tekinthetünk el továbbá az oldószer és az oldandó anyag közötti affinitástól, anyagátadástól, segédoldószer használatától, a tűz- és munkavédelmi és a biztonságtechnikai szempontoktól, árártól és a környezetvédelemtől. [41] További szempont még a termékben visszamaradó oldószer-tartalom szabályozása.

Víz	Etanol	Metanol	Kloroform	Diklórmétán	Éter	Aceton
Antociánok	Tanninok	Antociánok	Terpenoidok	Terpenoidok	Alkaloidok	Flavonolok
Tanninok	Polifenolok	Terpenoidok	Flavonoidok		Terpenoidok	
Szaponinok	Flavonolok	Szaponinok			Zsírsavak	
Terpenoidok	Terpenoidok	Tanninok				
	Alkaloidok	Flavonok				
		Polifenolok				

2. táblázat. Néhány példa különböző oldószerekkel kinyerhető biológiailag aktív komponensre [42]

1980–90-es években a választható szerves oldószerek (pl. klórozott szénhidrogének) száma lecsökkent a különböző korlátozások és tiltások miatt. Manapság már állami szinten szabályozzák a felhasználásukat rendeletekkel és törvényekkel. Az Európai Unióban az Európai Tanács 88/344/EEC számú rendelete tartalmazza az élelmiszerek és élelmiszer-adalékok extrakciója során felhasználható oldószereket, melynek legutóbbi módosítása 1997-ben jelent meg. Az uniós normákat követően Magyarországon 2003-tól a Magyar Élelmiszerkönyv 1-2-88/344 előírása alapján történik az oldószerek szabályozása, ez alapján hazánkban három fő csoportot különböztetünk meg:

1. Good manufacturing practice (GMP) vagyis a jó gyártási gyakorlat szerint alkalmazva minden célra használható (3. táblázat). Ebbe a csoportba tartozó oldószerekből annyi maradék és származék kerülhet a termékbe, amennyi már technikailag nem távolítható el és egészségre ártalmatlan.

Gázok	propán	bután	szén-dioxid	dinitrogén-oxid
Folyadékok	etil-alkohol	etil-acetát	aceton	víz

3. táblázat. GMP-technológiákban szabadon felhasználható oldószerek

2. Azon oldószerek (hexán, metil-acetát, metil-alkohol, izopropil-alkohol, etil-metil-ke-ton, diklór-metán), amelyeket élelmiszer és élelmiszer-adalékok előállítására használhatóak, azonban a felhasználásukat és a termékben megtalálható oldószermaradék tartalmát rendeletek rögzítik.

3. Azon extrakciós oldószerek (pl. dietil-éter, ciklohexán, propán-1-ol, bután-1-ol, me-til-acetát), amelyek természetes anyagokból végzett aroma kinyeréséhez használhatóak és a maradék mennyiségét rendeletekben szabályozzák.[40, 43]

További oldószer választási szempontok:

- könnyen elpárologtatható legyen, emiatt alacsony párolgáshőjű oldószert érdemes al-kalmazni. Továbbá fajhője is legyen kicsi, ekkor a regenerálás során, a melegítéshez kevesebb energiára van szükség.
- oldószer regenerálás desztillációval történik, ezért a forráspontja ne legyen túl magas
- az extraktumra ne hasson károsan
- melegítés, víz és gőz hatására ne bomoljon
- vas- és fém felületet ne támadjon meg
- gőze ne legyen ártalmas az egészségre
- ne legyen tűz-, illetve robbanásveszélyes (magas lobbanáspontú és gyulladási hőmér-sékletű oldószert érdemes választani)
- kémiaailag legyen egységes és termikusan stabil
- olcsó legyen

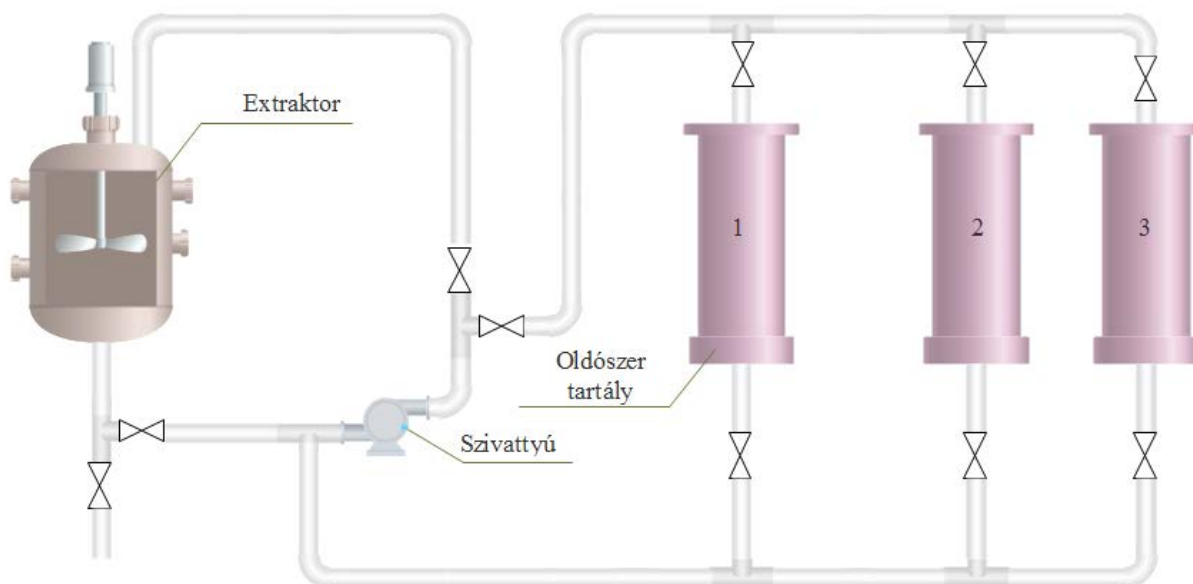
Oldószer választás esetén nem lehet minden egyes pontnak megfelelni, emiatt megfelelő gazdasági számítások alapján kell kiválasztani a számunkra megfelelőt.

2.2.4 Kevertetési extrakció az ún. macerálás

A macerálás vagy más néven kevertetési extrakció a hagyományos szilárd – folyadék extrakciós műveletek közé tartozik.[40] A kevertetési extrakció hagyományos mód tinktúrák és különböző gyógynövények keverékéből álló oldatok készítésére. [2, 41] Működését tekintve szakaszos üzemű, amely során egy álló tartályba beletöltik a felaprított növényi anyagot és rá-töltik az oldószert, majd az edénybe épített keverőszerkezetet segítségével viszonylag kis for-dulatszámú keveréssel mozgásban tartják a rendszert. A kíméletes keveréshez a lassú mozgású horgony, kalodás és ujjas keverők alkalmasak. Ha a vázanyag törekeny, a kevertetés szakaszos. Ekkor bizonyos időközönként pár perces keveréssel mozgatják át a tartály tartalmát. Amikor az oldott anyag koncentrációja nem növekszik tovább, az egyensúlyi állapot beállt, az extraktumot

egy szűrőn keresztül leengedik. Egy lépés során az extrahálható anyag bizonyos hányadát lehetséges csak kinyerni, így a vázanyagot visszahelyezik a tartályba és az extrakciót 2–4-szer megismétlik friss oldószerrel.[40] Az összegyűjtött folyadék a kolloid, illetve apró részecskék miatt zavaros lehet, emiatt elengedhetetlen a koaguláció és az ülepítés. A végső szűrés a már leülejtett folyadékkal történik nyomás hatására speciális szöveten keresztül. [2] Ipari szinten a legnagyobb probléma a kevertetési extrakció kapcsán, hogy míg kis oldószer mennyiségek esetén könnyű a keverés, addig hatalmas oldószer mennyiség esetén már nehéz. Gazdasági szempontból a legfontosabb, hogy az extrakciót hatékonyá tegyünk, így például kevesebb oldószer felhasználása mellett a bepárlás, regenerálás költsége is csökken.

Nagy üzemi termelés esetén használható technológia például a többfokozatú kevertetési extrakció (6. ábra). A készülék fontosabb egységei közé tartozik az extraktor, keringető szivattyú, permetelosztó és számos extrahált oldat tárolására alkalmas tartály. Az extraktor és a tartályok csővezetékekkel vannak összekötve, így bármelyik tartályból szállítható oldat vagy oldószer az extraktorba. Az extraktort feltöltik droggal és friss oldószerrel cirkuláltatják a megszabott ideig. Az oldatot az első tartályba helyezik, majd az extraktorba friss oldószerrel töltnek és recirkuláltatják majd a második tartályba engedik. Az extraktort feltöltik újra friss oldószerrel, recirkuláltatják majd a harmadik tartályba helyezik. Az extraktort kiürítik, majd feltöltik friss droggal. Az első tartály tartalmával extrahálják a friss drogot, majd bepárlásra viszik tovább a tömény oldatot. A második tartály oldatával való extrakciót követően az oldatot az első tartályba helyezik. A harmadik tartály oldatával történő extrakciót követően pedig a második tartályba helyezik az oldatot. Ezt követően az extraktorba friss oldószerrel engednek, recirkuláltatják majd a harmadik tartályba helyezik. Eltávolítják a drogot, újra töltik és kezdődik előlről a ciklus. Tehát egy sarzsot többször kezelnek oldószerrel. Az első tartály a legtöményebb, míg a harmadik tartály a leghígabb oldatot tartalmazza a kioldott anyag szempontjából tekintve. A drogextrakció lépéseinek a száma a tartályok számával megegyező, például a 6. ábrán látható készülékkel három lépéses extrakció hajtható végre.



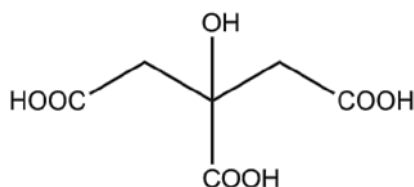
6. ábra. Többfokozatú kevertetési extraktor [2]

2.2.4.1 Macskakarom kevertetési extrakciójának optimalizálása

A kevertetési extrakció optimalizálását vizsgálták többek között polifenolokra és oxindol alkaloidokra. Kísérleteket végeztek különböző etanol koncentráció, extrakciós idő és a drog – oldószer arány mellett, mágneses keverő segítségével 23 ± 1 °C-on. Eredmények alapján a pentaciklusos alkaloidok kinyerésére 63 térfogatszázalék etanol oldószer, 0,5:10 drog:oldószer arányt találtak optimálisnak, míg az extrakciós időnek nem volt szignifikáns hatása. Mindegyik komponenst figyelembe véve az optimális extrakciós paraméterek az alábbiaknak adódtak: 61 térfogatszázalék etanol oldószer, 2 óra extrakció és 0,5:10 drog – oldószer arány. [23]

2.2.5 Citromsav hatása az extrakcióra és a kivonatra

A citromsav (7. ábra) egy hárombázisú szerves sav, mely nagy mennyiségben citrusos gyümölcsökben, mint narancs, citrom és grépfrút, illetve nektarinokban, körtében, cseresznyében és eperben fordul elő.



7. ábra. Citromsav szerkezete

Legszélesebb körben használt szerves sav az élelmiszeriparban, több mint 60%-ban savanyúságot szabályozó adalékanyagként használják. A citromsav, mint antioxidáns adalékanyag az E330 kóddal tüntetik fel a termék összetevői között. Az antioxidánsok felhasználását jelenleg a Magyar Élelmiszertörvény 1-2.95/2 számú előírása szabályozza. [44]

Citromsav előnyei között szerepel a vízben való magas oldhatósága, savanykás íze, továbbá erős fém kelátképző tulajdonsága, illetve ez a legszélesebb puffer tartományban (2,5 – 6,5) használható élelmiszeripari sav. Hétköznapi előállítása a gabona fermentációjával történik, de kinyerhető citrusos gyümölcsökből, illetve ananász léből extrakcióval. Beszerezhető tömény folyékony formában is, amely a feldolgozás során tapasztalható problémákat megoldja, például nem szükséges plusz oldószer a citromsav feloldásához, továbbá a gyártás során használt készülékekben a kristályos lerakódás kisebb mértékű. Számos sóját is felhasználják az élelmiszeriparban, mint például a nátrium-citrátot, amely megtalálható szénsavas italokban, illetve a borászok a bor fermentációja során a pH beállítására használják. Borászatban is jelentős a fémionokkal történő kelátképző tulajdonsága, mert ezzel a citromsav csökkenti a zavarosságot. A bor zavarossága a fém ionok tanninokkal vagy foszfátokkal való kötődésével keletkezhet. Kalcium-sóját fruktózzal ízesített készítményekben, mint a porított üdítőitalokban, csomósodás gátló adalékanyagként használják. Kis mennyiségben húskészítményeknél (száritott hús, száraz kolbász, stb.) is használják antioxidáns hatása miatt. Minden élelmiszer termékben jelen vannak az oxidatív reakciók, amelyek a készítmény színvesztéshez, avasodásához, zavarosodáshoz, íz és tápanyag degradációjához vezethet. A citromsav kelátképző hatása amiatt fontos, mivel az oxidatív reakciókat katalizáló fém ionokat, mint a réz, vas, mangán, nikkel, ón és cink, amelyek csak nyomokban lehetnek jelen a termékben, hozzáférhetetlenné teszi, kelát szerkezetbe foglalja. Ennek köszönhetően a citromsavat tartalmazó termékek megfelelő stabilitással rendelkeznek, így az eltarthatóságuk jobb. [45]

Macszkakarom citromsavat tartalmazó oldószerrel történő extrakciója amiatt lehet előnyös, mert a pentaciklusos alkaloidok vízben gyengén oldódnak, azonban savban és alkoholokban jól.[8] Megemlíteném még, hogy savas oldatok esetén az alkaloidok izomerizációjának sebessége lényegesen csökken, sőt meg is szűnhet szobahőmérsékleten. [22] A citromsavat tartalmazó oldószerrel történő extrakcióra publikációt nem találtam.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

- Macskakarom kéreg (8. ábra) (Gradiens Kft. által Peruból beszerzett, darált formában)



8. ábra. Darált macskakarom kéreg

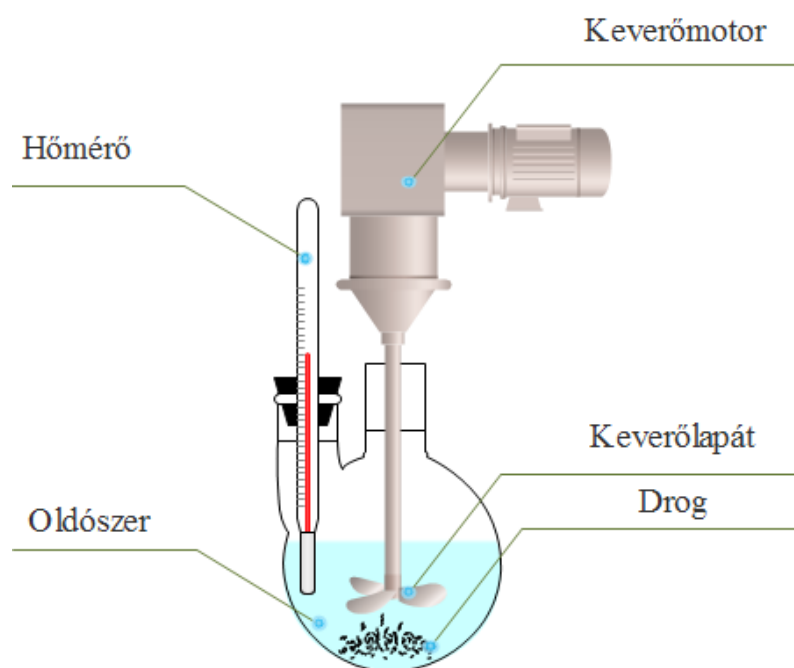
- Abszolút etanol (>99,8 % tisztaságú, Molar Chemicals Kft.)
- Ioncserélt víz (Laboratóriumban előállított, vezetőképesség <1 $\mu\text{S}/\text{m}$)
- Citromsav (>99 % tisztaságú, Azúr Vegyszerkereskedelmi Kft.)
- HPLC – Acetonitril ($\geq 99,9$ % tisztaságú, LiChrosolv® Merck Millipore)
- HPLC – Víz ($\geq 99,9$ % tisztaságú, LiChrosolv® Merck Millipore)
- Ammónium – acetát (>98 %, Molar Chemicals Kft.)
- Mitrafillin standard (>90% tisztaságú, Gradiens Kft.)
- Izomitrafillin standard (>99% tisztaságú, Phytolab GmbH.)
- Pteropodin standard (>97% tisztaságú, Cfm Oskar Tropitzsch GmbH)
- Izopteropodin standard (>99% tisztaságú, Cfm Oskar Tropitzsch GmbH)

3.2 Szárazanyag-tartalom mérése

A minták nedvesség tartalmának meghatározását Ph. Hg. VIII. 2.8.16-os cikkelye szerint végeztem. Három párhuzamos mérésben 11,81 g; 20,88 g és 15,06 g macskakarmot Petri-csészébe kimértem, majd ezt követően 105 °C-os szárítószekrénybe helyeztem. A mintákat tömegállandóságig szárítottam, mely körülbelül két napot vett igénybe. A mintában lévő szárazanyagot tömeg-visszamérés alapján számítottam. A mérési eredmények azt mutatták, hogy a macskakarom kéreg szárazanyag-tartalma $93,00 \pm 0,17 \%$.

3.3 Extrakció

A kevertetéses extrakciót a 9. ábrán látható készülékkel végeztem. A melegítést közvetítő vízfürdő segítségével végeztem, amelyet pedig elektromos fűtőlappal segítségével melegítettem. A hőmérsékletét higanyos hőmérővel mértem. A drogot a 250 ml-es gömblombikba táramérleggel mértem ki és mielőtt összeállítottam a rendszert hozzáöntöttem a mérőhenger által, de táramérleggel mért oldószert. Oldószerként ioncserélt vizet, abszolút etanolt és 0 – 1 tömegszázalékos vizes és etanolos citromsavoldatokat használtam.



9. ábra. Kísérletekhez használt készülék

A kevertetéshez propeller típusú keverőt használtam, míg a fordulatszám mindvégig 300 1/min volt, mivel ennél a fordulatszámnál már a keverési Reynolds szám a turbulens tartományba esik. A kevertetéshez IKA® RW 20 Digital keverőmotort használtam.

Miután lejárt az extrakció ideje a kevertetést lekapcsoltam és a gömblombik tartalmát vákuumszűrtem. A szűréshez Büchner-tölcsért használtam, amelybe VWR® 413 típusú, 90mm-es szűrőpapírt tettem, a vákuumot pedig vízszugárszivattyú segítségével állítottam el. A növényi anyagot ezt követően 3 – 5 percig szárítottam ~20 Hgmm nagyságú vákuum segítségével. A szűrést követően a drogot a gömblombikba helyeztem és az extrakciót az előbb leírt módhoz hasonlóan még kétszer elvégeztem. A szűrletek tömegét táramérlegem lemértem, majd redős szűrőpapíron keresztül csavaros kupakkal zárható üvegekbe szűrtem.

3.4 Alkaloidok mennyiségi meghatározása

3.4.1 Mintaelőkészítés

A hűtőből kivettem a szűrleteket és megvártam, míg laboratóriumi hőmérsékletet felveszik. Mivel az extrakciót 3 lépésben végeztem, egy adott kísérlethez három szűrletem volt. Az analitikai vizsgálatnál a mennyiség és a kimutatás határ közötti összefüggés alapján az első szűrletből ~ 30 ml-t, második szűrletből ~ 90 ml-t, míg a harmadik szűrlet teljes mennyiségét rotációs vákuum bepárló segítségével bepároltam. A bepárlás előtt a lombik és a szűrlet tömegét is lemértem analitikai mérleg segítségével, így kiszámíthattam a szűrletek teljes szárazanyag tartalmát. A minta vételt reprezentatívnak tekintettem. A bepárlást 60 – 70 °C-on végeztem ~ 100 Hgmm nagyságú vákuumban. A minták erős habzása miatt, melyet valószínűleg a kioldott szaponin vegyületek okoztak, a bepárlás során 96 %-os etanolt adtam a bepárlandó szűrlet részlethez, így a habzás megszűnt, de a biztonság érdekében nagyobb vákuumot nem alkalmaztam, csak a minták szárítására.

Az alkaloid mennyiség meghatározására a bepárolt mintákat 20 – 25 ml 1%-os Na₂CO₃ oldatban oldottam fel, majd háromszor 20 ml kloroformmal ráztam választótölcsér segítségével. A rázások között negyed órát vártam, mivel a kirázás során, leginkább a citromsavtartalmú kivonatok esetén, nagyfokú emulzió képződést tapasztaltam, amely a várakozási idő után megszűnt. Az alsó, kloroformos fázist, körülbelül egy vegyszereskanálnyi vízmentes nátrium-szulfátot tartalmazó szűrőpapíron keresztül engedtem le. Az összegyűjtött kloroformos fázisokat rotációs vákuumbepárló segítségével bepároltam ~ 50 °C-on. Az így kapott anyagot 10 ml abszolút etanolban feloldottam és csavaros kupakkal zárható üvegcsékbe tettem. A munkám során minden mintánál ugyanazt az üveg pipettát használtam a végső feloldáshoz, így az ebből adódó hiba nagysága egységes. Az üvegcséket fagyasztóba helyeztem az analitikai mérésig. A HPLC fiolába történő bemérés előtt megvártam, míg a minták felveszik a laboratórium hőmérsékletét, majd ezt követően fecskendő segítségével kivett oldatot teflon fecskendőszűrőn keresztül a fiolába szűrtem.

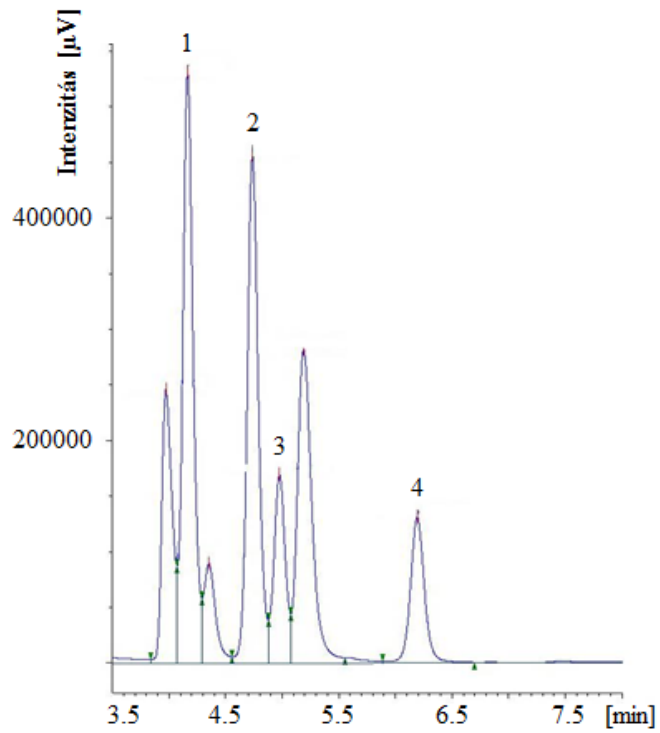
3.4.2 HPLC módszer

Az alkaloid mennyiségi meghatározásához fordított fázisú HPLC készüléket használtam. A készülék az alábbi egységekből épül fel:

- ANS – 3113 Gázmentesítő
- Jasco LG – 980- 02S Ternary Gradient Unit, gradiens egység
- Jasco PU – 1580 HPLC Pump, eluens pumpa
- Jasco AS – 2057 PLUS Sample, automata injektor
- Jasco MD – 910, diódasoros detektor
- Jones Chromatography Model 7955, kolonna termosztát
- Jasco LC- Net II/ADC, adattovábbító

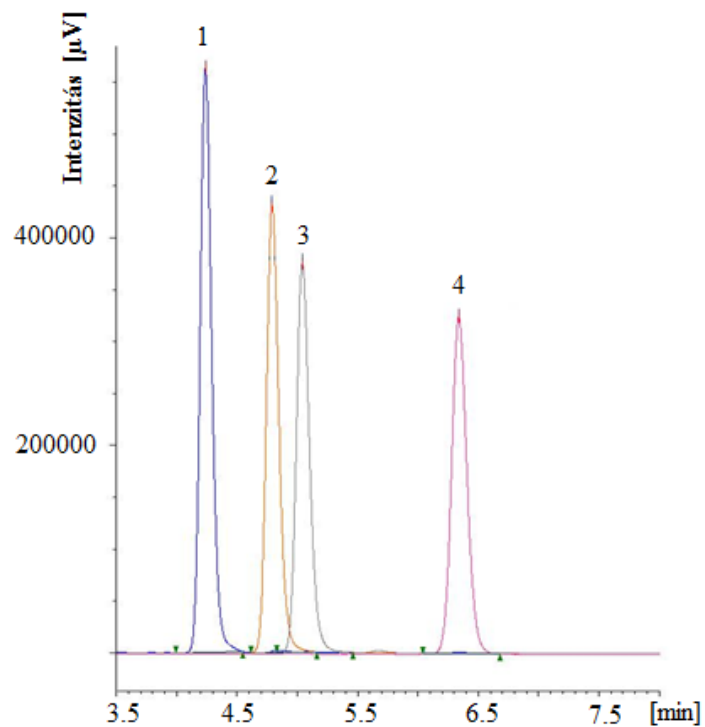
Az eluens összetétele 65% acetonitril és 35% 0,05 M ammónium-acetát puffer volt, a mérés során izokratikus módszert alkalmaztam. Az áramlási sebesség 1 ml/ perc, míg a vizsgálati idő 10 perc volt. Minden egyes mérési nap mitrafillin standarddal bizonyosodtam meg a készülék megfelelő működéséről. A mérések során SUPELCOSIL LC-18 5 μ m, 25cm x 4,6mm típusú kolonnát használtam és a kolonna termosztát hőmérséklete 28 °C volt. A detektálást fótódióda soros UV-VIS detektor segítségével végeztem. A mérés a 200 nm – 650 nm hullámhosszúságú tartományban történt, amelyekből két kiválasztott (243 és 254 nm) hullámhosszon, nagyobb időbeli pontsűrűséggel vettem fel a kromatogramokat a 2.1.1.1.1 fejezetben ismertetett irodalmak alapján. Az abszorbancia maximum 243 nm-en volt, így a kiértékelést ezen a hullámhosszon kapott eredmények alapján végeztem.

A standardokból 5 pontos kalibráció alapján történt a mennyiségi meghatározás. Az eredményeket mitrafillin kalibráció alapján számítottam, mivel a kalibrációs egyenes meredeksége ez esetben bizonyult a legmeredekebbnek, tehát az alkaloidok mennyiségére alsó értéket adtam mg mitrafillin ekvivalens (ME) alkaloid/ g drog szárazanyag (sza.) mértékegységben. Az elemzés során kapott kromatogram (10. ábra) összes csúcsát alkaloidnak tekintettem, mert UV-VIS spektrumuk megegyezett és elúciós idejük csak mérsékelten különbözött. Az integrálást követően kapott adatokat összesítvén számítottam ki az alkaloid mennyiségét a mintában. A kromatogramok bizonyos csúcsait standardok alapján azonosítottam (11. ábra)



10. ábra. Jellemző alkaloid frakció kromatogramja

1. *Mitrafillin*, 2. *Pteropodin*, 3. *Izomitrafillin*, 4. *Izopteropodin*



11. ábra. Pentaciklusos alkaloid standardok

1. *Mitrafillin*, 2. *Pteropodin*, 3. *Izomitrafillin*, 4. *Izopteropodin*

3.5 Szabadgyök-fogó képesség mérése

A vizsgálatok során a kivonatok szabadgyök-fogó képességét DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) módszerrel mértem, amely során poláris környezetben történik az elemzés. A DPPH egy szabadgyök, oldatának színe lila. Ha reakcióba lép a jelen levő antioxidáns hatású vegyülettel, akkor sárga színű oldatot kapok, ez a DPPH redukált formája miatt adódik. A DPPH-oldatnak az abszorpciós maximuma 517 nm-en van, ahol a sárga oldatnak nincs elnyelése, emiatt az abszorbancia csökkenése koncentrációfüggő.

A törzsoldat készítése során 20 mg DPPH-t feloldottam 50 ml metanolban, majd hűtőben tároltam. A méréshez hígítottam az előbbi oldatot úgy, hogy az 517 nm-en mért abszorbanciája 0,700 és 0,900 közé essen. Vakmintának metanolt használtam. A hígítási sor elkészítéséhez 2,5 ml DPPH-oldathoz különböző mennyiségű mintaoldatot adtam. A küvetákat fénytől védve fél órán át állni hagytam. Ezt követően 517 nm-en mértem az abszorbanciákat Camspec M501 készülékkel. A mintaoldathoz 0,5 mg/ml-es oldatot készítettem az extraktumból, 10 mg kivonatot oldottam fel 20 ml metanolban. A mérés során kaptam egy A_0 abszorbancia-értéket, amelyet a minta nélküli oldattal mértem; illetve egy A_1 -et, amelyet a mintát tartalmazó oldattal mértem. Az inhibíciót a 1. egyenlet alapján számítottam.

$$Inh \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

1. egyenlet. Inhibíció számítása

A mérési eredmények összehasonlításához az 50%-os inhibíciót (IC_{50} érték) használtam, ezt a mérési adatokra illesztett függvényből számoltam ki. Az IC_{50} az a extraktumkoncentráció, amelynél a szabadgyökök mennyisége a felére csökken.

3.6 Tannin vizsgálata a mintákban

A tannin tartalom vizsgálatokat Markus Maier végezte a Fraunhofer UMSICHT-nál (Oberhausen, Németország). A vizsgálatokhoz az úgynevezett radiál diffúziós módszert alkalmazta. A módszer előnye, hogy a hidrolizált és kondenzált tannin mennyiségét egyszerre mérhető a tanninnál kisebb tömegű polifenolok reakciója nélkül. A tanninok gyűrűformájú csapadék formában jelennek meg a borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) proteint tartalmazó agaróz gélben a Petri-csészében. A gyűrűk átmérőjét lemérik, ebből kiszámítható a területük, amik egyenesen arányosak a tannin tartalommal. A mennyiségi meghatározást kalibrációs egyenes alapján végeztünk, a teljes tannintartalmat tanninsav tömeg ekvivalensben kifejezve (TE m/m%).

3.6.1 Meghatározási módszer leírása

Először 340 ml ioncserélt vízhez 11,44 ml ecetsavat és 4,2 mg aszkorbinsavat adunk és 5 M-os nátrium-hidroxid oldattal a pH-t 5-re állítjuk. Egy Erlenmeyer lombikba 400 mg BSA-t 40 ml ioncserélt vízben feloldunk. A következő lépésként 2 g agarózt oldunk az első lépésben elkészített pH=5 oldatban. Utóbbi rendszert addig melegítjük, míg az agaróz teljes mértékben fel nem oldódik, majd 60 °C-os vízfürdőbe helyezzük. Mikor az agaróz oldat hőmérséklete kevéssé 45 °C fölé van az elkészített BSA oldatot hozzáöntjük majd pár másodpercig kevertjük a megfelelő homogenizálás érdekében. A két oldatból 10-10 ml-t pipetázunk a Petri csészébe, egyenletesen vékony réteget alkotva. Miután megszilárdul a gél a használatig 4 °C-on hűtőszekrényben kell tárolni. A tannin tartalmú mintákat ioncserélt vízben, 50:50 víz – metanolban és 50:50 víz – acetonban feloldjuk, majd 20 µl-t pipetázunk a Petri csészében található gél közepére. A gyűrűk növekedése 30 °C-on 150 órán át zajlott, ezt követően mérték le az átmérőket. Mindhárom oldószer megfelelőnek bizonyult, az eredményeket a három oldószer esetén kapott értékekből átlagoltam.

3.7 Számítási módszerek

A technikai hozamot a kivonat tömeg és a felhasznált száraz drog mennyiségének hányadosaként számoltam (Y_{tech}), ez azonban esetenként tartalmaz citromsavat is, hiszen az extrakció során a szűrletbe, majd a bepárlás során visszamarad. A citromsav kihozatal torzító hatásának mérséklésére vezettem be a korrigált hozamot (Y_{korrr}). A korrigált hozam értékekkel alábecsültem a valós anyagkinyerést a citromsavat tartalmazó oldószerekkel történt extrakció esetén, mivel nem tudható a pontos citromsav mennyisége a kivonatban. Ennél fogva azt feltételeztem, hogy a felhasznált oldószer teljes citromsav mennyisége a szűrletbe került, onnan pedig a kivonatba. A számítást a 2. egyenlet alapján végeztem.

$$Y_{korrr,i} [\%] = \frac{m_{ex} - m_{szű} \cdot x_{c.s}}{m_{drog}} \cdot 100 \%$$

2. egyenlet. Korrigált hozam számítása, i-edik frakció

$Y_{korrr,i}$: Korrigált hozam, i-edik frakció [%]

m_{ex} : A kapott kivonat tömege [g]

$m_{szű}$: A szűrés után mért szűrlet tömege [g]

$x_{c.s}$: A felhasznált oldószer citromsav tartalma tömegtörtben [-]

m_{drog} : Az extrakcióhoz felhasznált száraz drog mennyisége [g]

A teljes korrigált hozamot (Y_{korrr}) a 3. egyenlettel számoltam, analóg egyenletet alkalmaztam a teljes technikai hozam számítására.

$$Y_{korrr} [\%] = \sum_{i=1}^3 Y_{korrr_i}$$

3. egyenlet. Teljes korrigált hozam számítása

Az egyes extrakció lépésekben a j alkotó koncentrációját (c_{ji}) a 4. egyenlet adja meg.

$$c_{ji} [mg ME / g extrakt] = \frac{A_i}{M_{ka.}} \cdot V_{minta} / m_{minta_i}$$

4. egyenlet. A j alkotó koncentrációja az i frakcióban

A_i : Kromatogram alapján kapott csúcsok összterülete [-]

$M_{ka.}$: A mitrafillin kalibrációs egyenes meredeksége [mg ME/ ml]

$m_{minta,i}$: A minta mennyisége [g extrakt]

V_{minta} : A minta oldatának mennyisége [ml]

Az adott komponensek kihozatalát (H_j) az 5. egyenlettel számoltam.

$$H_j [\%] = \sum_{i=1}^3 [(c_{ji}) \cdot Y_{tech_i}]$$

5. egyenlet. Komponensek kihozatalának számítása

A három lépéses extrakció során összesen kinyert j alkotó (alkaloid, tannin) átlagos koncentrációját (c_j) az extraktban a 6. egyenlet szerinti súlyozással számítottam.

$$c_j [mg ME / g extrakt] = \frac{H_j}{\sum_{i=1}^3 Y_{tech_i}}$$

6. egyenlet. Kivonat átlagos koncentrációjának számítása

4 Eredmények

Az extrakciós paraméterek hatásának részletes vizsgálata előtt előkísérletekkel állapítottam meg néhány alapvető paraméter közelítő hatását annak érdekében, hogy a későbbi vizsgálatok jól összehasonlítható eredményeket adjanak. Az előkísérletek során rögzített paraméterek: a drog – oldószer arány, a hőmérséklet, a lépések száma és az extrakciós idő.

4.1 Drog – oldószer arány vizsgálata

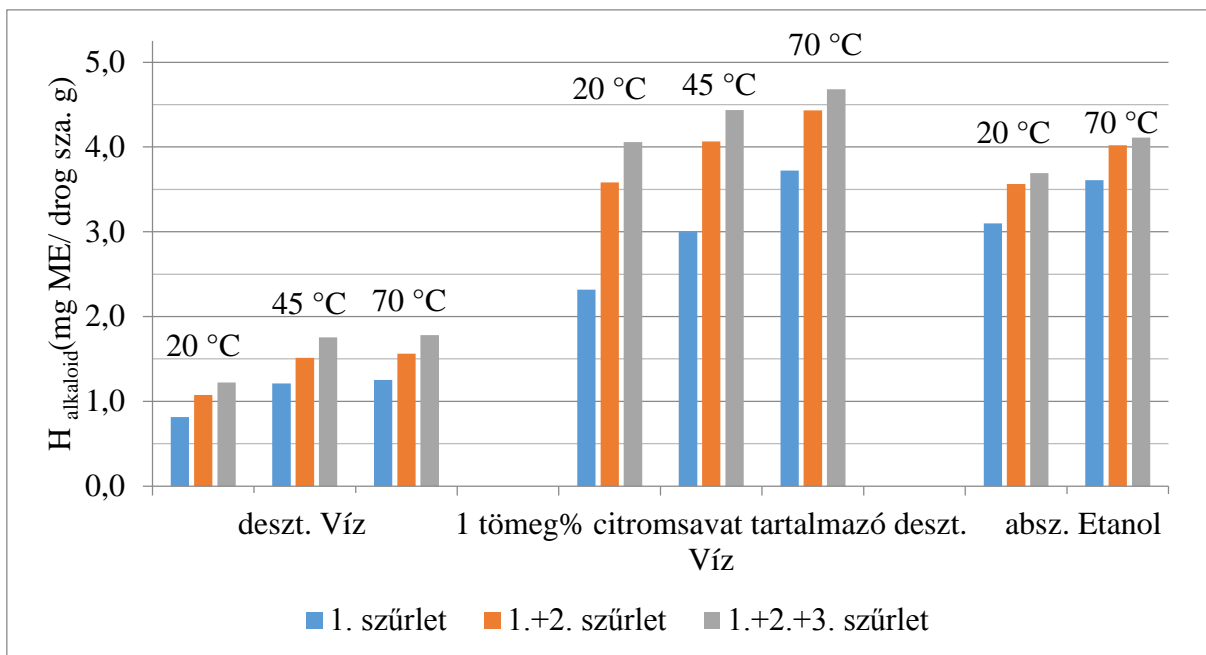
A vizsgálatok során 1 tömegszázalék citromsavat tartalmazó vizes oldat esetén vizsgáltam a különböző drog-oldószer arányokat. Az extrakció hőmérséklete 70 °C és a keverő fordulatszáma 300 1/min volt mindegyik esetben. Az eredményeket az 4. táblázatban szemléltetem. Nagymértékben nem változik a drog – oldószer arány esetén a korrigált termelés. A jól keverhető és szűrhető arányt 10 g drog – 200 ml oldószer esetén kaptam. Ennek előnye, hogy az analitikai meghatározások miatt magasabb koncentrációjú mintákat kell elemezni az érzékenységből adódóan, ezért a harmadik lépés elemzéséhez a 150 ml oldószer nem elegendő. A bepárlást követően a visszamérésből adódó hiba is kisebb a választott drog – oldószer arány esetén.

Drog – oldószer arány	Korrigált termelés [%]	Megfigyelés
5 g – 100 ml	20,1	a keverőt nem lepi el a szuszpenzió
5 g – 150 ml	22,1	keverés, szűrés rendben. A szűrés után a második lépésre visszakerülő drog mennyisége kevesebb (túl sok marad a szűrőpapíron)
10 g – 150 ml	-	nehezen keverhető, nem szűrhető
10g – 200 ml	19,5	rendben

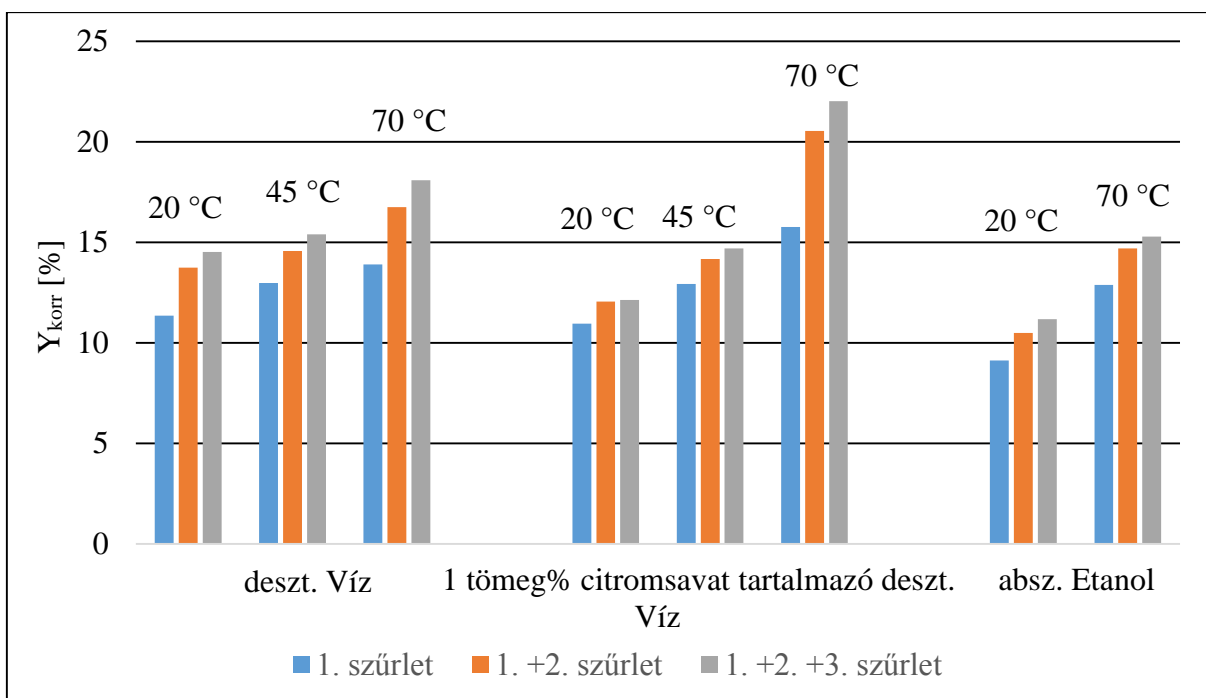
4. táblázat. Drog – oldószer arány vizsgálata során kapott értékek összehasonlítása

4.2 Hőmérséklet és extrakciós lépésszám hatása az extrakcióra

Előzetes kísérletekként a hőmérsékletet és három oldószer (1 tömegszázalék vizes citromsav oldat, desztillált víz és abszolút etanol) hatását vizsgáltam 10 g – 200 ml drog – oldószer arány mellett. A legnagyobb mértékű alkaloid kinyerést 70 °C-on értem el, mindhárom oldószer esetén. A háromlépéses extrakció eredményeit jól szemlélteti a 12. ábra, mely alapján elmondható, hogy etanol esetén a kioldható alkaloidok nagy részét kinyerjük az első lépésben. Azonban a másik két oldószer esetén a két lépés szükséges, mivel a második lépésnél is kinyerhető még számottevő alkaloid, míg a harmadik lépés esetén már alig növekszik az alkaloid kihozatal.



12. ábra. Különböző oldószerek és hőmérsékletek esetén az extrakciós lépésekkel kinyert alkaloid mennyisége

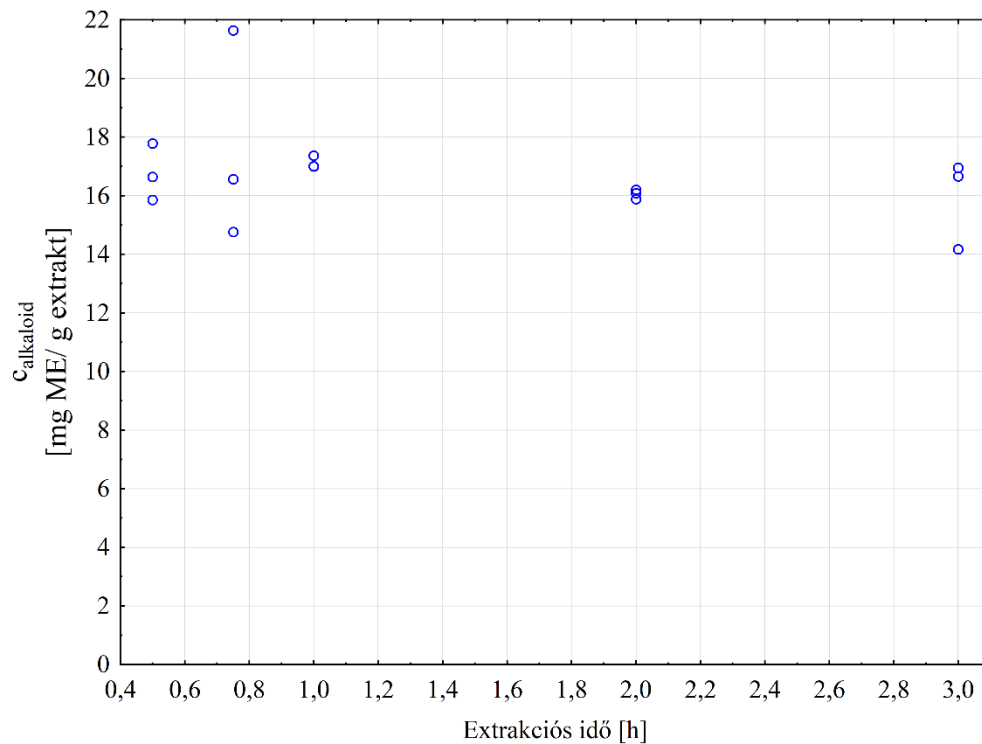


13. ábra. Különböző oldószerek és hőmérsékletek esetén az extrakciós lépésekkel által elért korrigált termelés

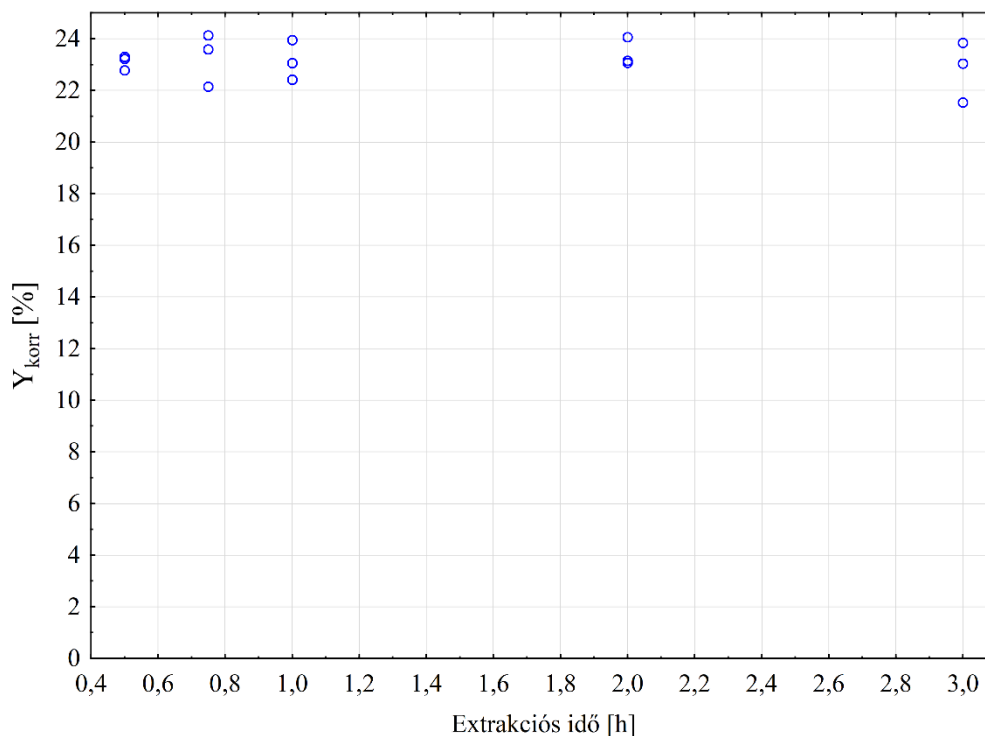
A korrigált termelést tekintve (13. ábra) a legnagyobb értéket 70 °C-on értem el 1 tömegszázalék citromsavat tartalmazó desztillált víz oldószerrel, melyek az alsó becsült értékek. A biztonság kedvéért a további kísérletekben is három extrakciós lépést végeztem és a 70 °C hőmérsékletet választottam.

4.3 Az extrakció idejének hatása a kihozatalra

A vizsgálatok során 10g – 200ml drog – oldószer arányt, 70 °C hőmérsékletet és három lépéses extrakciót végeztem. Oldószerként 1 tömegszázalék citromsav 50:50 víz – etanolt használtam, az extrakció idejét változtattam 0,5 – 3 h között és minden beállításnál három ismétlést végeztem. Az eredmények alapján (14. ábra, 15. ábra) elmondható, hogy az alkaloid koncentrációt a kivonatban, a korrigált termelést és az alkaloid kihozatalt az extrakció ideje nem befolyásolja jelentős mértékben a vizsgált tartományban. Azonban munkaszervezési okok miatt továbbiakban 1 órás extrakciós idővel végeztem a kísérleteket. Üzemi szinten a megfelelő kontakt idő rövidebbre is választható, de ekkor figyelembe kell venni a méretnövelt készülékben a keveredési viszonyokat.



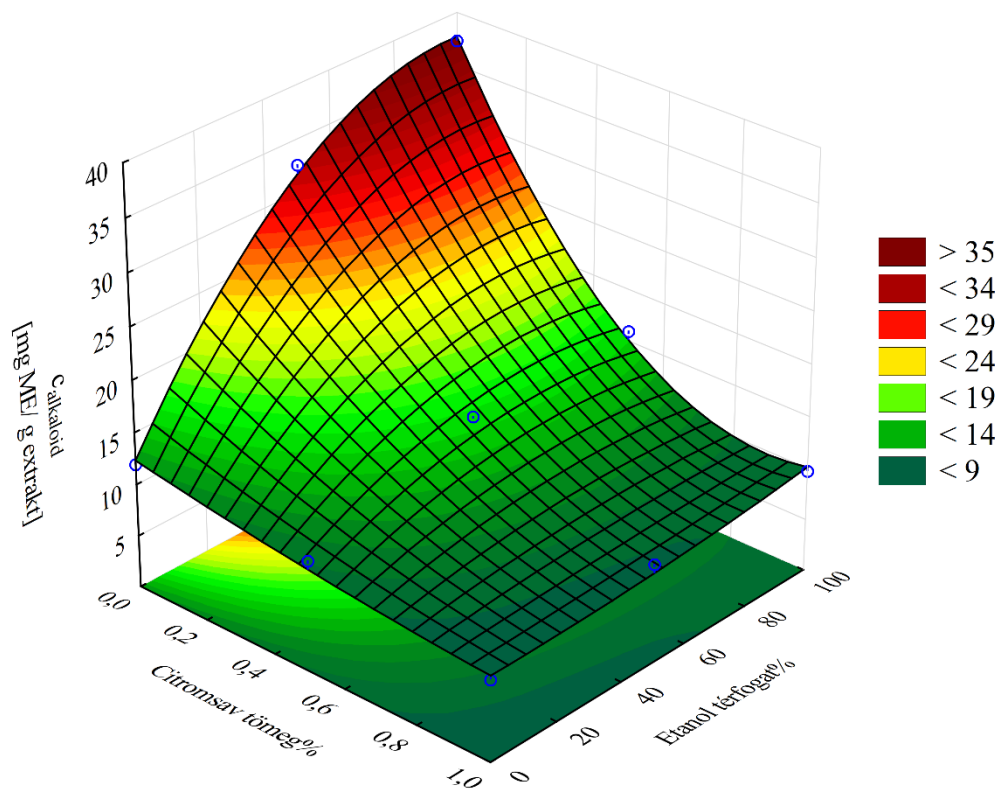
14. ábra. Extrakció idejének hatása a kivonat alkaloid koncentrációjára



15. ábra. Az extrakció idejének hatása a korrigált termelésre

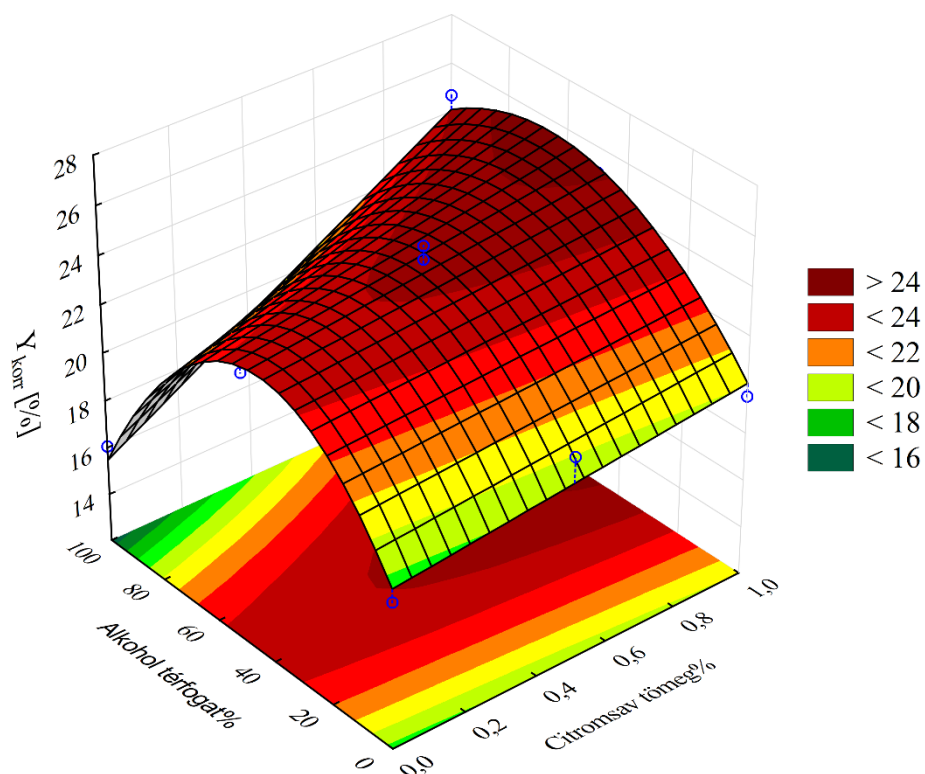
4.4 Citromsav és az etanol együttes hatása az extrakcióra

A vizsgálat során 3^2 kísérletterv alapján a citromsav koncentrációját 0 – 1 tömegszázalék között, míg az alkohol koncentrációját 0 – 100 térfogatszázalék között változtattam. Az extrakció hőmérséklete minden kísérletnél 70 °C volt, míg az extrakció ideje 1 óra, háromlépéses extrakciót végeztem 10 g – 200 ml drog – oldószer arány mellett. Az eredményeket Statistica 12.0 programmal értékeltem ki. Az alkaloid koncentrációját tekintve a kivonatokban 100 % etanol és 0 % citromsav tartalom mellett kaptam a legnagyobb értéket (16. ábra). Citromsav hozzáadása miatt nőtt a termelés, de az extraktumban csökkent az alkaloid koncentrációja. Utóbbi a hígulási hatással magyarázható, tehát minél töményebb az oldatunk citromsavra nézve, annál nagyobb mennyiségű citromsav fog megjelenni a kivonatban. Ez az oka annak, hogy nagyobb citromsav koncentráció mellett a kivonatban mérhető alkaloid koncentrációra nézve nem számottevő az alkohol hatása, míg kis citromsav koncentráció mellett éppen az alkohol koncentráció a meghatározó. A kísérletterv kiértékelése alapján lehetséges elkészíteni tetszőleges alkaloid koncentrációjú kivonatokot 7,7 – 37,3 mg ME/ g extrakt tartományban.



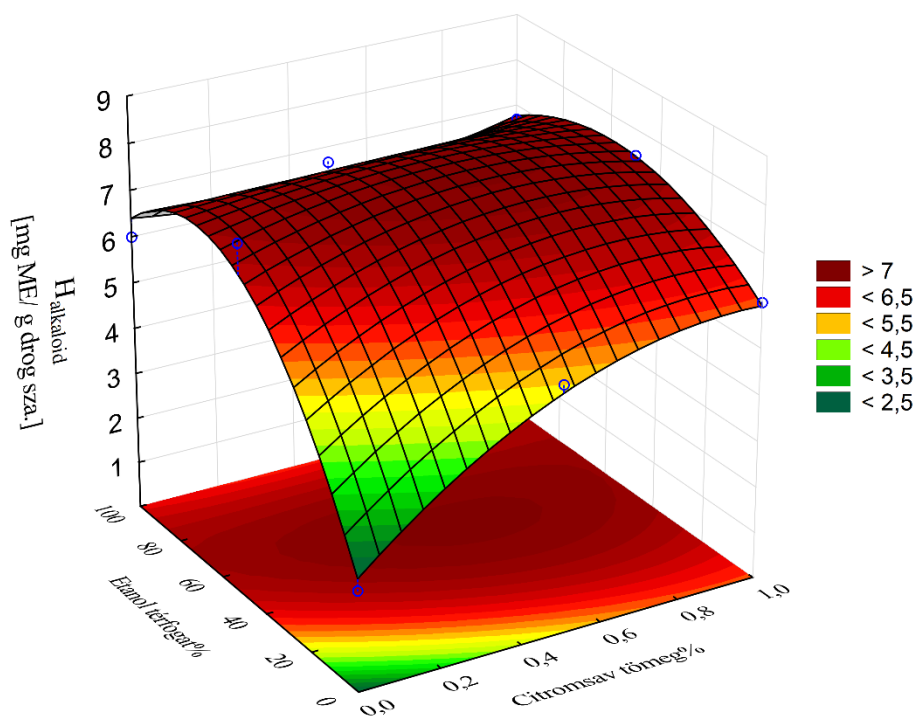
16. ábra. Összesített alkaloid koncentráció ábrázolása különböző citromsav tömegszázalék és alkohol térfogatarány mellett

A korrigált termelést tekintve az optimum 65 térfogatszázalék abszolút etanol és 1 tömegszázalék citromsav (17. ábra). Az alkohol koncentráció optimuma korrigált termelésre és az alkaloid kinyerésre (18. ábra) nézve megegyezik az irodalomban pentaciklusos alkaloidra megtalálható optimummal (2.2.4.1 fejezet). Többlet információ a kiértékelésem szerint, hogy a citromsav koncentráció és az etanoltartalom hatása független a termelésre nézve, de a kölcsönhatási tag meghatározó az alkaloid koncentráció és az alkaloid kihozatal szempontjából.



17. ábra. Összesített korrigált hozam az alkohol térfogat arány és citromsav tömegszázalék függvényében.

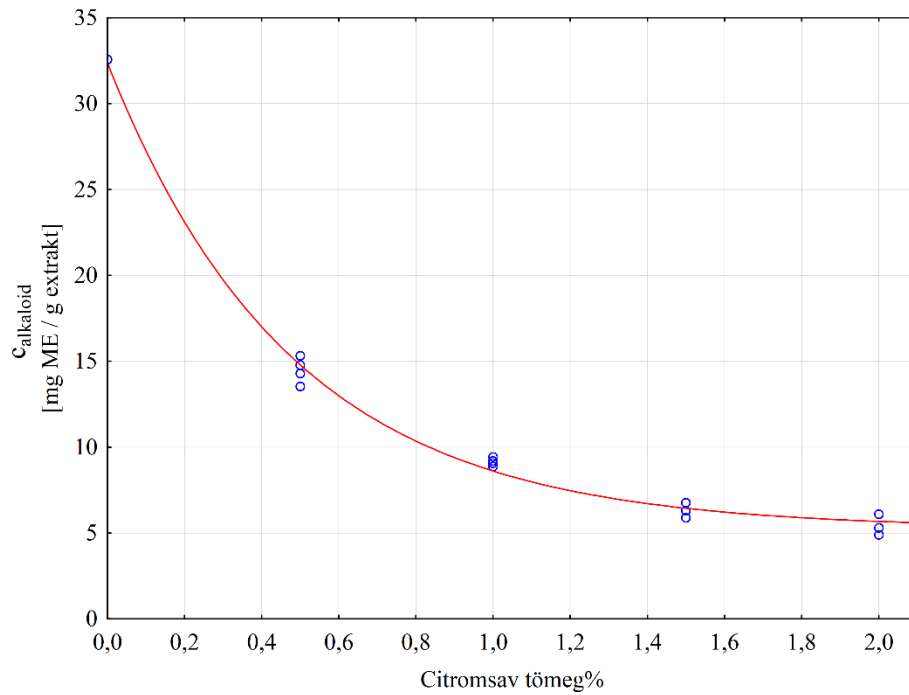
Az alkaloid kinyerés (18. ábra) szempontjából a felvett függvényből számítva optimumnak 55 térfogatszázalék abszolút etanol és 0,6 tömegszázalék citromsavnak bizonyult. A citromsav koncentráció növekedésével etanolmentes oldat esetén jól látható, hogy szignifikánsan növekszik a kinyert alkaloid mennyisége. Az oldószer citromsavtartalmának csak kis etanol koncentráció esetén van növekvő hatással az alkaloid kinyerésre, míg 40 térfogatszázalék nagyobb etanol koncentráció esetén a citromsav előnyei már alig jelentkeznek.



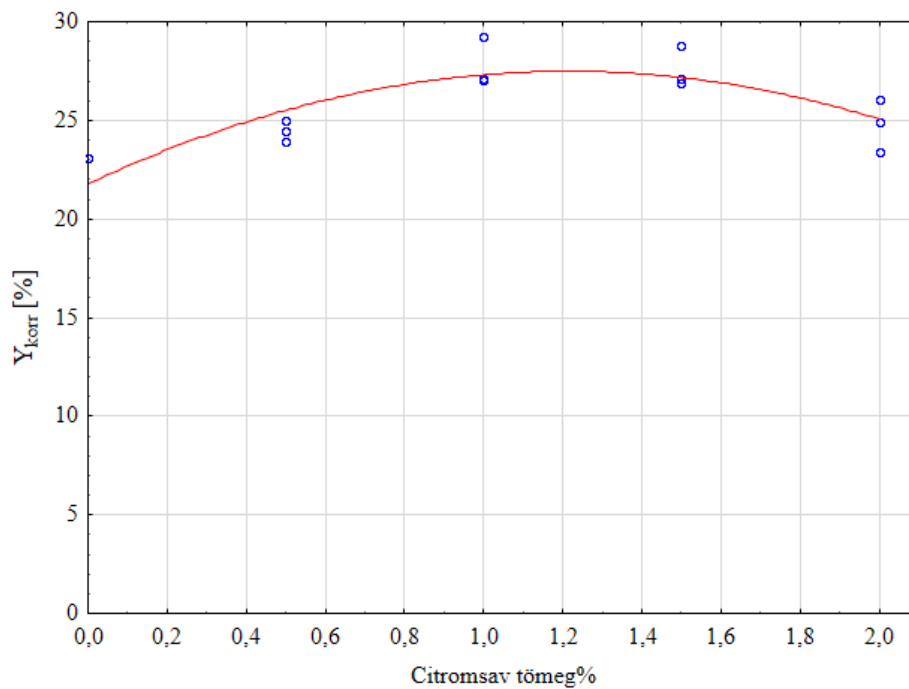
18. ábra. Összesített alkaloid kihozatal az alkohol térfogat arány és citromsav tömegszázalék függvényében (sza.=szárazanyag)

A legkisebb korrigált termelés értéket abszolút etanollal készített kivonat esetén kaptam (16,1 %), míg a legnagyobb korrigált termelést 0,5 tömegszázalék citromsav 50:50 víz – etanol oldószerrel kaptam (25,0 %). A citromsav koncentrációtól függetlenül a víz – alkohol arány 40:60 – 60:40 tartományban eredményez legnagyobb korrigált hozamot. Az illesztett függvény és az ábra alapján látható, hogy nem éri el a maximumot a kihozatal a vizsgált citromsav koncentráció tartományban, így további vizsgálatokat folytattam nagyobb citromsav koncentrációk esetén. Kísérleteket végeztem 1, 1,5 és 2 tömegszázalék citromsavtartalmú 50:50 víz – etanol oldószerrel (3-3 ismétlés). Az extrakciókat a kísérletterv esetén használt drog – oldószer aránnyal 70 °C-on 1 órás extrakciós idővel végeztem. Eredmények a 19. ábrán és 20. ábrán láthatók, melyek alapján elmondható, hogy a citromsav hígítási hatása szignifikánsan megmarad, de valamelyest csökken. A korrigált termelésnél (20. ábra) nagy a szórás, de ez betudható annak, hogy a szűrési hatások nem mindig azonosak. Az optimumnak 1,0 - 1,2 tömegszázalék citromsav oldatot kaptam. A 19. ábra alapján elmondható, hogy minél nagyobb a citromsav tartalma az extrahálószernek annál kisebb alkaloid koncentrációjú oldatokat ké-

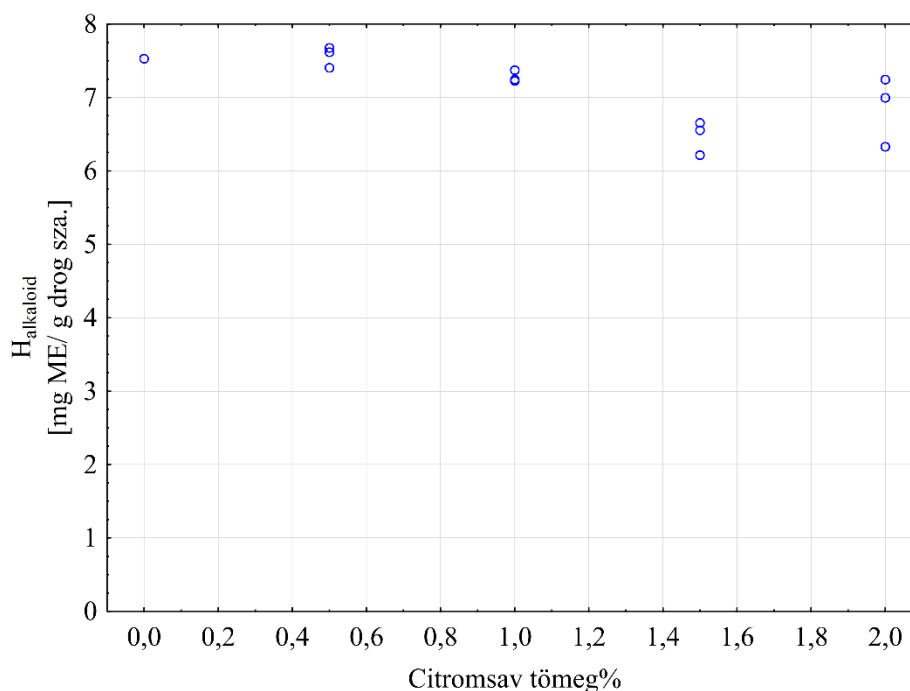
szíthetőek. Továbbá 21. ábrán látható, hogy növekedésnek jelentős hatása nincs az alkaloid kihozatalra 50:50 etanol – víz elegynél. A korrigált termelés csökkenését okozhatja, hogy a növekvő citromsav koncentráció esetén nő a kivonatba kerülő citromsav mennyisége, ezáltal egyre kisebb érték lesz a becsült termelés.



19. ábra. Különböző citromsav tartalmú oldatok hatása az alkaloid koncentrációra



20. ábra. Különböző citromsav tartalmú oldattal történő extrakció hatása a korrigált termelésre

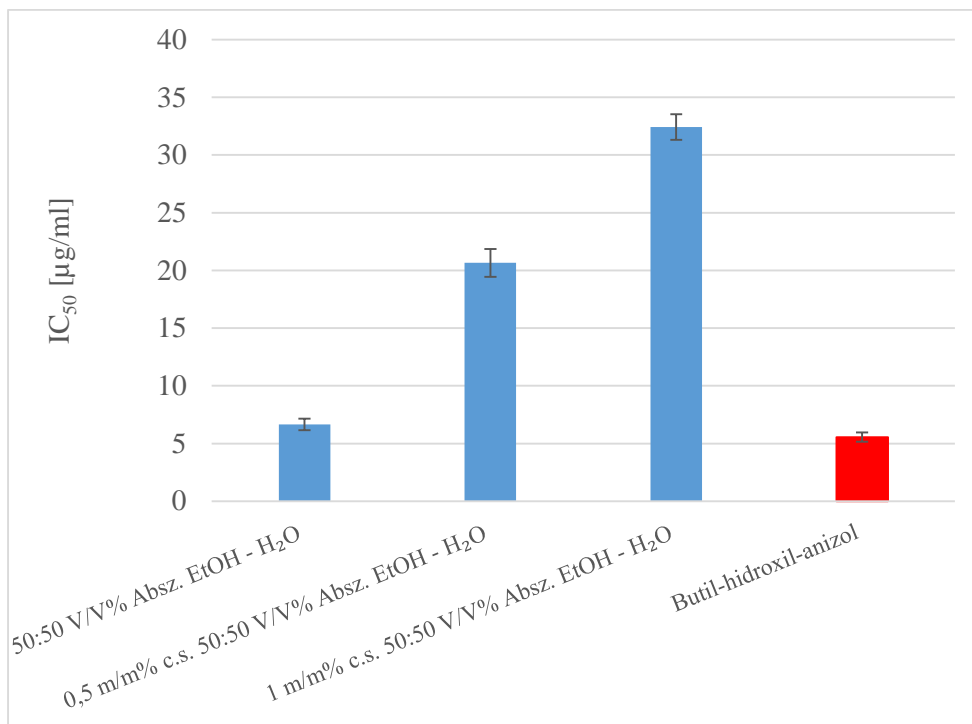


21. ábra. Különböző citromsav tartalmú oldattal történő extrakció hatása az alkaloid kihozatalra

A legkisebb koncentrációjú (~5 mg ME/ g extrakt) kivonatot 2 tömegszázalék citromsavtartalmú 50:50 víz – etanol oldószerrel kaptam. A legnagyobb koncentrációjú kivonatot (~33 mg ME/ g extrakt) citromsav mentes 50:50 víz – etanol oldattal értem el. Mindenképpen érdemes megfontolni a citromsav mennyiségét az oldószerben, mivel ez befolyásolja az alkaloid koncentrációt, a hozamot és a drog – extrakt arányát.

4.5 Szabadgyök-fogó képesség

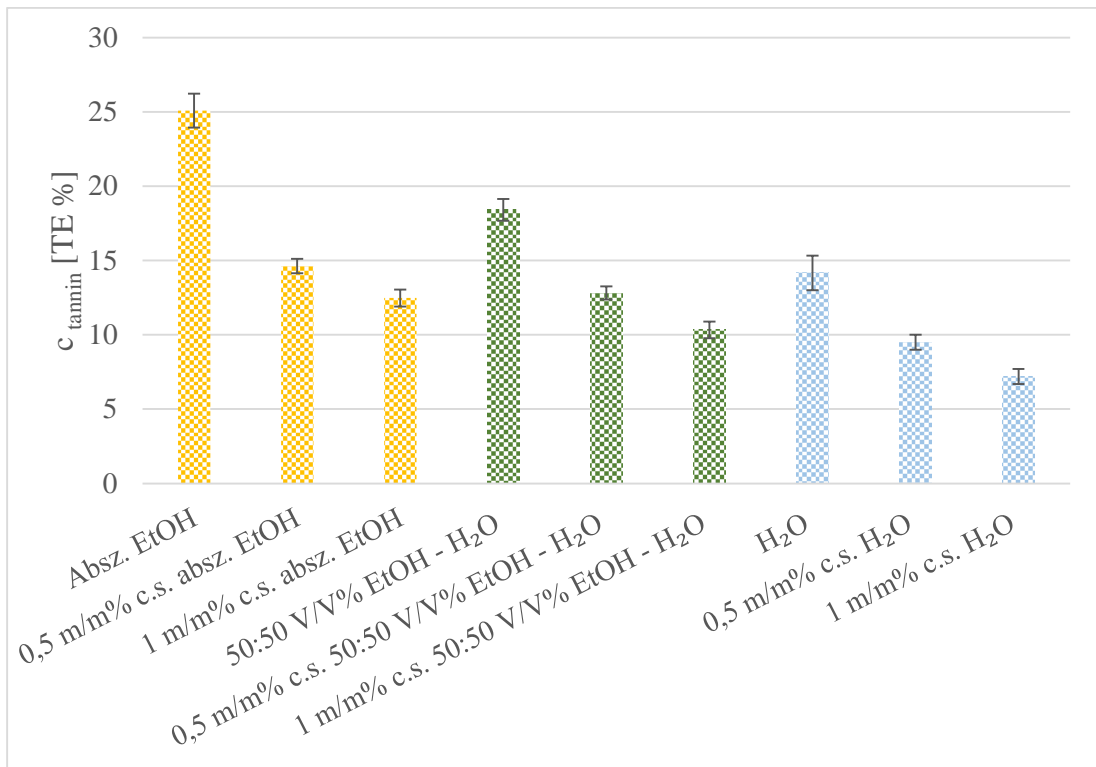
A kivonatok antioxidáns hatásának összehasonlításához a DPPH módszerrel meghatározott 50%-os gátlást (IC₅₀) használtam. Referenciaként egy szintetikus antioxidáns, a butilhidroxil-anizolt (BHA) használtam, az eredményét piros színnel jeleztem. A 22. ábra alapján elmondható, hogy az extrahálószer citromsav tartalmának növekedésével csökken a szabadgyök-fogó képesség (nő az IC₅₀ érték). A citromsavat tartalmazó oldószerrel kapott kivonatok citromsavat tartalmaztak. Ez utóbbi abból a szempontból igen érdekes, hogy a citromsavat antioxidánsként alkalmazza az élelmiszeripar, mégis a citromsavtartalmú kivonatok kisebb szabadgyök-fogó képességűek, mint a citromsav mentes kivonatok. Továbbá elmondható, hogy a macskakarom 50:50 víz – etanol oldószerrel kapott kivonatának (IC₅₀= 6,7 ± 0,5 µg/ml) a szabadgyök-fogó képessége szinte ugyanakkora, mint a BHA értéke (IC₅₀= 5,55 ± 0,4 µg/ml).



22. ábra. Néhány kivonat antioxidáns hatása

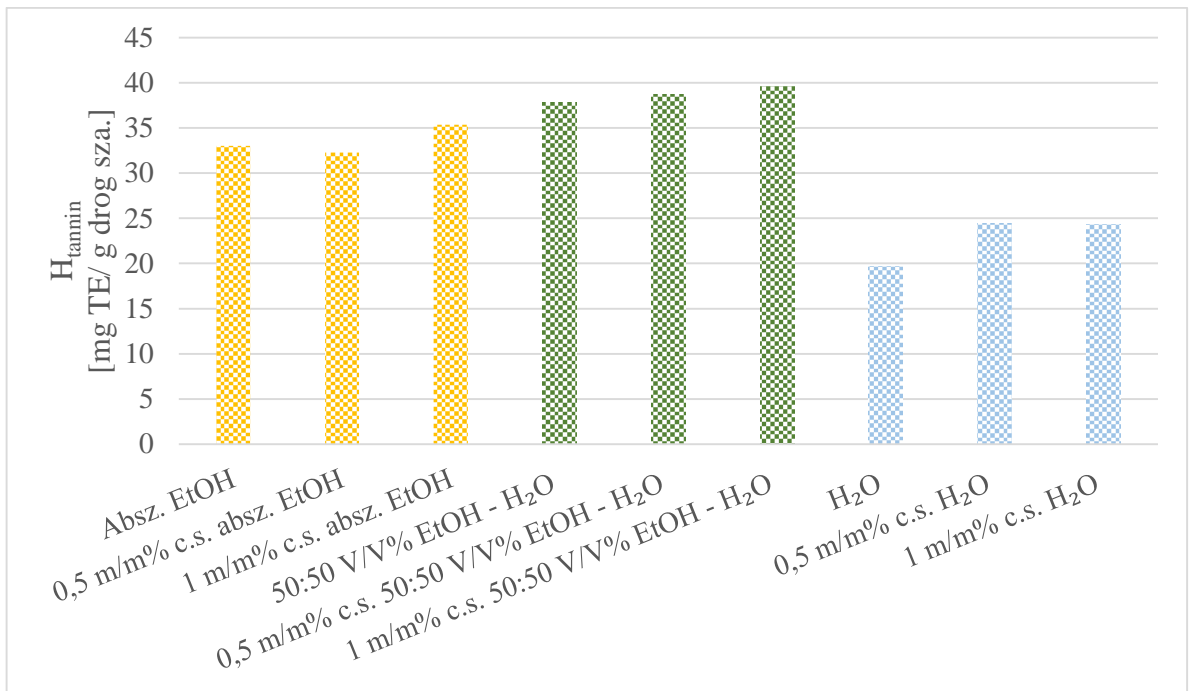
4.6 Tanninok mennyisége

A tannin vizsgálatokhoz a kísérlettervben kapott első lépések kivonatát használtam. Három fő oldószer típust (absz. etanol, 50:50 víz – etanol, víz) jelzi a 23. ábra színei. Az eredmények alapján elmondható, hogy az oldószerek citromsavtartalom növelésével csökkent a kinyert tannin mennyisége. Tehát a tannin kinyerés szempontjából a citromsav mentes oldószerek igen előnyösök, ezek közül is az abszolút etanol kiemelkedik, mely során a kivonat tannin tartalma $25,08 \pm 1,14$ %-nak adódott. Továbbá a 4.5 pontban említett eredményekkel összehasonlítva a tannin mennyiségeket biztos, hogy a növekvő citromsav koncentráció hátrányos a tannin kinyerés szempontjából. Az 50:50 víz – etanol oldószer esetén a nagy tannin tartalomhoz nagy antioxidáns tulajdonság párosul, így az eredmények alapján feltehetőleg az antioxidáns tulajdonságért a tanninok felelősek. A magas tannintartalmú kivonatok (>20%) alkalmasak lehetnek természetes cserzőszernek,[46] amelyekkel részben ki lehet váltani a bőripar által használt nehézfém-sókat.



23. ábra. Első extrakciós lépéssel előállított minták tannin tartalma (c.s.=citromsav)

Egyes tanninok savas tulajdonsága miatt savas pH esetén a kinyerése nehezkesebb, mint semleges vagy lúgos esetben, azonban kötött formában is jelen lehetnek a növényben, amit felszabadíthat egy esetleges savas hidrolízis, ezért a pH hatása a tannin jellegű komponensek kinyerésére nem egyértelmű. A tannin kihozatal a 24. ábrán látható, hogy etanol – víz elegy esetén a legjobb a tannin kihozatal, és az citromsavtartalomnak kisebb hatása van, mint a víz – alkohol aránynak.



24. ábra. Vizsgált minták tannin kihozatala (c.s.=citromsav)

5 Összefoglalás

TDK dolgozatomban a macskakarom kérgéből készített kivonatok alkaloid koncentrációjának a szabályozását vizsgáltam hagyományos kevertetési három lépéses extrakcióval. A munka motivációját az adja, hogy a széleskörű hatásspektrummal rendelkező gyógynövény étrend-kiegészítőként való hazai forgalmazása nem megengedett az oxindol alkaloid-tartalom miatt. Más országokban (pl. Ausztria és USA) éppen alkaloidtartalomra standardizált készítmények kaphatóak.

Oldószernek vizet, abszolút etanolt és 50:50 víz – etanol elegyet alkalmaztam és vizsgáltam a hozzáadott citromsavtartalom hatását. Az oldószer és a savas komponens kiválasztását az élelmiszeripari alkalmazhatóság motiválta. Előkísérleteim során az extrakció hőmérsékletének hatását vizsgáltam, amely során a legnagyobb mennyiségben és alkaloid koncentrációval 70 °C-on tudtam kivonatokat készíteni. Az eredményekből az is látszott, hogy az abszolút etanollal történő kivonás esetén egy lépéses extrakció elegendő, míg víz és a citromsav oldat esetén már legalább két lépés szükséges a rögzített drog – oldószer arány mellett. Léptéknövelés során vagy üzemi szinten megfontolandó kérdés, hogy szükséges-e három lépés, a 70 °C-on kapott eredményeket tekintve, azonban ezt természetesen a drog – oldószer aránnyal összefüggésben kell vizsgálni. Az extrakció költségeit figyelembe véve, véleményem szerint két lépéses extrakciót érdemes végezni, utóbbit a citromsavas oldószer és desztillált víz esetén értem. Abszolút etanollal esetén már érdemes fontolóra venni az egylépéses kevertetési extrakciót, lehetőleg centrifugálással kiegészítve, mivel a második és a harmadik lépés esetén lényegesen kevesebb hozamot érünk el, mint az első lépés esetén és ennek az oka is elsősorban a vázanyagban visszamaradó extrahálószer.

Az extrakciós idő az alkaloid koncentrációra és a korrigált termelésre nincs hatással 1/2-3 óra intervallumon belül. Az etanol és a citromsav együttes hatásának vizsgálata során egy 3² kísérlettervet készítettem. A kivonatok alkaloid koncentrációját kb. 5 – 37,3 mg ME / g extrakt tartományban szabályozhatjuk kevertetési extrakcióval. A legnagyobb értéket abszolút etanollal értem el. A korrigált termelés esetén az optimális a 40 – 65 % etanol és 1 – 1,2 tömegszázalék citromsavtartalom.

A kísérletterv során az első extrakciós lépés során kapott néhány kivonat antioxidáns hatását és tannintartalmát is vizsgáltam. Az eredmények alapján az 50:50 víz – etanol oldószerrel nyert kivonat antioxidáns hatása szinte megegyezik a referenciaként használt szintetikus

vegyületével, továbbá az oldószerek növekvő citromsavtartalma rontja a kivonatok szabadgyök-fogó képességét. Tanninkoncentráció szempontjából a citromsav mentes oldószerek bizonyultak a legjobbnak, ezek közül is az 50:50 etanol – víz elegy. A tanninsav ekvivalensben megadott tanninkoncentráció a kivonatot alkalmassá teszi természetes cserzőszerként való felhasználásra is. Az antioxidáns és tannin eredmények összevetése során arra a megállapításra jutottam, hogy a macskakarom kivonatok antioxidáns hatása feltehetőleg a tanninoktól származik.

A munkám során sikerült képet alkotnom a macskakarom hagyományos kevertetési extrakciójával kapcsolatban, amely útmutatást nyújthat a jövőbeli üzemi szintű termelésekhez.

6 Irodalomjegyzék

- [1] M. Vinatoru, “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 8, no. 3, pp. 303–313, Jul. 2001.
- [2] D. D. R. Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Center for Science and High Technology, 2008.
- [3] B.A. Varró, *Gyógynövények gyógyhatásai*. Pallas Antikvárium Kft, 1991.
- [4] P. Balbulka, *Ismerjük fel a vadon termő gyógynövényeket*. Gabo Kiadó, 2013.
- [5] M. E. Heitzman, C. C. Neto, E. Winiarz, A. J. Vaisberg, and G. B. Hammond, “Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae).,” *Phytochemistry*, vol. 66, no. 1, pp. 5–29, Jan. 2005.
- [6] R. Pilarski, B. Filip, J. Wietrzyk, M. Kuraś, and K. Gulewicz, “Anticancer activity of the Uncaria tomentosa (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition.,” *Phytomedicine*, vol. 17, no. 14, pp. 1133–1139, Dec. 2010.
- [7] K.-H. Reinhard, “Uncaria tomentosa (Willd.) D.C.: Cat’s Claw, Uña de Gato , or Savéntaro,” *J. Altern. Complement. Med.*, vol. 5, no. 2, pp. 143–151, Apr. 1999.
- [8] B. Falkiewicz and J. Łukasiak, “Vilcacora [Uncaria tomentosa (Willd.) DC. and Uncaria guianensis (Aublet) Gmell.] - A review of published scientific literature,” *Case Reports Clin. Pract. Rev.*, vol. 2, no. 4, pp. 305–316, Jan. 2001.
- [9] K. Keplinger, G. Laus, M. Wurm, M. P. Dierich, and H. Teppner, “Uncaria tomentosa (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 64, no. 1, pp. 23–34, Jan. 1998.
- [10] OÉTI Szakértő Testület, “Tudományos állásfoglalás az étrend-kiegészítőkben, egyéb anyagokkal dúsított élelmiszerekben alkalmazni kívánt Uncaria Tomentosa kéreg biztonságosságáról,” 2013.
- [11] A. Cardoso, “https://www.flickr.com/photos/andre_cardoso/6357770421.” 2011 .
- [12] G. Laus, D. Brössner, and K. Keplinger, “Alkaloids of peruvian Uncaria tomentosa,” *Phytochemistry*, vol. 45, no. 4, pp. 855–860, Jun. 1997.
- [13] C. Tucker, Klein K. Roger W. Mutalish, Evans B., “Development of a phytohabitat index for medicinal plants in the Peruvian Amazon,” *Acta Hort.*, vol. 426, pp. 123–131, 1996.
- [14] A.W. Nalvarta, W. de Jong, and G. Dominguez, “Plantas Amazonicas de uso medicinal: diagnostico de un sector economico con un potencial de realizacion,” 1999.

- [15] D. H. Römpf, "Römpf Vegyészeti Lexikon," 1960.
- [16] H. Stuppner, S. Sturm, and G. Konwalinka, "HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*," *Chromatographia*, vol. 34, no. 11–12, pp. 597–600, Dec. 1992.
- [17] S. Kaiser, S. Verza, and R. Moraes, "Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by common extraction methods," *Química Nova*, 2013.
- [18] M. F. Taviano, N. Miceli, M. T. Monforte, O. Tzakou, and E. M. Galati, "Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Benthams CNS depressing effects.," *Phytother. Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 382–385, Apr. 2007.
- [19] R. Rojas-Duran, G. González-Aspajo, C. Ruiz-Martel, G. Bourdy, V. H. Doroteo-Ortega, J. Alban-Castillo, G. Robert, P. Auberger, and E. Deharo, "Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 143, no. 3, pp. 801–804, Oct. 2012.
- [20] H. Wagner, B. Kreutzkamp, and K. Jurcic, "Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* und ihre Phagozytose-steigernde Wirkung," *Planta Med.*, vol. 51, no. 05, pp. 419–423, Feb. 2007.
- [21] K. K. Lee, B. N. Zhou, D. G. Kingston, A. J. Vaisberg, and G. B. Hammond, "Bioactive indole alkaloids from the bark of *Uncaria guianensis*," *Planta Med.*, vol. 65, no. 8, pp. 759–60, Dec. 1999.
- [22] G. Laus and D. Keplinger, "Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 662, no. 2, pp. 243–249, Feb. 1994.
- [23] S. Kaiser, S. G. Verza, R. C. Moraes, V. Pittol, E. M. C. Peñaloza, C. Pavei, and G. G. Ortega, "Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box–Behnken design," *Ind. Crops Prod.*, vol. 48, pp. 153–161, Jul. 2013.
- [24] R. Pilarski, H. Zieliński, D. Ciesiołka, and K. Gulewicz, "Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 104, no. 1–2, pp. 18–23, Mar. 2006.
- [25] G. Rácz, *Gyógynövény ismeret*. Ceres Kiadó, Bukarest, 1984.
- [26] M. T. A. Balázs, A. Blázovics, Á. Kéry, L. Kursinszki, É. Lemberkovics, É. Szőke, *Farmakognózia-Fitokémia, gyógynövények alkalmazása*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012.
- [27] R. Rizzi, F. Re, A. Bianchi, and V. De Feo, "Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts," *J. Ethnopharmacol.*, 1993.

- [28] Y. Sheng, R. Pero, A. Amiri, and C. Bryngelsson, "Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*," *Anticancer Res.*, 1997.
- [29] M. Sandoval, N. N. Okuhama, X. J. Zhang, L. A. Condezo, J. Lao, F. M. Angeles', R. A. Musah, P. Bobrowski, and M. J. S. Miller, "Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content.," *Phytomedicine*, vol. 9, no. 4, pp. 325–337, May 2002.
- [30] J. L. Aguilar, P. Rojas, A. Marcelo, A. Plaza, R. Bauer, E. Reininger, C. A. Klaas, and I. Merfort, "Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae).," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 81, no. 2, pp. 271–6, Jul. 2002.
- [31] C. Wirth and H. Wagner, "Pharmacologically active procyanidines from the bark of *Uncaria tomentosa*," *Phytomedicine*, vol. 4, no. 3, pp. 265–6, Sep. 1997.
- [32] H. R. Choi, J. S. Choi, Y. N. Han, S. J. Bae, and H. Y. Chung, "Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts.," *Phytother. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 364–367, Jun. 2002.
- [33] Stanley L. Robinson, *A patológia alapjai*, no. Medicina Könyvkiadó Zrt. 2009.
- [34] H. Stuppner, S. Sturm, G. Geisen, U. Zillian, and G. Konwalinka, "A Differential Sensitivity of Oxindole Alkaloids to Normal and Leukemic Cell Lines," *Planta Med.*, vol. 59, no. S 1, pp. A583–A583, Jan. 2007.
- [35] G. K. Kynoch, S.R., Lloyd, "Acute oral toxicity to mice of substance E- 2919," *Unpubl. (available request)*, no. Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England, 1975.
- [36] Y. Sheng, C. Bryngelsson, and R. W. Pero, "Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 69, no. 2, pp. 115–126, Feb. 2000.
- [37] TH. Ueng, JJ. Kang, HW. Wang and PC. Lin, "An Overview of the Toxicology of Commonly Used Traditional Chinese Medicine," no. 5, pp. 241–263, Nov. 1997.
- [38] L. G. Valerio and G. F. Gonzales, "Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*) : a critical synopsis.," *Toxicol. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 11–35, Jan. 2005.
- [39] G. Fábry, Zs. Fonyó, *Vegyipari művelettani alapismeretek*. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 1998.
- [40] E. Cséfalvay, A. Deák, T. Farkas, L. Hanák, L. T. Mika, P. Mizsey, J. Sawinsky, B. Simándi, T. Szánya, E. Székely, E. Vágó, *Vegyipari műveletek II. Anyagátadó műveletek és kémiai reaktorok*. Typotex Kiadó, Budapest, 2011.
- [41] J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar, "Techniques for

- extraction of bioactive compounds from plant materials: A review,” *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, Aug. 2013.
- [42] M. M. Cowan, “Plant products as antimicrobial agents.,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 4, pp. 564–582, Oct. 1999.
- [43] Magyar Élelmiszerkönyv Bizottság, “Az élelmiszerek előállítása során felhasználható extrakciós oldószerek,” *Magy. Élelmiszerkönyv*, vol. 1–2–88/344, 2002.
- [44] “Magyar Élelmiszerkönyv 1-2-95/2 számú előírás,” 2015.
<http://www.omgk.hu/Mekv/1/12952.pdf>.
- [45] B. Caballero, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, no. Academic Press. 2003.
- [46] T. Covington, *Tanning chemistry : the science of leather*. Cambridge UK: Royal Society of Chemistry, 2009.