

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Soproni Egyetem, Erdőmérnöki Kar

Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola

K1 Biokörnyezettudományi Program

**ANTIOXIDÁNS PARAMÉTEREK VIZSGÁLATA
MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ ERDEI FAFAJOK
LEVÉL- ÉS KÉREG SZÖVETEIBEN**

Készítette: Tálos-Nebehaj Esztella

Témavezető: Dr. habil Hofmann Tamás

Sopron

2017.

**Antioxidáns paraméterek vizsgálata Magyarországon előforduló erdei fafajok
levél- és kéreg szöveteiben**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében
a Soproni Egyetem Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskolája
K1 Biokörnyezettudományi Programja keretében.

Írta:
Tálos-Nebahaj Esztella

Témavezető: Dr. habil. Hofmann Tamás

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton % -ot ért el,

Sopron,

.....
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Első bíráló (.....) igen /nem

.....
(aláírás)

Második bíráló (.....) igen /nem

.....
(aláírás)

Esetleg harmadik bíráló (.....) igen /nem

.....
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el

Sopron,

.....
a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése:

.....
az EDHT elnöke

NYILATKOZAT

Alulírott **Tálos-Nebhaj Esztella**, jelen nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy az **Antioxidáns paraméterek vizsgálata Magyarországon előforduló erdei fafajok levél- és kéreg szöveteiben** c. PhD értekezésem önálló munkám, az értekezés készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. törvény szabályait, valamint a Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola által előírt, a doktori értekezés készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében*.

Kijelentem továbbá, hogy az értekezés készítése során az önálló kutatómunka kitétel tekintetében témavezetőmet, illetve a programvezetőt nem tévesztettem meg.

Jelen nyilatkozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy az értekezést nem magam készítettem, vagy az értekezéssel kapcsolatban szerzői jogsértés ténye merül fel, a Soproni Egyetem megtagadja az értekezés befogadását.

Az értekezés befogadásának megtagadása nem érinti a szerzői jogsértés miatti egyéb (polgári jogi, szabálysértési jogi, büntetőjogi) jogkövetkezményeket.

Sopron, 20.....

.....

doktorjelölt

* 1999. évi LXXVI. tv. 34. § (1) A mű részletét – az átvevő mű jellege és célja által indokolt terjedelemben és az eredetihez híven – a forrás, valamint az ott megjelölt szerző megnevezésével bárki idézheti.
36. § (1) Nyilvánosan tartott előadások és más hasonló művek részletei, valamint politikai beszédek tájékoztatás céljára – a cél által indokolt terjedelemben – szabadon felhasználhatók. Ilyen felhasználás esetén a forrást – a szerző nevével együtt – fel kell tüntetni, hacsak ez lehetetlennek nem bizonyul.

TARTALOMJEGYZÉK

KIVONAT	5
ABSTRACT	6
1. BEVEZETÉS	7
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Antioxidánsok és szabad gyökök	8
2.2. Az antioxidáns vegyületek csoportosítása	11
2.3. A polifenolos antioxidánsok	12
2.3.1. A polifenolok csoportosítása	12
2.3.2. A polifenolos vegyületek bioszintézise és sejten belüli elhelyezkedése	15
2.4. A növényi polifenolok mennyiségét befolyásoló tényezők	16
2.5. Erdei fák levél- és kéregszövetek jellemzése	18
2.6. Erdei fák szövetekben lévő antioxidánsok és hasznosítási lehetőségeik	21
2.7. A növényekben előforduló antioxidáns hatású vegyületek tartósítási módszerei	25
2.8. Antioxidáns tulajdonságok jellemzésére alkalmas módszerek	28
2.8.1. Elektronátmeneten alapuló fontosabb módszerek	30
2.8.1.1. Folin-Ciocalteu-módszer	30
2.8.1.2. ABTS-módszer	31
2.8.1.3. DPPH-módszer	32
2.8.1.4. FRAP-módszer	33
2.8.2. Összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalom meghatározása	35
2.9. Antioxidáns hatású vegyületek extrakciójára alkalmas módszerek	36
2.10. Polifenolos vegyületek HPLC-PDA-MS/MS elválasztása és azonosítása	37
3. CÉLKITŰZÉSEK	44
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	45
4.1. Kísérletek, mérések helye	45
4.2. Növényi minták és mintavétel, vizsgálatok ütemezése	45
4.2.1. Levélminták gyűjtése	45
4.2.2. Vizsgálatok levélmintákból	46
4.2.3. Kéregminták gyűjtése	47
4.2.4. Vizsgálatok kéregmintákból	47
4.3. Felhasznált vegyszerek, reagensek	49
4.4. A mérések során használt műszerek és eszközök	49
4.5. Minták extrakciója	50
4.5.1. Levélminták extrakciója	50

4.5.2.	Levelek extraktanyag-tartalmának meghatározása	50
4.5.3.	Levelek szárazanyag-tartalmának meghatározása	50
4.5.4.	Kéregminták extrakciója	50
4.5.5.	Kéregminták extraktanyag-tartalmának meghatározása	51
4.5.6.	Kéregminták szárazanyag-tartalmának meghatározása.....	51
4.6.	Vizsgálati módszerek.....	51
4.6.1.	Antioxidáns kapacitás értékek meghatározása	51
4.6.1.1.	Folin-Ciocalteu-féle összes polifenol-tartalom	51
4.6.1.2.	ABTS-módszer.....	52
4.6.1.3.	DPPH-módszer.....	52
4.6.1.4.	FRAP-módszer	53
4.6.2.	Összes flavonoid-tartalom meghatározása	53
4.6.3.	Összes flavan-3-ol-tartalom meghatározása.....	53
4.6.4.	Polifenolos vegyületek HPLC-PDA-MS/MS elválasztása és azonosítása.....	54
4.6.4.1.	Közönséges gyertyán levélextraktum.....	54
4.6.4.2.	Bükk kéregextraktum	55
4.7.	Statisztikai elemzések.....	56
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	57
5.1.	Levélvizsgálatok.....	57
5.1.1.	A minta-előkészítés és a mintavétel optimalálása.....	57
5.1.1.1.	A mikrohullámú kezelés hatása.....	57
5.1.1.2.	Extrakciós oldószer optimalálása	60
5.1.1.3.	Mintavételi időpont optimalálása	62
5.1.2.	A levelek antioxidáns paramétereinek szezonális változása	65
5.1.2.1.	Az antioxidáns kapacitás szezonális változása.....	65
5.1.2.2.	A fenolos vegyületek szezonális változása.....	69
5.1.3.	Közönséges gyertyán levél polifenoljainak HPLC-PDA-MS/MS elválasztása és azonosítása.....	73
5.1.3.1.	Fenolos savak és származékaik	75
5.1.3.2.	Tanninok.....	76
5.1.3.3.	Flavonoid-glikozidok	78
5.1.3.4.	Katechinek és procianidinek	80
5.1.3.5.	Ismeretlen vegyületek.....	80
5.2.	Kéregvizsgálatok	81
5.2.1.	A minta-előkészítés optimalálása.....	81
5.2.1.1.	A mikrohullámú kezelés hatása.....	81

5.2.1.2.	Extrakciós módszer és oldószer optimalálása	83
5.2.2.	Bükk kéreg polifenoljainak HPLC-PDA-MS/MS elválasztása, azonosítása és relatív mennyiségi meghatározása	89
5.2.2.1.	Polifenolok azonosítása	89
5.2.2.2.	Polifenolok relatív mennyiségi meghatározása	95
5.2.3.	Antioxidáns paraméterek a vizsgált erdei fafajok kéregszöveiben	98
5.2.3.1.	Antioxidáns kapacitás meghatározása	98
5.2.3.2.	Összes fenolos vegyület mennyiségi meghatározása	100
5.2.3.3.	Összegzett antioxidáns kapacitás értékek meghatározása	102
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)	104
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	106
8.	SUMMARY	109
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	112
10.	IRODALOMJEGYZÉK	113
	MELLÉKLETEK	127

KIVONAT

Antioxidáns paraméterek vizsgálata Magyarországon előforduló erdei fafajok levél- és kéreg szöveteiben c. értekezéshez

A Magyarországon előforduló erdei fafajok levelei és kérge antioxidáns paramétereinek vizsgálata hiánypótló alapkutatás, emellett jelentős gyakorlati vonatkozással is rendelkezhet. Az eredmények nemcsak a tudományt gazdagítják, hanem a mellékterméknek számító falevél- és kéreg antioxidánsai az élelmiszeriparban, gyógyászatban, stb. is hasznosíthatók lehetnek, amint azt több nemzetközi példa is bizonyítja. Vizsgálataim során meghatároztam a legjelentősebb hazai erdei fafajok levél- és kéreg szöveteinek antioxidáns kapacitását (DPPH-, FRAP-, ABTS-módszerrel), a fenolos vegyületeik (összes polifenol-, összes-flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalom) mennyiségét, valamint kiválasztott minták esetében elvégeztem a polifenolos antioxidánsok HPLC-PDA-MS/MS vizsgálatát is.

Vizsgálataim elején optimalizáltam a minta-előkészítés egyes szakaszait mindkét növényi rész esetében. Először megvizsgáltam a mikrohullámú kezelés hatását a polifenolokat oxidáló enzimek inaktiválása céljából, majd vizsgáltam az extrakciós oldószer összetételének és az extrakciós módszer hatását a kivonatok antioxidáns kapacitására. Szobahőmérsékleten az ultrahangos extrakció szolgáltatta a leggyorsabb kioldást a szövetekből, ezért a továbbiakban ezt a módszert alkalmaztam metanol:víz 80:20 v/v% eleggyel. Mivel a bükk kéreg az egyik legjelentősebb magyarországi faipari melléktermék, ezért erre a mintára külön részletes vizsgálatokat is végeztem. Megállapítottam, hogy megnövelt nyomás és hőmérsékleti körülmények mellett a víz is lehet legalább annyira hatékony oldószer az antioxidánsok kivonására, mint az alkohol-tartalmú elegyek.

A DPPH, FRAP és ABTS módszerekből kapott eredmények alapján egy pontrendszert dolgoztam ki a minták „összesített” antioxidáns erejének megállapítására. A 12 vizsgált fafaj esetében megállapítottam, hogy a legerősebb antioxidáns hatással a közönséges gyertyán, a szelídgesztenye és a molyhos tölgy késő nyári/kora őszi levelei rendelkeznek. A 11 vizsgált fafaj kéregmintái tekintetében a legtöbb antioxidáns hatású vegyületet a fekete cseresznye hancsában, valamint a szelídgesztenye és a vörösfenyő héjkérgében mutattam ki.

Az antioxidáns tulajdonságokért felelős fenolos vegyületek azonosítása HPLC-PDA-MS/MS módszerrel történt. A kiválasztott minták (közönséges gyertyán levél- és a bükk kéreg) esetében ilyen jellegű vizsgálatokat korábban még nem végeztek. A közönséges gyertyán levélkivonatából 171 vegyületet választottam el és 92 vegyületet azonosítottam, melyek között gallotanninok, ellagitanninok, flavonoid-glikozidok, fenolos savak és flavan-3-olok is megtalálhatók. A bükk kéreg esetében összesen 37 komponenst választottam el, és ebből 28-at azonosítottam, köztük katechineket, procianidineket és taxifolin-glikozidokat.

ABSTRACT

Determination of antioxidant parameters in the leaf and bark tissues of Hungarian forest tree species

The investigation of antioxidant parameters of the leaves and barks of Hungarian forest tree species is a basic research, yet it has also significant practical aspects. The results do not only contribute to the science, but the antioxidants of the by-products of tree leaf and bark can be utilized in the food industry, therapeutics etc. as demonstrated by several international examples. In the course of my research I determined the antioxidant capacity (DPPH, FRAP, ABTS method) and the phenolic compounds (total phenol, total flavonoid and total flavan-3-ol content) of the bark and leaves of most important Hungarian forest tree species. In the case of selected samples the detailed HPLC-PDA-MS/MS profiling of polyphenolic compounds was also carried out.

As a first step I optimized certain phases of the sample preparation for both plant parts. I examined the effect of microwave pretreatment for the inactivation of polyphenol-oxidizing enzymes and then I determined the efficiency of the extraction solvent composition and the extraction methods. At room temperature ultrasonication provided the fastest extraction from the tissues, thus this method was used henceforward with methanol:water 80:20 v/v. Since beech bark is one of the most important by-product of Hungarian wood industry, I have investigated special detailed examinations from this sample. It was found that under increased pressure and temperature conditions, water can be as effective as alcohol-containing mixtures for the extraction of antioxidants.

Based on the results obtained from the DPPH, FRAP and ABTS methods, I developed a score system for determining the overall antioxidant power of leaf and bark samples. In the case of 12 examined species I have found that European hornbeam, sweet chestnut and downy oak leaves have the strongest antioxidant effect in their late summer/at early autumn extracts. For the bark samples of the 11 examined species, the most antioxidant compounds were found in the inner bark of black cherry and in the outer bark of sweet chestnut and European larch.

The profiling of compounds, that contribute to antioxidant properties was performed by HPLC-PDA-MS/MS method. This type of detailed study from European hornbeam leaf and European beech bark extracts has not yet been carried out. In European hornbeam's leaves altogether 171 compounds were separated and 92 were identified and characterized including gallotannins, ellagitannins, flavonoid glycosides, phenolic acids and flavan-3-ols. In beech bark 37 compounds were separated and 28 were identified including catechins, procyanidins and taxifolin-glycosides.

*„A tudomány megköveteli a pontosságot mérésben,
gondolkodásban és hivatkozásban egyaránt.”*

(Beck Mihály)

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben jelentősen megnövekedett a polifenolos jellegű, antioxidáns hatású vegyületekkel kapcsolatos kutatások száma. Elsősorban azok betegségekre gyakorolt pozitív hatásai miatt.

A növényi antioxidánsok nagyon sokfélék lehetnek, ide sorolhatóak a polifenolok mellett az aszkorbinsav, a tokoferolok, terpenoidok, bizonyos enzimek, és fémek, pl. a szelén. A növényekben az antioxidáns hatással rendelkező vegyületek másfajta feladatokat is elláthatnak: a karotinoidok a fényvédelemben és a pigmentációban segítik a növényt. A mono-, és diterpének, amelyek az illóolajok fő komponensei, allelopátiás szerekként viselkednek növény-növény, növény-patogén kórokozó, vagy növény-növényevő állat közötti kölcsönhatásban. A kutatások bizonyítják, hogy a növényi polifenolok szintézise és akkumulációja általában a biotikus stresszre (gomba-, bakteriális- vagy vírusfertőzés) illetve abiotikus stresszre és környezeti hatásokra (pl. sótartalom növekedése, szárazság, napsugárzás, stb.) adott válaszreakcióval is összefüggésben van egy adott növényfaj esetében. Továbbá nemcsak antioxidáns, hanem vírusellenes, antimikrobiális hatásúak is lehetnek ezek a vegyületek, valamint alkalmasak a fémionok megkötésére, enzimek gátlására is.

Az antioxidáns tulajdonságok megbízható, reprodukálható és számszerű meghatározása fontos feladat. Annak ellenére, hogy számtalan kutatást találhatunk Magyarországon előforduló borok, zöldségek és gyümölcsök antioxidáns jellegű komponenseinek jellemzéséről, kifejezetten a hazai erdei fajok szövetekben jelenlévő ilyen jellegű vegyületekről csak kevés eredményt közöltek. Erdei fák esetében az antioxidáns kapacitás értékek meghatározása, és ezzel együtt az antioxidáns tulajdonságok vizsgálata elsősorban védekezési, védelmi reakciók vizsgálata miatt került előtérbe (gomba- vagy baktériumfertőzés, klimatikus adaptáció, stb.), valamint az egyes fa melléktermékekből (ággöcs, kéreg, stb.) kivonható és potenciálisan hasznosítható anyagok kapcsán, melynek kutatására több nemzetközi tapasztalat is van. Noha a kutatási téma növényélettani, humán-egészségügyi és táplálkozástani szempontból is jelentős, hasonló jellegű átfogó vizsgálatok speciálisan Magyarországon előforduló erdőalkotó fajok szövetekre még nem történtek meg.

Doktori disszertációm célja ennek megfelelően az volt, hogy a hazánkban előforduló legfontosabb erdei fák szövetei (elsősorban levél és kéreg) antioxidáns paramétereinek összehasonlító vizsgálatát elvégezzem, meghatározzam a szövetekben jelenlévő polifenolos vegyületek minőségét és mennyiségét, továbbá nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás/tandem tömegspektrometriás módszerekkel azonosítsam azokat a vegyületeket, amelyek ezen antioxidáns tulajdonságokért felelősek.

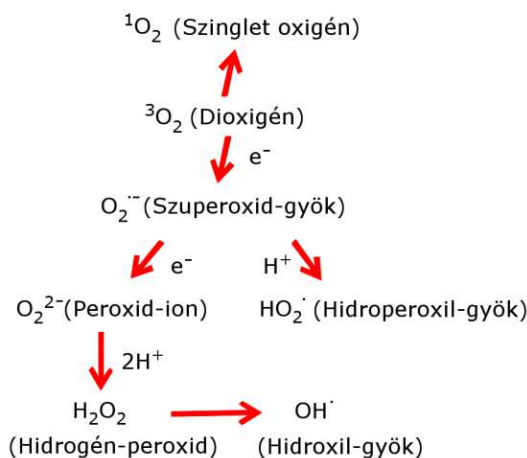
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Antioxidánsok és szabad gyökök

Antioxidánsoknak olyan molekulákat tekintünk, amelyek az oxidálandó szubsztráthoz képest kis mennyiségben vannak jelen, és jelentősen lassítják vagy gátolják a szubsztrát oxidációját (Apak et al., 2007). Legfontosabb funkciójuk a növényi szövetekben előforduló, vagy bekerülő szabad gyökök hatástalanítása, megkötése. Ez a folyamat azonban részben ellentmondásos, hiszen a szabad gyökök az élet fenntartásához elengedhetetlen oxigéntermelési folyamat, majd az oxigén redukciója során képződő adenosin-trifoszfát (ATP) termelés melléktermékeként képződnek.

A szabad gyökök kettős szerepet töltenek be, és e két ellentétes szerep között törekény egyensúly áll fenn. Egyrészt mérsékelt mennyiségben hasznosak, hiszen a sejtek válaszreakcióiban és az immunrendszer működésében fontos szerepet töltenek be (Pham-Huy et al., 2008), de nagyobb koncentrációban szöveti károsodást okozhatnak az oxidatív stressz folyamán. A szabad gyökök olyan molekulaként vagy molekularészletként definiálhatóak, amelyek legkülső atom- vagy molekulapályáján egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ennek köszönhetően kialakulásuk után nagy reakcióképességűek, és láncreakciót indíthatnak el. A szabad gyökök forrása endogén vagy exogén lehet. Endogén eredetű szabad gyökök az autooxidáció során vagy kis molekulák inaktiválása során képződnek a sejten belül, de az immunsejtek aktiválódása révén, gyulladásos folyamatokban, megerőltető fizikai tevékenység során és az öregedéssel együtt is nő e káros részecskék száma a szervezetben (Rao et al., 2011). Exogén források a cigarettafüst, szennyezőanyagok, szerves oldószerek, narkotikumok és peszticidek lehetnek. Ezen kívül a különböző gyógyszerek is szabad gyökös közttermékké alakulhatnak, amelyek szintén oxidatív károsodást okoznak a szövetben (Rao et al., 2011).

A szabad gyökök képződése három elemmel hozható kapcsolatba: oxigénnel, nitrogénnel és kénnel (**1. ábra**).



1. ábra Reaktív oxigénformák és keletkezésük (Kaushik és Roychoudhury, 2014).

A NO-ot az L-arginintől függő nitrogén-oxid-szintáz (NOS) hozza létre. A NO képes reagálni a xantin-oxidáz (XOD) tevékenysége révén létrejövő szuperoxid-gyökökkel, hogy peroxinitritet hozzon létre. A NO nagymértékű oxidáló hatással rendelkező komponens, amely képes katalizálni a xantin-dehidrogenáz (XDH) átalakulását xantin-oxidázzá, de még a fehérjék nitrálásában is közreműködik. A NO továbbá reakcióba léphet a redukált glutationnal (GSH) is, hogy S-nitroso-glutationt (GSNO) hozzon létre, ami a következő lépésben a nitroso-glutation-reduktáz (GSNOR) révén elbomlik oxidált glutationná (GSSG) és ammóniává (NH₃). Az oxidált glutationt a glutation-reduktáz, az aszkorbát-glutation kör tagja redukálja.

A H₂O₂, ami a flavin-oxidázok működése által jön létre, főleg a kataláz vagy aszkorbát-peroxidáz (APX) tevékenysége során bomlik le. A szulfit-oxidáz (SO) a szulfit-ionok szulfát-ionokká való átalakulását katalizálja, és e folyamat melléktermékeként képződik a H₂O₂.

A tanulmányok azt mutatják, hogy a szulfit-ionok alacsony koncentrációja gátolja a kataláz aktivitását, ami azt jelenti, hogy ez a komponens enzimeket is képes szabályozni. Ennek értelmében, az RO-, RN- és RS-komponensek közötti kölcsönhatások a növényi peroxiszómákban nagyon lényegesek, hiszen jelátviteli molekulákként fontos szerepet töltenek be a fiziológiai és fito-patológiai folyamatokban (Corpas és Barroso, 2015).

Számos kutatás bizonyította, hogy a különböző fématomok, mint a vas, króm, réz, ólom, higany, nikkel és vanádium képes RO-komponenseket létrehozni. A fémionok RO-komponensek létrehozásához való hozzájárulása a Fenton-típusú reakciók során megy végbe, ahol az endogén fémionok (Fe²⁺ vagy Cu⁺) hidrogén-peroxiddal reagálva hidroxil-gyököt hoznak létre (Castañeda-Arriaga et al., 2016):



A szabad gyökök oxigén jelenlétében a lipidek degradációját (peroxidációt) okozhatják a plazmában és az organellár membránokban. Az oxidatív degradáció akkor kezdődik el, amikor a telítetlen zsírsavakban lévő kettős kötések megtámadja az oxigén-gyök, ami főleg a OH[·]-ből származik. A lipidek és szabad gyökök kölcsönhatásában peroxidok keletkeznek, amelyek széleskörű membrán-, organellár- és sejtkárosodáshoz vezethetnek, így a foszfát-csoportokat tartalmazó lipidek (pl. foszfolipidek) is, amelyek a sejtet körülvevő és sejtet felépítő membránok nélkülözhetetlen alkotóelemei, károsodást szenvedhetnek.

Az RO-komponensek nagymértékű termelődése gyakran vezet makromolekulák (DNS, fehérjék) károsodásához is, azonban számos komponens képes a szabad gyökök ellen fellépni. Az antioxidánsok a hidroperoxidokat redukálhatják, a fém ionokat eltávolíthatják, a szabad gyököket befoghatják, a láncreakciót megállíthatják, és még a sejt sérülését is megjavíthatják. Néhány antioxidáns más antioxidánsok bioszintézisét is indukálhatja (Rao et al., 2011).

2.2. Az antioxidáns vegyületek csoportosítása

Mivel a polifenolok, vitaminok, esszenciális zsírsavak, és enzimek is rendelkeznek antioxidáns hatással, ezért az antioxidáns vegyületek csoportosítását többféleképpen találhatjuk meg a szakirodalomban (**1. táblázat**):

- elsőrendű (láncmegszakító) és másodrendű (preventív) antioxidánsok (Nemes, 2009),
- enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok (Carocho és Ferreira, 2013),
- oldhatóságuk alapján: hidofil és lipofil antioxidánsok (Thaipong et al., 2005),
- elhelyezkedésük alapján: membránokban elhelyezkedő, állandó körforgásban lévő, citoszolban megtalálható és szerkezeti antioxidánsokat különböztethetünk meg (Cornelli, 2009).

Az antioxidánsok közé tartoznak a metabolikus antioxidánsok (pl. glutation, L-arginin), és az exogén tápanyag-antioxidánsok (pl. E-vitamin, C-vitamin, karotinoidok, nyomelemek, flavonoidok, omega-zsírsavak) is (Rao et al., 2011).

ANTIOXIDÁNSOK			
Enzimatis		Nem enzimatis	
Elsődleges	Másodlagos	Lipofil	Hidofil
glutation-peroxidáz	glutation-reduktáz	karotinoidok	fenolos
szuperoxid-dizmutáz	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz	omega-zsírsavak	komponensek
kataláz		E-, A-vitamin	C-vitamin

1. táblázat Az antioxidánsok csoportosítása.

Az **enzimatis antioxidánsok** (**2. táblázat**) két alcsoportra oszthatók: *elsődleges* (pl. glutation-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, kataláz) és *másodlagos* enzim védelmi rendszerre. A glutation-peroxidáz két elektron donálásával a peroxidokat redukálja, a kataláz a hidrogén-peroxidot vízzé és molekuláris oxigénné alakítja. A szuperoxid-dizmutáz a szuperoxid-anionokat alakítja hidrogén-peroxiddá, így szolgáltatva szubsztrátot a kataláz enzim számára.

Enzimatis antioxidánsok	Katalizált reakció
Szuperoxid-dizmutáz (SOD)	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow 2 H_2O_2 + O_2$
Kataláz (CAT)	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$
Aszkorbát-peroxidáz (APX)	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2 H_2O + DHA$
Monodehidro-aszkorbát-reduktáz (MDHAR)	$2 MDHA + NADH \rightarrow 2 AA + NAD$
Dehidroaszkorbát-reduktáz (DHAR)	$DHA + 2 GSH \rightarrow AA + \text{oxidált glutation}$
Glutation-reduktáz (GR)	$\text{oxidált glutation} + NADPH \rightarrow 2 GSH + NADP^+$

2. táblázat Enzimatis antioxidánsok. Rövidítések: **DHA**: dehidro-aszkorbát, **MDHA**: monodehidro-aszkorbát, **NADH**: nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált alakja, **AA**: aszkorbinsav, **NAD**: nikotinamid-adenin-dinukleotid, **GSH**: redukált glutation, **NADPH**: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált alakja, **NADP⁺**: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (Kaushik és Roychoudhury, 2014).

A *másodlagos* enzim védelmi rendszer a glutation-reduktáz és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzimet foglalja magába. A glutation-reduktáz a glutationt redukálja az oxidált formájából a redukált alakjába, így ezzel további szabad gyökök semlegesítése

indul meg. A glükóz-6-foszfát a NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) koenzimet regenerálja, így redukált környezetet hoz létre. Ez a két enzim nem közvetlenül semlegesíti a szabad gyököket, de fontos szerepük van más endogén antioxidáns hatásában. Számos **nem enzimátikus** működésű antioxidáns ismert, mint például a vitaminok, enzim kofaktorok, nitrogéntartalmú vegyületek és peptidek (Carocho és Ferreira, 2013). A zöldségekben és gyümölcsökben megtalálható nem enzimátikus antioxidánsok (**3. táblázat**) három fő vegyületcsoporttal hozhatók kapcsolatba: a vitaminokkal, fenolos vegyületekkel és karotinoidokkal. A karotinoidok lipofil, míg az aszkorbinsav és a fenolos komponensek hidrofíl antioxidánsokként ismertek (Thaipong et al., 2006).

Nem enzimátikus antioxidánsok	Funkció
Aszkorbinsav (AA)	A hidrogén-peroxid toxikus hatását csökkenti az aszkorbát-peroxidáz segítségével
Redukált glutation (GSH)	Detoxifikáló kosubsztrátként van jelen enzimek (pl. GR és GST) számára
α -tokoferol	A lipid-peroxidáció termékei ellen nyújt védelmet
Karotinoidok	Kioltja a fotorendszerekből felszabaduló többletenergiát
Flavonoidok	Közvetlenül hatástalanítja a H_2O_2 -t, 1O_2 -t és $OH^\cdot$ -t
Prolin	Megköti a 1O_2 -t és $OH^\cdot$ -t, és megelőzi a lipid-peroxidációból származó sérüléseket

3. táblázat Nem enzimátikus antioxidánsok (Kaushik és Roychoudhury, 2014).

2.3. A polifenolos antioxidánsok

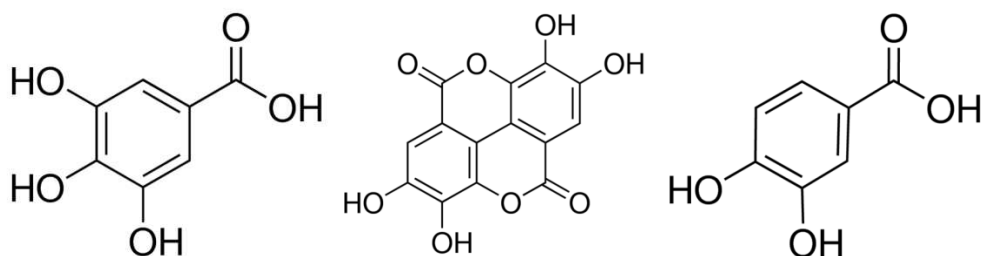
A polifenolos komponensek növényekben találhatók meg, ahol a kémiai védekezési rendszerben vesznek részt baktériumok, gombák és növényevő állatokkal szemben (Mämmelä, 2002). Ezen kívül segítik a védekezést a kórokozók, a környezeti stressz, az ultraibolya sugárzás, a környezetszennyezés ellen is (Ruiz és Romero, 2001).

A polifenol megnevezés arra utal, hogy szerkezetük alapja egy fenolváz, amihez különböző szerves savak, szénhidrátok és egyéb csoportok kapcsolódnak. Mivel számos kötődési sorrend, hely és kapcsolódó molekula szóba jöhet, így a kis molekulatömegű egyszerű fenolos savaktól kezdődően egészen a 30.000 Da-os molekulatömegű vegyületekig találunk polifenolokat (Bravo, 1998). A polifenolok antioxidáns hatásossága így érthetően nagyban függ a szerkezetüktől. A fenolcsoport önmagában antioxidánsként nem aktív, de az orto-, para-difenolok már antioxidáns képességgel rendelkeznek, és ez a képesség az etil-n-butyl-csoportok általi hidrogén-atom szubsztitúcióval folyamatosan nő. A polifenolok magukban foglalják az egyszerű fenolokat, tanninokat, antocianidineket és más flavonoidokat. (Mämmelä, 2002).

2.3.1. A polifenolok csoportosítása

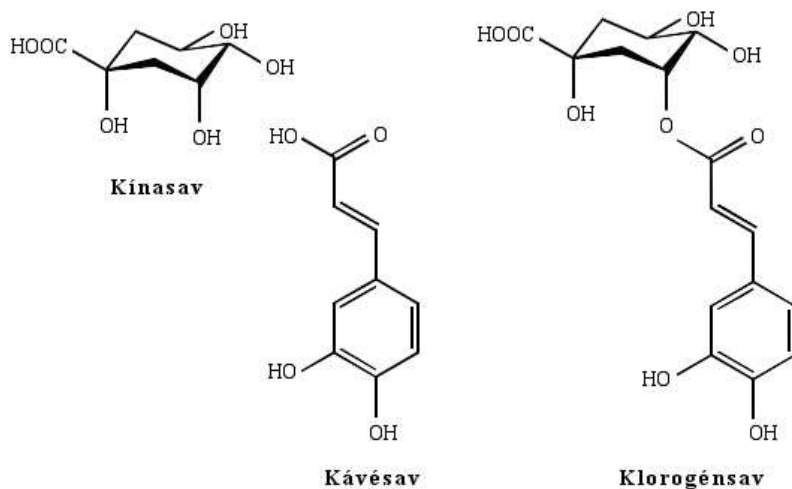
Mivel a polifenolok közé több, mint 8000 vegyületet sorolnak, nem csak egyféle csoportosítási mód létezik, Pietta et al. (2003) az alábbi felosztást alkalmazták:

1. Hidroxi-benzoészav származékok: Olyan fenolos komponensek, amelyek általános szerkezete C_6-C_1 . Habár a hidroxi-benzoészav származékok néhány gyümölcsben szabad savak (pl. gallusészav a datolyaszilvában) formájában is előfordulnak, vagy a zöldség- és gyümölcsefeldolgozás során felszabadulnak, főleg konjugált formában vannak jelen (Pietta et al. (2003)). A gallusészavat és ellagészavat (**3. ábra**) a *Castanea sativa* levelében is sikerült detektálni (Díaz Reinoso et al., 2012), továbbá vizsgálataim alapján a közönséges gyertyán levelében is megtalálhatók ezek a vegyületek. A hidroxi-benzoészav származékok közül az előbb említett vegyületek mellett a 4-hidroxi-benzoészav, a vanillinsav, a sziringsav, a protokatechuszav és a szalicilsav a legfontosabbak. Ezek a savak a glükóz észtereiként is léteznek. A protokatechuszav-*O*-pentozidot szintén sikerült azonosítanom a gyertyán levélkivonatában. Ez megfelel Csapó és Csapóné Kiss (2003) munkájában leírtaknak, miszerint a protokatechuszav (3,4-dihidroxi-benzoészav) (**3. ábra**) szabad vagy észteresített formában, a levelekben, a virágokban és a növények fás részeiben is megtalálható.



3. ábra A gallusészav, az ellagészav és a protokatechuszav szerkezete (URL 1., URL 2., URL 3.)

2. Hidroxi-fahészav származékok: A hidroxi-fahészav származékok transz-fenil-3-propénsavak. A legáltalánosabb hidroxi-fahészav származékok a kávéészav, a ferulasav, a szinapinsav és a *p*-kumársav. Ezek a vegyületek is főleg konjugátumokként fordulnak elő, a kinasav észtereiként, mint ahogy a gyertyán levél extraktumából sikerült is őket meghatározni kinasav-*O*-kávéészav- és kinasav-*p*-kumársav észtereként. A kinasav-*O*-kávéészav észtert nevezik klorogénészavnak (**4. ábra**).

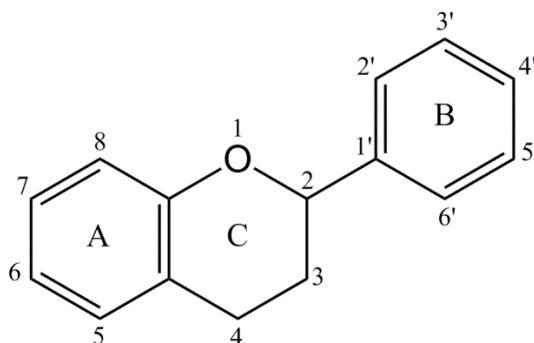


4. ábra A kinasav, kávéészav és klorogénészav szerkezete (dos Santos et al., 2006).

Ezekre a vegyületekre az észterképződés mellett jellemző a glikoziláció is, ezt bizonyítja az is, hogy kávéssav-*O*-hexozidot és kumársav-*O*-galloil-glükózt is sikerült azonosítanom a gyertyán leveléből.

Egy másik csoportosítási mód alapján a hidroxibenzoésavakat és hidroxifahéjsavakat összefoglaló néven fenolos savakként is definiálják (Pandey és Rizvi, 2009), ennek megfelelően a gyertyán leveléből azonosított komponensek esetében én is az összevont csoportosítási módot alkalmaztam a vegyületek besorolása során.

3. 4-oxo-flavonoidok: Tizenöt szénatomos vázuk $C_6-C_3-C_6$ egységet alkot, ezért difenil-propán származékoknak tekinthetők (**5. ábra**), két aromás gyűrűvel (A és B gyűrű), és egy oxigéntartalmú heterociklussal (C gyűrű) rendelkeznek. A növényi flavonoidok aglikonok formájában is megjelenhetnek, de a legelterjedtebb formájuk az *O*-glikozid. A flavonok *C*-glikozidos formában is előfordulhatnak.



5. ábra A flavonoidok általános szerkezete és a szénatomok számozása (Lillo et al., 2008).

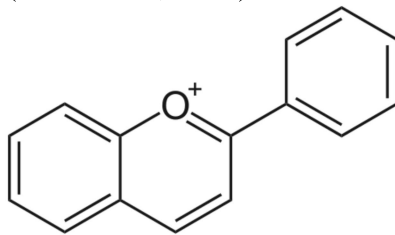
Az aglikon és cukoregységet összekötő kötés általában 7'- (flavon, flavanon), 3'- (flavonol), vagy 4'- helyzetű. A cukoregység lehet mono-, di-, tri-, vagy tetraszacharid, a D-glükóz, az L-ramnóz, a glükoramnóz, a galaktóz és az arabinóz a leggyakoribb cukorrész. Az aglikon szerkezettől függően több alcsoportra oszthatók a 4-oxo-flavonoidok: flavonolok, flavonok, flavanonok, izoflavonok, kalkonok és dihidrokalkonok.

4. Flavan-3-olok: A flavan-3-oloknak a 4-oxo-flavonoidokhoz hasonló C-gyűrűje van, de a kettes és hármas helyzetű szénatomok közötti kettős kötés, valamint a négyes helyzetű oxocsoport hiányzik. A flavan-3-olok közül a természetben leggyakrabban a (+)-katechin és (-)-epikatechin fordul elő (Pietta et al., 2003). A katechinek (ld. **I. Melléklet**, (+)-katechin, (-)-epikatechin, (-)-epigallokatechin, (-)-epigallokatechin-gallát, (-)-epikatechin-gallát) gyakoriak a teák leveleiben (Khokhar et al., 1997), de kimutatták a magyaltölgy (Karioti et al., 2009), a kocsányos tölgy (Scalbert et al., 1988) és a közönséges bükk levelében is (Feucht és Treutter, 1994).

5. Antocianidinek, antocianinok, tanninok

5.1. Antocianidinek, antocianinok: Alapegységük a flavilium-ion (**6. ábra**). Az antocianidinek legnagyobb része 3,5,7-trihidroxi-flavilium-klorid származék,

friss növényi részekben ritkán találhatók meg instabilitásuk miatt. Ugyanakkor az antocianinok, azaz a glikolizált antocianidinek, 27 élelmisznövény családban (főleg piros gyümölcsökben és zöldségekben) megtalálható vízzoldható pigmentek csoportját alkotják (Pietta et al., 2003).



6. ábra A flavilium-ion szerkezet (URL 4.).

5.2. *Tanninok*: Köztes vegyületek a nagy molekulatömegű fenolos komponensek felé, fő jellemzőjük, hogy fehérjékkel oldhatatlan komplexeket alkotnak. A tanninokat olyan polifenolos anyagcsere termékeként tartják számon, amelyeknek a molekulatömege nagyobb, mint 500 Da, és képesek kicsapni az oldatban lévő zselatint és egyéb fehérjét, valamint tipikus fenolokra jellemző reakciókat mutatnak, vagyis kék színnel lépnek reakcióba a vas(III)-kloriddal. A tanninok két főcsoportra oszthatók, kondenzált és hidrolizálható tanninokra. A kondenzált tanninok galluszsavval észtereket képeznek (gallo-, és ellagitanninok), míg a hidrolizálható képviselőik polihidroxi-flavan-3-olok, más néven procianidinek (Pietta et al., 2003).

2.3.2. A polifenolos vegyületek bioszintézise és sejten belüli elhelyezkedése

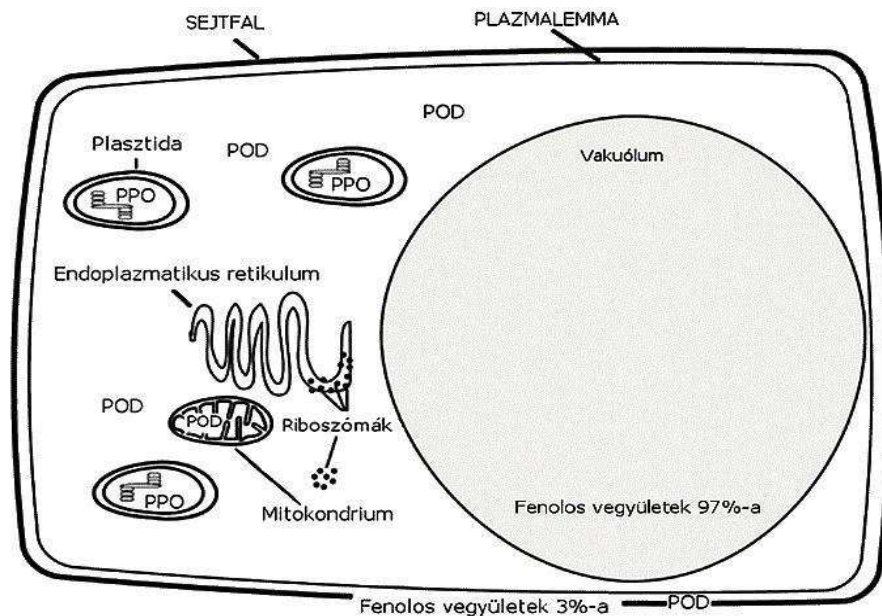
A polifenolos vegyületek bioszintézisével számos kutatás foglalkozik (Hemingway és Laks, 1992; Winkel-Shirley, 2002; Boudet, 2007; Tsao, 2010; Tejeda et al., 2014; Marín et al., 2015; Dilshad et al., 2016).

A bonyolult, egymásból következő folyamatok első lépése, a fenolos vegyületek szintézise, az endoplazmatikus retikulumban történik. A fehérjék szintén itt találhatóak meg, és itt is szintetizálódnak, vagy lazán kötődnek az endoplazmatikus retikulumhoz. Minden fenolos vegyület a sikimisav-bioszintézis út (**II. Melléklet**) termékének tekinthető. A komplex polifenolok, mint pl. a flavonoidok bioszintézise az elsődleges anyagcseretermékekhez kapcsolódik a plasztidákban és mitokondriumokból származó köztitermékek révén. A *B* jelű aromás gyűrű (**5. ábra**) és a *C* jelű kromán gyűrű a fenilalanin nevű aminosavból származik, ami a sikimisav út egyik terméke. Az *A* jelű gyűrű a malonil-koenzim A három egységéből tevődik össze. Ez a három malonil-koenzim A egység egymást követő dekarboxilezési kondenzációs reakciókon keresztül kapcsolódik össze, aminek következtében elindul a flavonoidok bioszintézise.

A fenilalanin-ammónia-liáz enzim (PAL) kulcsfontosságú a fenilpropanoid bioszintézis úton (**III. Melléklet**), ugyanis a fenilalanin aminosav cinnamát egységgé való átalakulását katalizálja, amiből aztán a C₆-C₃ szerkezet kialakul. Az utolsó intermedier, a 4-kumaroil-koenzim A és három molekula malonil-koenzim A kondenzációs reakcióban

kapcsolódik össze, és így kialakul az első flavonoid-jellegű szerkezet, a naringeninkalkon. Ezt a folyamatot a kalkon-szintáz (CHS) nevű enzim katalizálja. A kalkon vegyület izomerizációs folyamat révén flavanonná alakul a kalkon-flavanon-izomeráz (CHI) enzim működése révén. Ez a flavanon köztitermék kulcsfontosságú, mivel a többi flavonoid ebből származtatható. A flavonoidok glikozilációja a glikozil-transzferáz enzim működésének köszönhető (Tsao, 2010).

A polifenolos vegyületek sejten belüli elhelyezkedése a **7. ábrán** látható.



7. ábra A polifenolok sejten belüli elhelyezkedése. Rövidítések: **POD**: peroxidáz enzim, **PPO**: polifenol-oxidáz enzim (Toivonen és Brummell, 2008).

Ezek a molekulák létrejöttük után glikolizálódnak, majd a vezikulumok segítségével kilépnek az endoplazmatikus retikulumból, és a vakuólumokba vagy az apoplaztba, sejtrendszerbe jutnak. A fenolos vegyületek egy része megtalálható a kromoplasztokban, a citoplazmában, a mitokondriumban is, de ezek általában parányi mennyiséget jelentenek, és specifikus metabolikus funkciók miatt vannak jelen ezekben a sejtrészekben (Toivonen és Brummell, 2008)

2.4. A növényi polifenolok mennyiségét befolyásoló tényezők

Általánosságban elmondható, hogy a növényekben megtalálható polifenolos vegyületek előfordulását két fő tényező befolyásolja: a genetika és a környezet. Mivel ezek a vegyületek másodlagos anyagcsere termékek, jelenlétük és mennyiségük a növények különböző fajtaiban nagymértékben eltér. A genetikai tényezők feltárásában az elmúlt időszakban jelentős fejlődés volt tapasztalható (Watson, 2014). Mivel nem ez a tényező a legfontosabb a kutatási témám szempontjából, csak annyit jegyzek meg, hogy a polifenolok mennyiségét és típusát számos enzim szabályozza, és ezek a növény genotípusától függően különbözőek lehetnek.

A növények veleszületett immunitással rendelkeznek, hogy ennek segítségével meg tudják védeni magukat, és ez a védelmi rendszer több elemből tevődik össze. A növények

hatalmas mennyiségű antimikrobiális másodlagos anyagcseretermékkel képesek felhalmozni. Ezeknek a védekezésre szolgáló anyagoknak egy része már előre készenlétben van (fitoanticipinek), míg a többi csak akkor aktiválódik (fitoalexinek), amikor a növényi szervezet már felismerte a betegséget kiváltó kórokozót. A fitoalexinek számos típusa ismert, lehetnek terpének, kén- vagy nitrogén-tartalmú metabolitok és polifenolok is (Watson, 2014).

A növények védekezését az is nagymértékben befolyásolja, hogy helyhez kötött életmódot folytatnak, ami miatt sokféle és eltérő mértékű környezeti stressznek vannak kitéve, amelyek így megváltoztatják az anyagcsere folyamataikat fejlődésük során. A fitokémiai kutatások azt mutatják, hogy a stresszhelyzet az RO-komponensek túlermelődéséhez vezet (Kaushik és Roychoudhury, 2014). Ahhoz, hogy az oxigén-tartalmú szabad gyökök felhalmozódása következtében felboruló egyensúly újra visszaálljon, antioxidánsokra (pl. polifenolokra) van szükség. Minden növény szintetizál polifenolokat egy bizonyos mennyiségben, és ezen vegyületek mennyisége biotikus és abiotikus (pl. UV-sugárzás, magas fényintenzitás, hőmérséklet, sótartalom, víztartalom, sebek, alacsony ásványi anyag koncentráció, kórokozók támadása) stresszhatás következtében bizonyítottan megnövekszik.

A fekete nyárt (*Populus nigra* L.) a kutatók szárazság-stressznek tették ki, és azt tapasztalták, hogy a teljes fenolos glikozidok mennyisége 89%-kal magasabb volt a szárazságnak kitett növényeknél, mint a megfelelő vízellátottságú fák esetében (Watson, 2014). Glynn et al. (2003) szintén fekete nyárral kapcsolatos kutatást végeztek. A tápanyag mennyiségét változtatva azt tapasztalták, hogy a többlet tápanyag következtében drámaian megugrott a relatív növekedési ráta, a teljes biomassa, a teljes levélfelület, míg a levelek fenolos koncentrációja csökkent.

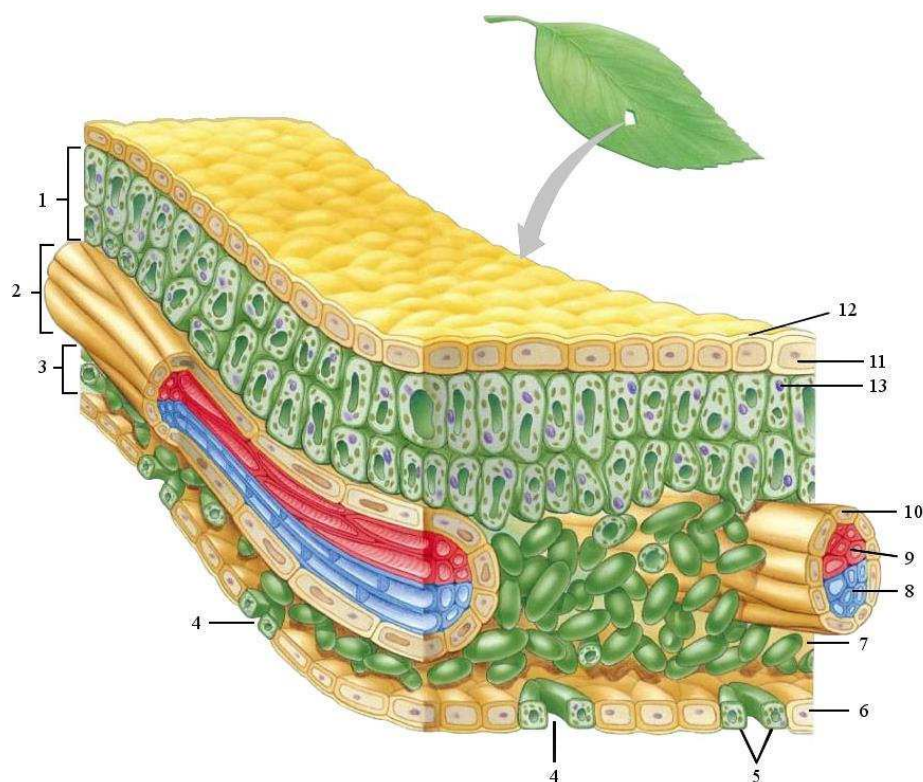
A szitka luc fiatal egyedeit Wainhouse et al. (1998) többféle környezeti tényezőnek is kitéve azt vizsgálta, hogy hogyan reagálnak a növények a gyenge és erős fényre, valamint az alacsony és magas nitrogén-koncentrációra. Ezeket a hatásokat az egyedek növekedése, a tűlevelek és a gyantacsatornák mérete, a víztartalom, a gyanta és polifenolok mennyisége alapján, valamint a tűlevelekben, a törzsben és a gyökerekben lévő cukor- és nitrogén-tartalom alapján határozták meg. Eredményül azt kapták, hogy a gyanta, a polifenolok és a szénhidrátok mennyisége nagyobb volt nitrogénszegény egyedek esetében. A változások mértéke hasonló volt minden növényi részben, beleértve a gyökereket is.

Ezekből a példákból jól látható, hogy a környezeti tényezők jelentősen befolyásolják a növények anyagcsere termékeit, köztük az antioxidánsok, a polifenolok sejten belüli megjelenését is. Ezeken a hatásokon kívül a polifenolok mennyiségére a földrajzi elhelyezkedés és a növény vegetációs stádiuma is jelentős hatással van, ezért fontos lenne tanulmányozni a növényi szövetek antioxidáns paramétereinek szezonális változását is (Watson, 2014).

2.5. Erdei fák levél- és kéregszöveteinek jellemzése

A levél- és kéregszövetek szerkezeti felépítésének megismerése nélkülözhetetlen az antioxidáns tulajdonságaik megértéséhez és felhasználhatóságuk megállapításához.

Vizsgálataim során a fajok között voltak lombhullatók és tűlevelűek is, ezen fák esetében a levelek jellemző szerkezete a **8. és 9. ábrán** láthatók. A lombhullató fák leveli dorziventrális lomblevelek, vagyis csak a levéllemez egyik oldalát éri a megvilágítás, ennek következtében a színi és fonáki epidermisz (bőrszövet) nem azonos, a levél színén egy kutikula réteg is kialakul, és sztómákat nem tartalmaz, míg a fonáki bőrszövet vékonyabb, kevésbé kutinosodott és ebben a rétegben helyezkednek el a gázcserenyílások (Papp, (2003); URL 5.).

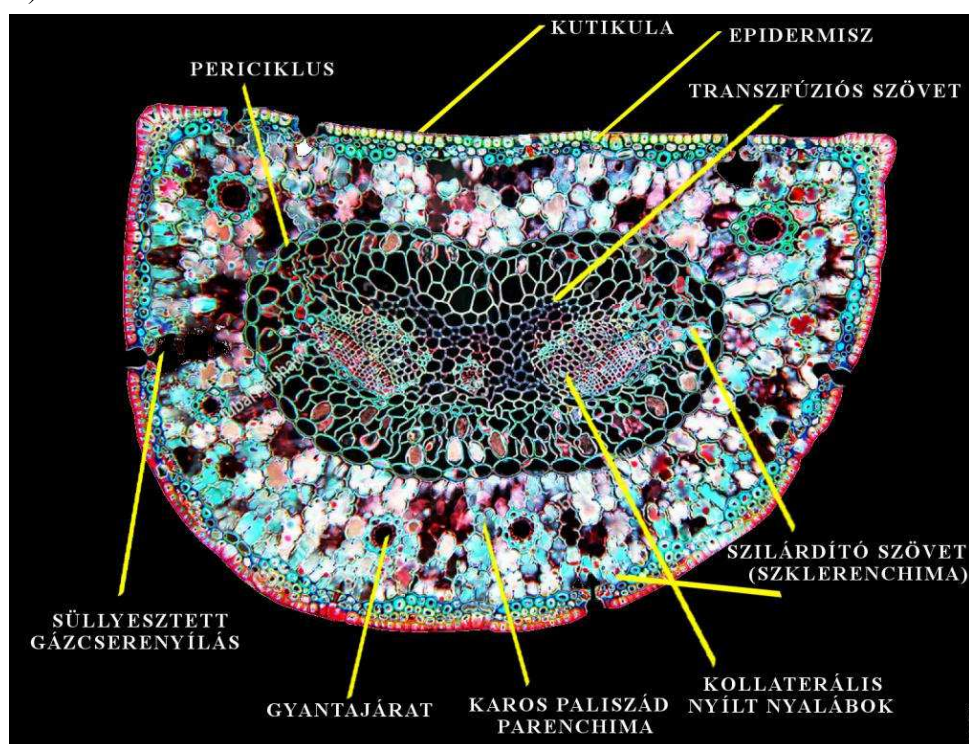


8. ábra A lomblevél szerkezete. **Jelölések:** 1: oszlopos táplálékkészítő alapszövet, 2: levélér, 3: szivacsos táplálékkészítő alapszövet, 4: sztóma (gázcserenyílás), 5: sztóma zárósejtek, 6: alsó bőrszövet, 7: légrész, 8: háncsrész, 9: farész, 10: nyalábhüvely, 11: felső bőrszövet, 12: kutikula, 13: kloroplasztisz (URL 6.).

A levelek morfológiáját alapvetően a fényellátottság is befolyásolja. Kis fényintenzitású helyeken nagyobb méretű és vékonyabb levelek alakulnak ki, ezek az *árnyéklevelek*, melyek sejtjei lazábban állnak és kevesebb kloroplasztisz található bennük. Ezzel ellentétben a nagy fényintenzitású helyeken kisebb, vastagabb levelek, a *fénylevelek* alakulnak ki, amelyek sejtjei tömöttebbek és sok kloroplasztiszt tartalmaznak (Gracza (2004); URL 7.).

A fenyők a lombos fákkal ellentétben a nyitvatermők törzsébe tartoznak, ennek megfelelően eltérő tűlevelű szerkezete a lomblevelekétől. A tűlevelek xeromorf sajátosságokat mutatnak, azaz szerkezetük a szárazsághoz való alkalmazkodás miatt, a

víz-tartalom megőrzése érdekében módosult. Ennek megfelelően az epidermiszt kívülről vastag kutikula borítja és a gázcsere nyílások viasszal borított csatornába süllyedve helyezkednek el. A bőrszövet alatt szilárdító szövet található. A mezofillum karos paliszád parenchima sejtekből áll, és ebben a szövetrészben találhatók meg a gyantajáratok is, amelyek falát (gyanta) kiválasztó funkcióval rendelkező epitel sejtek alkotják. A gyantajárat körül egyrétegű szklerenchima alakul ki. A tűlevél belsejében egy központi hengerre emlékeztető szerkezeti elem figyelhető meg, amit egy keményítő tartalmú sejtsor, a periciklus vesz körül. A pericikluson belül található a tűlevél transzfúziós szöve, ebbe ágyazódva helyezkedik el két darab kollaterális nyílt szállítóyaláb. A transzfúziós szövet raktározó-, csersavtartó- és transzfersejtekből épül fel. A szállítóyalábok környezetében szintén előfordulhat szklerenchima is (Kristóf et al., 2013).



9. ábra A tűlevél keresztmetszete százszoros nagyításban (URL 8.)

A levelek táplálékkészítő alapszövetében történik a szerves anyagok előállítása, amelyek aztán a fa egészét behálózó szállítószövet rendszeren keresztül jutnak a fatörzsbe és a gyökérhez. A fatörzset a fakéreg veszi körül, ami lényegében a fatestet körülvevő, azt védő szövetek összessége. Két fő alkotórésze van: a háncs és a héjkéreg. Élettani szempontból a háncsnak nagyon fontos szerepe van a tápanyagokállításában és azok raktározásában, míg az elparásodott héjkéreg az élő fa mechanikai behatásokkal (pl. vadrágás, tűz) szembeni védelméért felel. A kéreg vastagságát több tényező is befolyásolja: a fa típusa, kora és az ökológiai tényezők. A törzsmagasság növekedésével a fakéreg vastagsága csökken (Molnár, 2004).

A hánca a vaszkuláris kambium működése következtében alakul ki. A kambium anyasejtek osztódásával jönnek létre a leánysejtek, amelyek differenciálódva hozzák létre a különböző hancssejteket. Közös tulajdonságuk, hogy nem lignifikálódnak. A lombosfák hancsa rostacsövekből, hancsrostokból és bélsugarakból tevődik össze (Raven et al., 1999). A fenyőkben rostacsövek helyett rostasejtek vannak, továbbá tartalmaznak hancsparenchimát, hancsrostot és bélsugarat. A rostacsövek és rostasejtek főképpen a nagy molekulájú szerves anyagok szállításában vesznek részt. A hancsparenchimák pedig a lombosfáknál és fenyőknél is a vízben oldódó, kis molekulájú szerves vegyületek (pl. cukrok) szállításáért felelősek. Gyakran raktároznak keményítőt, csersavat, gyantát is. Sajátos hancselemek a hancsparenchimákból kifejlődő kősejtek, amelyek elsősorban a simakérgű fajokra (pl. bükk, nyír, jegenyefenyő) jellemzőek, és nekik köszönhetően ezen fajok hancsa nagy keménységgel és merevséggel rendelkezik. A kősejteken kívül még a hancsrostok is szilárdító funkciót látnak el. A szilárdító elemek szempontjából négy csoportba sorolhatók a fontosabb fafajaink hancsa:

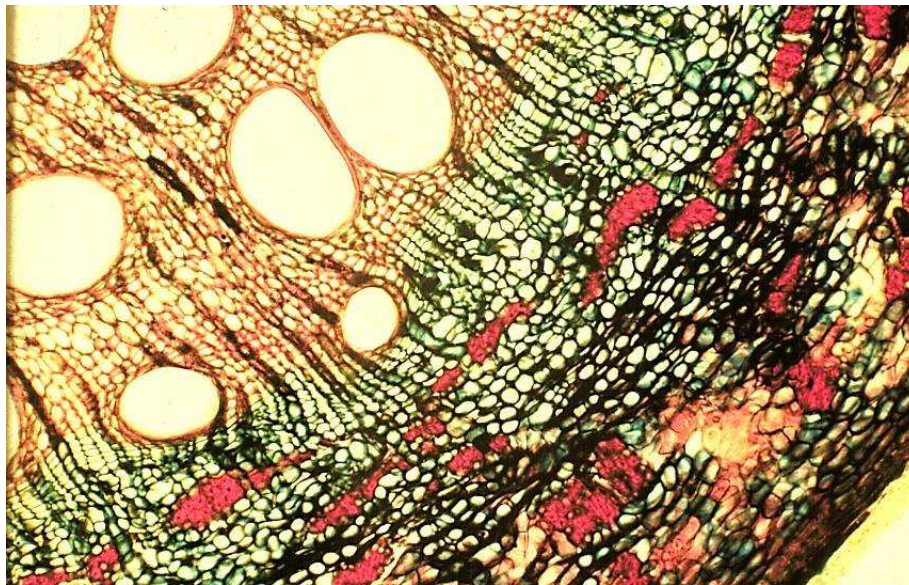
- a) kősejtekkel és hancsrostokkal egyaránt rendelkeznek (akác, tölgy, kőris, gesztenye, fűz)
- b) csak hancsrostokat tartalmaznak (szilek, hársak)
- c) csak kősejtekkel szilárdítanak (bükk, nyír, platán, éger, luc, jegenye- és vörösfenyő)
- d) csak pótlóhancsrostokkal rendelkeznek (*Pinus*-félék)

A kéreg hancsrészére jellemző, hogy a teljes kéreg térfogatának az esetek legnagyobb részében a felét sem teszi ki. Egyes fafajoknál (pl. bükk, dió) azonban elérheti a 4-15 mm közötti vastagságot, míg más fafajok esetében (pl. akác, erdeifenyő) csak 2-4 mm szélességű (Molnár, 2004).

A hánca mellett a héjkéreg is többféle szövetből épül fel. Az elsődleges bőrszövet, az epidermisz a szár vastagodását nem képes követni, ezért felrepedezik. Ezen szövet pótlására jön létre a parakambium (fellogén). A fellogén kifelé hozza létre az elparásodó sejtsorokat, a fellomot, befelé pedig a parenchimatikus sejtekből a fellodermát alakítja ki. A fellogént, fellomot és fellodermát együttesen nevezzük peridermának vagy parabőrnek. A fatörzs vastagodása során a periderma megrepedezik, lemorzsolódik, a fellogén elhal és pótlására a hancsparenchimákból alakul ki egy újabb parakambium. Tehát a külső kéreg vastagodása során a fellogén folyamatosan befelé halad.

A felrepedező periderma-rétegek a közéjük zárt kéreg- és hancsrészekkel együtt alkotják a héjkérget. A különböző fajok esetében eltérő idő alatt alakul ki a héjkéreg. Így az akácnál 6-10 év, az erdei-, feketefenyőnél 8-12 év, nyárnál és cseresznyénél 20-25 év, míg a tölgyeknél 25-40 év, gyertyánál 50 év szükséges a héjkéreg kialakulásához. Egyes héjkéreg típusok rostokban gazdagok (pl. tölgyek (**10. ábra**), akác), mások rostszegények (pl. erdeifenyő, platán, hegyi juhar). Fontos megjegyezni, hogy a kéreg kémiai összetétele jelentős mértékben különbözik a faanyagétól, elsősorban nagyobb mennyiségű

extraktanyagot és szervetlen vegyületet tartalmaz, cellulóz tartalma viszont kevesebb (Molnár, 2004).



10. ábra Tölgy (*Quercus* sp.) másodlagosan vastagodó fásodó, de még fiatal szárának keresztmetszetéből részlet. Kívül látható a másodlagos bőrszövet, a periderma. Ennek a szárnak a jellegzetessége, hogy nemcsak szállítóelemeket tartalmaz, hanem a képen vörösre festett rostkötegeket, parásodott falú sejtekből álló rétegeket és parenchímát is tartalmaz. A tölgy jellegzetessége, hogy kambiuma elsősorban a vegetációs időszak kezdetén nagy átmérőjű tracheákat hoz létre, míg a végén főleg rostokat képez, emiatt a fatest koncentrikus körökben tartalmazza a pórásokat, ezért az ilyen fákat gyűrűs likaesű fáknek nevezzük. (Kristóf et al., 2013).

Látható, hogy mind a lomb- és tűlevelek között, mind a hancs és héjkéreg felépítése között jelentős különbség van. Azonban nemcsak a növényi szervek szerkezete között, hanem különböző fajok azonos szerveinek felépítésében is jellemző eltérések lehetnek. Ezáltal nemcsak a fajták, változatok, fajon belüli ökotípusok elkülönítésére van lehetőség, hanem magyarázatot is találhatunk az eltérő antioxidáns tulajdonságaikra, valamint a feldolgozási technológiát és hasznosítási módokat is fajra szabhatjuk.

2.6. Erdei fák szöveteiben lévő antioxidánsok és hasznosítási lehetőségeik

A zöldségek, gyümölcsök, lágyszárú növények polifenol tartalmát és antioxidáns-kapacitását széleskörűen tanulmányozták (Santos-Gomes et al., 2002; Shui és Leong, 2004; Lin és Tang, 2006; Chan et al., 2011; Liang et al., 2012). Az erdei fák „melléktermékei”, pl. a levél, kéreg, toboz, ággöcs, terméshéj, gyökérzet iparilag nehezen, vagy egyáltalán nem hasznosíthatók (Molnár, 2004; Ogunwusi, 2013; Pásztory et al., 2016), azonban szöveteik nagy koncentrációban tartalmazhatnak polifenolokat (Vázquez et al., 2008; Lesjak et al., 2011; Sathya és Siddhuraju, 2012), amely tény utat nyithat a hasznosításuknak is.

Kutatásaimban az erdei melléktermékeknek számító falevél és fakéreg polifenol tartalmával és antioxidáns tulajdonságaival foglalkoztam.

A népi gyógyászatban már régen felismerték, hogy egyes fák levelei jótékony hatással vannak különböző betegségekre. A szelídgesztenye (*Castanea sativa* Mill.) leveleit a

köhögés, hasmenés és reumatikus betegségek kezelésére használták. Mint ahogy más növényeknél, itt is aktív vegyületekként a polifenolokat jelölték meg. Ezek legnagyobb hányadát a galluszsav- és ellagsav-származékok tették ki (Díaz Reinoso et al., 2012).

A tanninokban gazdag növények különböző típusait a hagyományos orvoslásban gyakran használták. Ilyen növény például az ecetfa (*Rhus typhina* L.) is. Olchowik et al. (2012) bizonyították, hogy ennek a fának a leveleiből készült kivonat megvédi a vörösvérsejteket felépítő membránfehérjéket és lipideket az oxidációtól *in vitro* körülmények között.

Az éger növénynemzetségébe tartozó *Alnus sieboldiana* (Matsum.) leveleiben szintén leírták a hidrolizálható tanninok és flavonoidok jelenlétét, és egyéb éger fajok leveleit is széleskörűen vizsgálták. Az *Alnus hirsuta* (Mill.) leveleiben lévő diarilheptanoidok a nitrogén-oxid túltermelését gátolják, míg az *Alnus japonica* leveleiben található ugyanezen komponensek citotoxikus hatást fejtenek ki a rágsálókban megtalálható B16-típusú melanóma sejtekre, valamint az emberi gyomorban kialakuló SNU-C1 típusú rákos sejtekre. Ezeken kívül az *Alnus firma* (Siebold & Zucc.) leveleiben jelenlévő triterpenoidok és flavonoidok a HIV-vírus replikációját gátolják meg, valamint szabályozzák e veszélyes vírus enzimjeit *in vitro* körülmények között (Ludwiczuk et al., 2011).

A molyhos nyír leveleiben lévő fenolos komponensek a növénykárosítókkal szembeni védelmet szolgálják. Ezek a vegyületek két fő szempont alapján is nagyon fontosak a védekezés szempontjából. Egyrészt, a nyírfák leveleiben nagy mennyiségű, a száraz tömeg 10%-át is meghaladó fenolos vegyület található, másrészt a levélsérülés bekövetkezése után jelentősen megnövekedik a fenolos vegyületek mennyisége, sőt a lombhullást követő évben is jelentős lesz ezen vegyületek koncentrációja (Ossipov et al., 1997).

A közönséges gyertyán (*Carpinus betulus* L.) leveleinek etil-acetátos extraktuma az U373-as jelölésű glioblasztóma sejt növekedését gátolta, így a gyertyán leveleiben lévő egyes vegyületek is rákellenes hatással rendelkezhetnek (Frédérich et al., 2009).

A havasi boróka tobozából és tűleveléből készült extraktumok szintén antioxidáns hatással rendelkeznek, továbbá gyulladásgátló tulajdonságukat is leírták. Ezekért a tulajdonságokért többek között a luteolin-7-*O*-glükózid, az apigenin-7-*O*-glükózid, és a rutin felelősek (Lesjak et al., 2011). A szelídgesztenye terméshéj extraktumok pedig az eukaliptusz kérgénél is erősebb antioxidáns hatásúak (Vázquez et al., 2008).

A kéreg extraktanyaga számos értékes, a gyakorlatban hasznosítható bioaktív komponenst tartalmaz. Példa lehet a Pknogenol nevű kereskedelmi termék, amit a tengerparti fenyő (*Pinus maritima* Aiton) kérgéből vontak ki, és hatékony antioxidánsként tartják számon. A Pknogenol procianidinekből áll, amelyek sokféle biológiai hatással (gyulladásgátló, asztmaellenes, rákellenes, allergia-ellenes, magas vérnyomás elleni, és kardioprotektív hatásúak) megtalálhatók gyümölcsökben, zöldségekben, mogyorófélékben, magokban és a kéregben (Diouf et al., 2009). A kanadai fekete luc (*Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenburg) kérgének forró

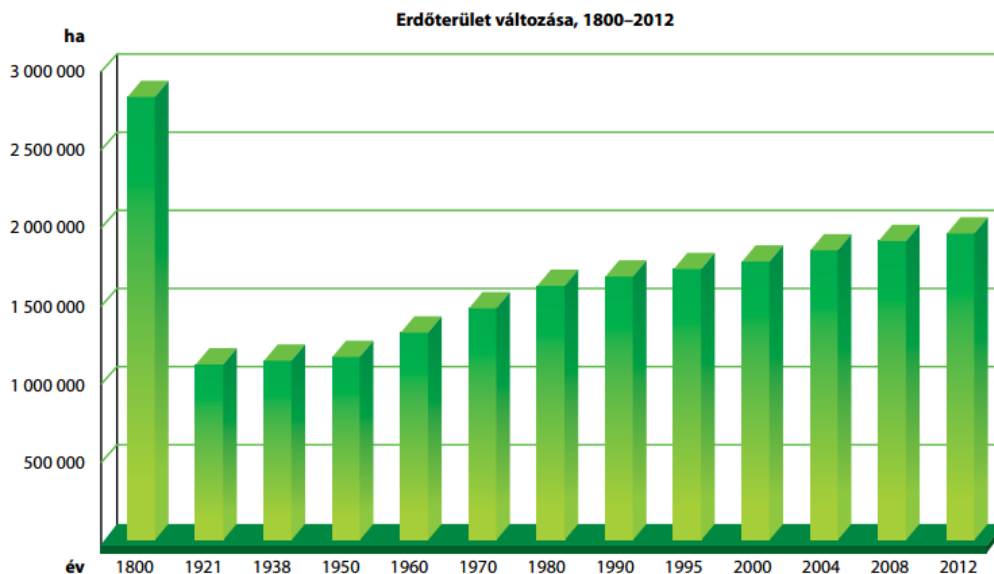
vizes kivonata gyulladásgátló hatású és antioxidáns sajátságokkal rendelkezik. Ezekért a tulajdonságokért a kivonatból azonosított neolignánok, lignánok, transz-rezveratrol, fenolsavak és flavonoidok tehetők felelőssé (García-Pérez et al., 2012). Nemcsak tűlevelű fák kérgéből készíthetők az emberi egészségre pozitív hatást gyakorló szerek, hanem pl. a sárga nyír (*Betula alleghaniensis* Britton) kérgéből is. Az ebből készített kivonat lupán típusú triterpenoidokban (pl. betulin, betulinsav) gazdag, és ezeknek jelentős rák- és HIV-vírus elleni, valamint gyulladáscsökkentő hatását írta le a szakirodalom (St-Pierre et al., 2013).

A közönséges vörösfenyő (*Larix decidua* Mill.), a lucfenyő (*Picea abies* (L.) H. Karst.), az erdeifenyő (*Pinus sylvestris* L.), korai juhar (*Acer platanoides* L.), a hamvas éger (*Alnus incana* (L.) Moench), a molyhos nyír (*Betula pubescens* Ehrh.), a kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), a madárberkenye (*Sorbus aucuparia* L.) és a kecskefűz (*Salix caprea* L.) kéreg extraktumának vizsgálatok megállapították, hogy gombaellenes hatásuk van, a leghatásosabb fungicid a korai juhar extraktuma volt, amely az összes vizsgált gomba növekedését csökkentette. A gombákkal szemben legkevésbé hatékony a molyhos nyír volt (Alfredsen et al., 2008). Eukaliptusz fák kérgének vizsgálatok szintén bizonyították, hogy a kéregből extrahált anyagok között jelentős számú polifenolos komponens van (Santos et al., 2012).

Frédérich et al. (2009) 16, Belgiumban elterjedt fafaj extraktumának rákellenes hatását vizsgálva azt találták, hogy a kocsánytalan tölgy metanolos kéreg extraktuma jelentős *in vitro* növekedést gátló hatást fejtett ki rákos sejtekre. Ezen kívül a közönséges gyertyán metanolos és kocsánytalan tölgy etil-acetátos extraktuma is *in vitro* növekedést gátló tulajdonsággal rendelkezik a rákos sejtekre, és ugyanolyan hatékonyságú lehet, mint a rákelleni gyógyszerek (pl. oxaliplatin és etopozid).

Fontos megjegyezni, hogy ezek a vegyületek nemcsak az emberi egészségre gyakorolhatnak kedvező hatást, hanem az élelmiszeriparban is fontos felhasználásuk van, pl. a szelídgesztenye kérgéből kivont tanninokat gyakran a bor- és szeszes ital-gyártáshoz használják fel (Comandini et al., 2014).

A bemutatott példákból látható, hogy az erdei fák egyik mellékterméke, a kéreg is potenciális forrása lehet a bioaktív anyagoknak. Ennek ellenére a fakitermelés során képződő nagy mennyiségű kéreghulladékot inkább elégetik, hogy az erdészeti ipar energiaigényének legalább egy kis hányadát biztosítsák. Hosszútávon azonban ez nem kifizetődő, mivel a kéregnek nagy a hamutartalma, ami a kazánok élettartamát megrövidíti. A kéregből készített faipari termékek piaca sem elég kiterjedt, így mindenképpen szükséges lenne egy új felhasználási mód ezen értékes hulladék hasznosítására. Nyersanyagból nem lenne hiány, mivel Magyarország erdőszülsége az utóbbi 90 évben fokozatosan nőtt, az erdész-szakemberek által véghezvitt nagyarányú erdőtelepítéseknek köszönhetően. Ennek következtében a mai erőterületek nagysága meghaladja az 1,93 millió hektárt (**11. ábra**), az erdőgazdálkodási rendeltetésű területek nagysága pedig 2,05 millió hektárra tehető.



11. ábra Az erdőterület változása napjainkig Magyarországon (Czirok et al., 2014).

Az erdőtelepítések során a korábbi mezőgazdasági vagy egyéb területekre telepítenek erdőket. A Nemzeti Erdőprogram keretében a jövőben is folytatják az ez irányú munkálatokat, amelynek célja, hogy Magyarország erdősültsége a mostani 20,8%-ról 27%-ra emelkedjen (Czirok et al., 2014).

A magyarországi erdőkben a legnagyobb területet a tölgyek foglalják el (4. táblázat). A tölgyeket követi a bükk, az akác és a gyertyán. Ez nem meglepő, hiszen Magyarország a mérsékelt égövön helyezkedik el, és a fajösszetétel is ezt tükrözi.

Fafaj	Terület (1000 ha)
Tölgy	387,9
Cser	210,6
Bükk	111,3
Akác	455,2
Gyertyán	96,6
Egyéb kemény lombos	114,5
Nyár	196,6
Egyéb lágy lombos	98,6
Erdeifenyő	116,7
Feketeftenyő	61,0
Egyéb fenyő	20,3
Összesen	1869,3

4. táblázat A magyarországi erdők fafajcsoport megoszlása 2015-ben (URL 9.).

Az 5. táblázatban látható, hogy milyen mértékű fakitermelés volt Magyarországon 2015-ben. Ez alapján, ha feltesszük, hogy ennek a 7 354 000 m³ fának a kéreg hulladéka 21% (URL 10.), az évente 1 544 340 m³ kérget jelent. Ez jelentős mennyiségű hulladék, aminek fontos lenne felhasználást találni. A hulladék mennyisége még nagyobb lesz, ha a faleveleket is beleszámítjuk. A levelek mennyiségéről nehéz becslést adni, mivel mennyiségük függ attól is, hogy mikor történik a fakitermelés.

Fafaj	1000 m³
Tölgy	941
Cser	815
Bükk	666
Gyertyán	261
Akác	1488
Egyéb kemény, lombos fajok	276
Nemesnyár	1072
Hazai nyár	257
Fűz	75
Egyéb lágy, lombos fajok	264
Fenyő	1240
Összesen	7354

5. táblázat Fakitermelés fafajcsoportok szerint 2015-ben Magyarországon (URL 11.).

A felsorolt példákban kitűnik, hogy az erdei fák melléktermékeiből kivont antioxidánsok kutatása elméleti és gyakorlati szempontból is fontos terület. Sok fafaj tekintetében a szakirodalom nem rendelkezik megfelelő adatokkal. Sokszor olyan fafajok leveleiről és kérgéről is hiányosak az ismereteink, amelyek hazánkban és Európában is gyakoriak (pl. közönséges bükk). A megfelelő fafajok vizsgálatával nemcsak az eddigi kutatásokat lehet új ismeretekkel kiegészíteni, hanem új utak is megnyílhatnak a faipari hulladékok hasznosítására, ezzel fokozva a fahasznosítás hatékonyságát.

2.7. A növényekben előforduló antioxidáns hatású vegyületek tartósítási módszerei

A növényi szövetekben található polifenolos vegyületek enzimek (elsősorban peroxidáz és polifenol-oxidáz enzimek) hatására levegő jelenlétében gyorsan oxidálódnak, ezáltal mennyiségük jelentősen csökken. Szükséges tehát a vizsgált minta „tartósítása”, a polifenol-tartalom megőrzése a feldolgozott (darált) növényi szövetekben.

Számos példát találhatunk arra, hogy a kutatók különböző fűszer- és gyógynövények teák, gyümölcsök eltarthatóságát, beltartalmi minőségét valamilyen kezeléssel próbálják meghosszabbítani (Irfan et al., 1998; Huang et al., 2007; Chan et al., 2012; Chávez-Reyes et al., 2013). Erre azért van szükség, mert pl. enzimatis hatásokra a gyümölcsök, gyümölcslevek, élelmiszerek, teák megbarnulnak, minőségük romlik, beltartalmi értékük és szavatossági idejük csökken. A minőségromlás mértéke függ a gyümölcs polifenol-tartalmától és a polifenol-oxidáz enzimek mennyiségétől. A tartósítás történhet fizikai (pasztörözés, sterilizálás, appertizálás, különböző hűtési technikák, vízelvonás, szárítás, UV-sugárzás), vagy kémiai módszerekkel (étkezési savak, cukor hozzáadása) is (URL 12.). Az utóbbi esetben az eltarthatóságot gyakran kén-tartalmú vegyületekkel történő kezeléssel növelik meg, de újabban a költségek és adalékanyagok csökkentése céljából mikrohullámú kezeléssel próbálják a szavatossági időt meghosszabbítani (Chávez-Reyes et al., 2013).

Az eltarthatóság növelése érdekében az említett módszerek közül a legegyszerűbben kivitelezhető a szárítási módszer, ugyanakkor a szárítási folyamatok hatására a növényi

szövetekben különböző változások mennek végbe. A szárítás sokféle módon megvalósítható, pl. szabad levegőn, szárítószekrényben, liofilizáló berendezést alkalmazva, mikrohullámú energia segítségével. Doktori munkám során a levél és kéreg minták előkezelésére az utóbbit alkalmaztam. Az irodalmi adatok alapján a mikrohullámú előkezelés ellen és mellett is találunk érveket, attól függően, hogy milyenek az adott növényi szövet tulajdonságai. Prusinowska és Smigielski (2015) irodalmi összefoglaló munkájukban példaként hozzák fel, hogy az összes polifenol-tartalom a mikrohullámmal szárított oregánó és szárított (nem említi, hogy milyen módszerrel) bazsalikom levelében sorrendben lecsökkent 21 és 70%-kal a friss növényhez képest. Egy másik kutatásban ezzel ellentétben a borsmenta esetében az összes polifenol-tartalom 45%-kal nagyobb volt a mikrohullámmal kezelt növény esetében, mint a friss növényből készült extraktumban. A mikrohullámú kezelés pozitív hatását azzal magyarázzák, hogy a sugárzás lerombolja a növényi sejt szerkezetét, így megkönnyíti a polifenolos vegyületek felszabadulását, ezáltal az extrakcióját. Megemlítik azt is, hogy a hagyományos melegítéssel szemben a mikrohullámú azért hatékony, mert ott a hőhatás tovább tart és az enzimatis degradációra is lehetőség van (a mikrohullámú sugárzás pillanatszerűen inaktíválja az enzimeket, és ennyi idő alatt nem degradálódnak a polifenolok) (Arslan et al., 2010). Egy másik cikkben a fodormenta vizsgálata során 5 szárítási módszert (hagyományos melegítés szárítószekrényben, liofilizálás, mikrohullámú és levegőn való szárítást napfény segítségével, illetve anélkül) alkalmaztak a kutatók. Bár a friss növény eredményeit nem ismerjük, a szárítási módszerek közötti rangsor felállítható. A legkisebb polifenol-tartalom a mikrohullámú szárítás után készült extraktumok esetében volt mérhető, és a hidroxifahéjsavak mennyisége, valamint a FRAP-, és DPPH-féle antioxidáns kapacitás esetében is ugyanez volt a tendencia. A szakemberek ezt azzal magyarázták, hogy a hőhatásra a polifenolos vegyületek degradálódnak (Orphanides et al., 2013). Egy további kutatás a *Labiatae* családba tartozó fűszernövények vizsgálatáról szól, ahol háromféle előkezelést alkalmaztak (melegítés szárítószekrényben 50 °C-on 5,5 h-t (OD50) / melegítést szárítószekrényben 80 °C-on 3,5 h-t (OD80) / 15 g növény mikrohullámú kezelése 30 másodpercig (a teljesítményt sajnos nem ismerjük), utána melegítés szárítószekrényben 50 °C-on 5,5 h-t (MOD50)). A legtöbb növény esetében a szárítás következtében a polifenolos vegyületek mennyisége, és az antioxidáns kapacitás csökkent a friss növényhez képest. A legnagyobb csökkenés az OD80 esetében volt, kisebb csökkenés az OD50 esetében, és a legkisebb friss növényhez képesti csökkenés a MOD50 esetében volt tapasztalható. *A kutatók szerint a 15 g friss növény 30 másodperces mikrohullámú előkezelése megfelelő módszernek mutatkozott a polifenol-oxidáz enzim inaktíválására a Labiatae családjába tartozó fűszernövények esetében. Sajnos a kutatók az alkalmazott mikrohullámú teljesítményt nem közölték* (Chan et al., 2012).

Fontos megemlíteni, hogy az előbb felsorolt fűszer- illetve gyógynövények esetén az eredmények értelmezésénél számolnunk kell az illóanyagok meghatározó jelenlétével is,

ami a kezelés hatására felszabadulhat és/vagy teljesen elpárologhat a növényekből, így ezek mennyisége is hozzájárulhat a Folin-Ciocalteu-módszerrel mért összes polifenoltartalom és antioxidáns-kapacitások változásához.

További probléma, hogy a felsorolt cikkek egy részénél nem adják meg a szerzők a mikrohullámú kezelés időtartamát, és/vagy a kezelt növényi minta tömegét, noha egyáltalán nem mindegy, hogy adott tömegű növényi mintát mennyi ideig tesznek ki adott energiájú mikrohullámú sugárzásnak. Ha túl kicsi a mikrohullámú energia intenzitása, akkor az oxidációért felelős enzimek aktívak maradnak, ha túl nagy, akkor a sejtfalszerkezet felbomlik ami a polifenolok felszabadulásához vezet, a további energiaközlés pedig az antioxidáns hatásért felelős vegyületek degradációjához, új vegyületek keletkezéséhez vezethet. Így, ha a paraméterek nincsenek precízen megadva, akkor nem tudjuk nyomon követni, hogy a kezelés hatására a polifenol tartalomban bekövetkező változás pontosan milyen folyamatoknak (visszamaradó enzimek okozta degradáció, polifenolok felszabadulása, polifenolok hőbomlása) vagy azok valamilyen együttesének tulajdonítható. Chávez-Reyes et al. (2013) naspolya gyümölcsön végzett kutatása részletesen feltárja ezeket a folyamatokat. A kutatók meghatározták a kezelt és kezeletlen gyümölcs DPPH és ABTS antioxidáns kapacitását, valamint összes polifenoltartalmát, és a részletes polifenol profil minőségét és mennyiségét. A mikrohullámú kezelést próbálták optimalni azt vizsgálva, hogy különböző tömegű növényi mintákat kezeltek ugyanazzal a teljesítménnyel eltérő ideig. Ebből mikrohullámú energia intenzitást (E [kJ/g]) számoltak és vizsgálták a növekvő mikrohullámú energiamennyiség enzim inaktiváló- és a növényi sejt szerkezetére gyakorolt hatását, valamint HPLC-MS-módszerrel a polifenolos összetétel változását is meghatározták. Az adatok alapján a polifenol-oxidáz enzim aktivitása fordítottan arányos volt a kezelés intenzitásával. A mikroszerkezeti vizsgálatok rámutattak arra, hogy a kezelés egy adott szakasza után morfológiai változások történtek a sejtekben: vékonyabbak lettek a sejtfalak, valamint a vakuólumok sejthártyái. Ezen megváltozott sejtszerkezet következtében a vegyületek könnyebben ki tudnak jutni a vakuólumokból, így a mikrohullámú kezelés szignifikánsan meg tudja növelni a kivonható polifenolos vegyületek mennyiségét a friss szövetekből. A mikrohullámokból származó intenzív hőhatás a növényi szövet belsejében magas gőznyomást és hőmérsékletet okoz, így a sejtfalat felépítő polimerek szétszakadnak. Ennek következtében a sejtfalban kötött polifenolok is felszabadulnak, ezáltal nagyobb lesz a kivonható polifenolok mennyisége. Megállapították, hogy új polifenolos vegyületek a kezelés hatására nem keletkeztek, csak az eredetileg is megtalálható vegyületek mennyisége nőtt a kezelés hatására. *Összességében a cikk bebizonyítja a mikrohullámú kezelés enzim inaktiváló pozitív hatását, leírja a hatékonyságának magyarázatát. Bebizonyítja, hogy új vegyületek nem keletkeztek, ez az előkezelés „csak” lehetővé teszi, hogy még több eredetileg is ott lévő polifenolos vegyület szabaduljon fel a sejtéből, a sejtfalak és sejthártyák degradálódása, valamint a polifenol-oxidáz enzim inaktiválása révén. Ugyanakkor említést tesz arról, hogy a túlzott mikrohullámú kezelés*

az említett vegyületek degradációját idézheti elő, és fontos a növényi szövet mennyiségéhez képesti ideális időtartamú és intenzitású mikrohullámú kezelés használata.

A felsorolt cikkekből megállapítható, hogy a mikrohullámú kezelés használata leginkább lágyszárú növények (fűszernövények, gyógynövények) valamint tealevelek esetében vizsgált, kutatott. Ezen kívül több élelmiszeripari példát is olvashatunk, amely azonban nem tartozik közvetlenül a jelen kutatás témakörébe. A szakirodalom hiányos, vagy nagyon kevés példát tartalmaz fás növényi szövetek (falevél, kéreg, szíjács) esetében a mikrohullámú enzim inaktiválás hatásának pontos és részletes vizsgálatára, valamint alkalmazására, így nehéz megmondani, hogy milyen hatást várunk az erdei fák levelei és kérgei esetében.

Az egyetlen szakcikk, mely fakéregben található enzimek inaktiválásáról szól Makk et al. (2013) munkája. A kutatók tölgy fajok kérgében található peroxidáz és polifenol oxidáz enzimek inaktiválására alkalmaztak mikrohullámú sugárzást a (+)-katechin tartalom megőrzése céljából. Munkájukban kimérték, hogy az általuk alkalmazott módszerrel a kezelt mintákban az enzimaktivitás a kezdeti érték 1-5%-ára csökkent, ezzel párhuzamosan a kezelt és a friss kéregminták (+)-katechin tartalma közt nem mutatkozott szignifikáns eltérés, tehát az eljárással sem degradáció, sem a vizsgált vegyület felszabadulása nem következett be.

A doktori kutatásomban a mikrohullámú előkezelés körülményeit a levelek esetében Ceni et al. (2009) munkája alapján állítottam be, mely maté tea levelek polifenol oxidáz- és peroxidáz enzimjeinek inaktiválását írja le mikrohullámú energia segítségével. Erdei fák leveleire vonatkozó hasonló témájú szakirodalmat nem találtam. A Ceni et al. (2009) ismertetett eljárásban a kutatók 40 g levelet 220 másodpercig kezeltek 800 W mikrohullámú sugárzással háztartási mikrohullámú sütőben, ezáltal mindkét enzim teljes inaktiválását el tudták érni. Ennek megfelelően a falevélmintáim esetében 18-20 g levél (ez mintegy 20-30 db levelet jelent, természetesen a pontos darabszám fafaj függő) esetében 120 másodperces előkezelést használtam 700 W-on. A kéreg minták esetében Makk et al. (2013) kutatását vettem alapul. Tölgykéreg esetében a szárítószekrényes szárítást, mikrohullámú kezelést és UV-sugárzással történő előkészítést hasonlították össze, mint enzim inaktiválási eljárásokat, és bebizonyították, hogy a mikrohullámú kezelés volt a leghatékonyabb a polifenolokat oxidáló enzimek inaktiválására, mivel segítségével megmaradt a minta kezdeti magas (+)-katechin-koncentrációja és az idő előrehaladtával csak kismértékben és lassan csökkent. Az alkalmazott beállítások a következők voltak: 700 Watt teljesítmény, 2 perc, 250 g kéreg szövet.

2.8. Antioxidáns tulajdonságok jellemzésére alkalmas módszerek

Az utóbbi időszakban jelentősen megnövekedett a természetes antioxidánsokkal kapcsolatos ismeretek iránti érdeklődés, ezért ezek jellemzésére is egyre nagyobb az igény. A kutatóknak azonban nincs könnyű dolguk, hiszen ahogy korábban is említésre

került, az antioxidáns vegyületek nagyon sokfélék lehetnek, így a meghatározásukra is számos módszer létezik. Ha megnézzük a szakirodalmat, akkor antioxidáns kapacitást meghatározó módszerrel mindenképpen találkozunk, illetve ha pontosan tudni akarjuk, hogy milyen vegyületek tehetők az antioxidáns hatásért felelőssé, valamilyen nagyműszeres analitikai technikát is alkalmazni kell.

A szakirodalomban gyakran egymás szinonimájaként használják az „**antioxidáns aktivitás**” és „**antioxidáns kapacitás**” kifejezéseket, bár ezek valódi jelentése különböző. Az antioxidáns aktivitás egy antioxidáns vegyület és egy adott szabad gyök közötti reakció sebességi állandója. Az antioxidáns kapacitás a vizsgált rendszer által befogott szabad gyökök anyagmennyiségének mértéke. Független az antioxidáns aktivitástól. Mivel a biológiai mintákban sokféle antioxidáns aktivitással rendelkező vegyület található, az antioxidáns tulajdonságok jobban jellemezhetőek az antioxidáns kapacitással (Ghiselli et al., 2000).

A fent említett okok miatt manapság nélkülözhetetlen, olyan módszerek használata, amelyek segítségével gyorsan és egyszerűen tudjuk az antioxidáns kapacitás számszerű értékét megadni (Tabart et al., 2009).

A szakirodalomban megfigyelhetjük, hogy általában nem egy, hanem többféle módszert használnak a kutatók az antioxidáns kapacitás meghatározására. Ennek az az oka, hogy önmagában egy módszer sem alkalmas a valódi, élő szervezetben lezajló folyamatok modellezésére, minden módszer valamilyen vegyületcsoportra specifikus, de egyik sem alkalmas az összes vegyület teljes antioxidáns tulajdonságának leírására. További problémákat vet fel, hogy gyakran nem vizsgálhatók egyszerre a lipofil és hidrofil antioxidánsok. A reakciók hasonló redoxi-mechanizmusa ellenére a fő reagens, a termékek és a mérés kivitelezése is különböző lehet, és az értékelt eredmények gyakran különbözőek a publikációkban, ezért nehéz összevetni a mérési eredményeket. Nagy szükség lenne az antioxidánsok vizsgálatának standardizálására, hogy a jelenlegi módszerek közötti „zűrzavart” minimalizálni lehessen. Léteznek gyors, olcsó, egyszerű metodikák, de találkozhatunk drága, bonyolult műszereket igénylő technikákkal is. Az antioxidáns kapacitás pontos meghatározását egyes esetekben az interferáló vegyületek következtében fellépő zavaró hatások hiúsítják meg (pl. az összes polifenol-tartalom meghatározását az aszkorbinsav nagymértékben zavarja). Mindezen indok következtében több mint 100 módszer került kifejlesztésre (Balogh, 2010), és a leggyakrabban alkalmazott antioxidáns kapacitást mérő módszerek két csoportra oszthatók fel **(6. táblázat)**:

- elektronátmeneten (ET-electron transfer) és
- hidrogén atom átvitelén (HAT-hydrogen atom transfer) alapuló módszerekre.

Az elektronátmeneten alapuló metodikák az antioxidáns vegyületek redukcióján alapuló színváltozást mérik, míg a hidrogén-atom átvitelén alapuló módszereknél az antioxidáns és a szubsztrát versenyez a szabad gyökökért.

ANTIOXIDÁNS KAPACITÁST MÉRŐ MÓDSZEREK TÍPUSAI		
Elektronátmeneten alapuló módszerek	Hidrogén atom átvitelén alapuló módszerek	Egyéb módszerek
ABTS-módszer (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav)	Krocin elszíntelenedésén alapuló módszer	TOSC-módszer (Total Oxidant Scavenging Capacity)
DPPH-módszer (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	TRAP-módszer (Total Peroxyl Radical Trapping Parameter)	Kemilumineszcenciás és elektro-kemilumineszcenciás módszerek
FRAP-módszer (Ferric reducing ability of plasma)	ORAC-módszer (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	Gyökök megkötésén alapuló módszerek (szuperoxid-anion, hidrogén-peroxid, hidroxil-gyök, szinglet oxigén, peroxi-nitrit)
CUPRAC-módszer (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity)		Voltammetriás technikák
Polifenol-tartalom meghatározása Folin-Ciocalteu-módszerrel		

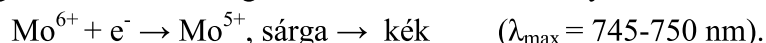
6. táblázat Antioxidáns kapacitást mérő módszerek típusai (Balogh, 2010; Rebey et al., 2012).

A módszerek közül csak a kutatásom során alkalmazott elektronátmeneten alapuló módszerek kerülnek bemutatásra.

2.8.1. Elektronátmeneten alapuló fontosabb módszerek

2.8.1.1. Folin-Ciocalteu-módszer

Az összes polifenol-tartalom meghatározására használt módszer kifejlesztése Singleton és Rossi (1965) munkája. Redukáló-képességen alapuló módszer (Balogh, 2010), a teljes polifenol-tartalmat vizsgálja, de nem fenolos vegyületekre is ad válaszreakciót, kisebb intenzitás-értékekkel (Tabart et al., 2009). Az eredeti módszert tirozin analízisére használták, melynek során a fenolok oxidációja egy molibdo-wolframát reagenssel valósult meg, színes terméket eredményezve:



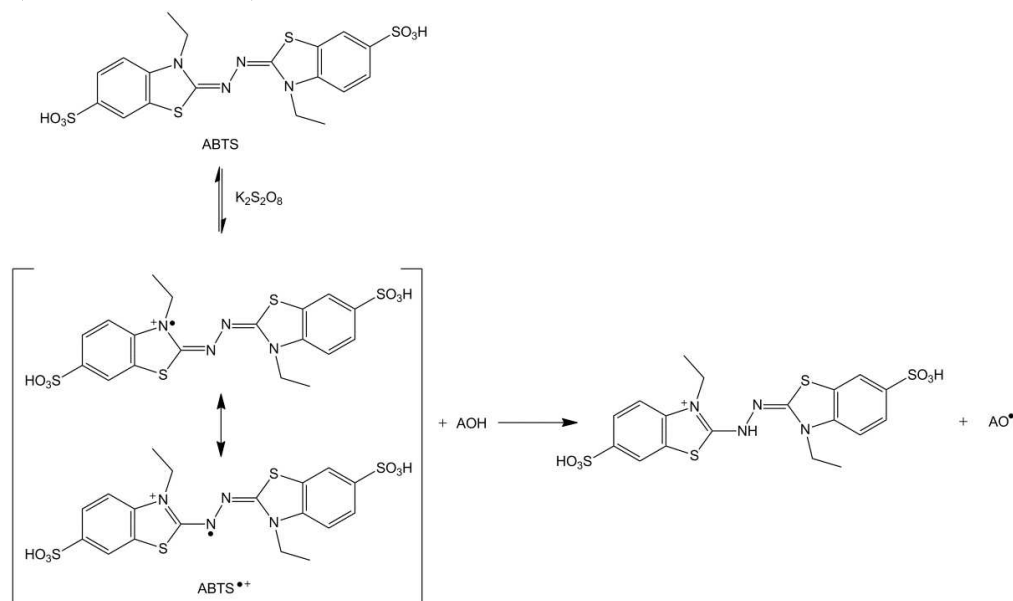
Ez a módszer egyszerű, érzékeny és precíz, de savas pH-n a reakció lelassul, és specifikusságát is elveszti. Singleton és Rossi fejlesztette tovább, új reagenst alkalmazva, amely sokkal specifikusabban redukálta a fenolokat. A mérés pH=10-en történik, a keletkező kék szín spektrometriásan nyomon követhető 765 nm-en. Bár Singleton és Rossi pontosan leírta a módszer lépéseit, a kutatók sokféle reagens koncentrációt és inkubálási időt alkalmaznak. A méréshez előírt eredeti standard a galluszsav volt, ehelyett is sok más vegyületet használnak, pl. (+)-katechint, kvercetint, klorogénsavat. Gondot okoz a módszer standardizálásának hiánya is, egy kísérletben az áfonyák vizsgálata során a polifenol-tartalom 22 és 4180 mg/100 g friss tömeg között változott a mérési paraméterek változtatása következtében (Prior et al., 2005).

A Folin-Ciocalteu-módszer legnagyobb **hátránya**, hogy nem specifikus a polifenolokra, számos interferáló vegyület zavarja a mérést (főleg cukrok, aromás aminok, aszkorbinsav, szerves savak, de szervesetlen komponensek is (kén-dioxid, Fe(II)-ionok, mangán-szulfát, nátrium-foszfát, nátrium-szulfít stb.)), ezáltal a módszer megtévesztő eredményt adhat (Prior et al., 2005). További hátrány, hogy lúgos pH-n történik a mérés, ami nem életszerű (Balogh, 2010).

2.8.1.2. **ABTS-módszer**

A módszert Miller et al. (1993) fejlesztették ki, amelynek első lépése az ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav)-gyök létrehozása. Eredetileg ebben a módszerben metmioglobint és H_2O_2 -ot reagáltattak ferrilmioglobin létrehozása céljából, majd ez reagált az ABTS-sel, hogy ABTS^{++} jöjjön létre. A gyök kialakítása más reakcióúton is megvalósulhat, például kálium-perszulfáttal (**12. ábra**), vagy mangán-dioxiddal, esetleg enzimatis úton történő oxidáció során. Ezt követően a kék/zöld színű gyök redukálódik az antioxidánsokkal való reakció során, s így a reagens színintenzitása csökken, adott esetben teljesen elszíntelenedik. Ezt az abszorbancia-csökkenést spektrofotometriásan mérik 734 nm-en (Prior et al., 2005). A mérést 7,4-es pH-n végzik, a módszer megfizethető, egyszerű és gyors. A mérést 12-16 órás inkubálás előzi meg (ez alatt képződik az ABTS^{++}), emiatt a minta-előkészítés hosszadalmas.

További **hátrány**, hogy a módszer olyan gyököt használ, ami az élő szervezetben nem található meg (Balogh, 2010), továbbá az ABTS-reagens viszonylag instabil, és lassan elbomlik a reakciókörülmények között. Pl. mérhető abszorbancia-csökkenés tapasztalható a mérések folyamán, ami megnövelheti a minta antioxidáns értékét, pozitív hibát okozva ezzel (Stratil et al., 2007).



12. ábra Az ABTS kálium-perszulfát általi oxidációja ABTS^{++} -gyök létrehozása céljából, és a gyök reakciója egy gyökfogó komponenssel (De Oliveira et al., 2014). AOH: gyökfogó komponens.

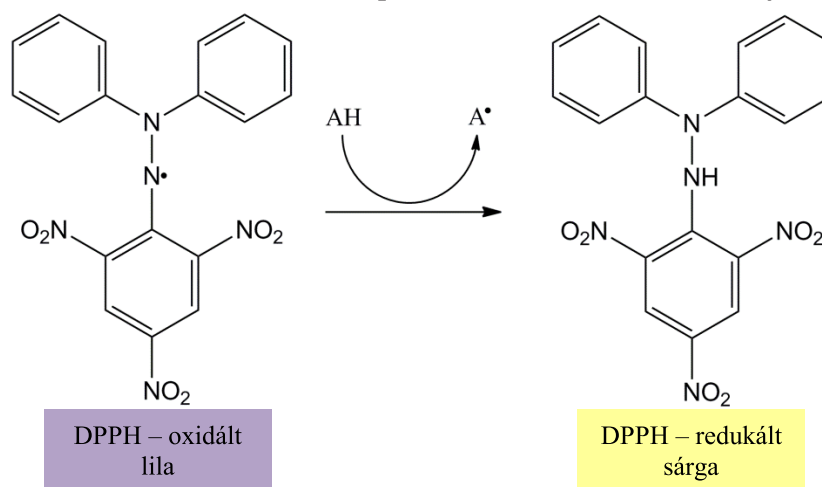
A módszer nagy **előnye**, hogy színes mintáknál is alkalmazható, mert az abszorbancia a látható fénytartományon kívül mérendő (a közeli infravörös sugárzás tartományában)

(Prior et al., 2005). Az ABTS^{++} poláros és apoláros oldószerekben is oldódik, többféle közegben alkalmazható, így hidrofil és liofil antioxidánsok meghatározására is alkalmas.

Termodinamikailag olyan vegyületek képesek redukálni az ABTS^{++} -t, amelyek redox potenciálja alacsonyabb, mint az ABTS -é (0,68 V). Ennek megfelelően számos fenolos vegyület képes redukálni az ABTS^{++} -t (Prior et al., 2005), de az egyes komponensek reakcióideje eltérő. Pl. a C-vitamin egy perc alatt is teljes mértékben elreagál, de a galluszsavnak, vagy a karotinoidoknak több idő kell a reakció végbemeneteléséhez. Ezért célszerű lenne adott mérési időt standardizálni, hogy a laboratóriumok közötti eredmények összevethetők legyenek (Balogh, 2010).

2.8.1.3. DPPH-módszer

Ezt a széles körben elterjedt reakciót 1958-ban Blois javasolta (Kedare és Singh, 2011). A DPPH-gyök nitrogéntartalmú szerves vegyület, mely sötétlila színű, a kereskedelmi forgalomban kapható, és nem szükséges jóval a mérés előtt létrehozni, mint az ABTS^{++} -t. A módszer azon alapul, hogy az adott komponensek milyen mértékben képesek redukálni a $\text{DPPH}^{\bullet}$ -t. Ezt a redukáló-képességet vagy elektron spin rezonanciával, vagy az abszorbancia csökkenés mérésével lehet meghatározni (Prior et al., 2005), ugyanis a DPPH elveszti színét az antioxidáns komponensekkel való reakcióban (13. ábra), és ezt 515 nm-en spektrofotométerrel követni tudjuk.



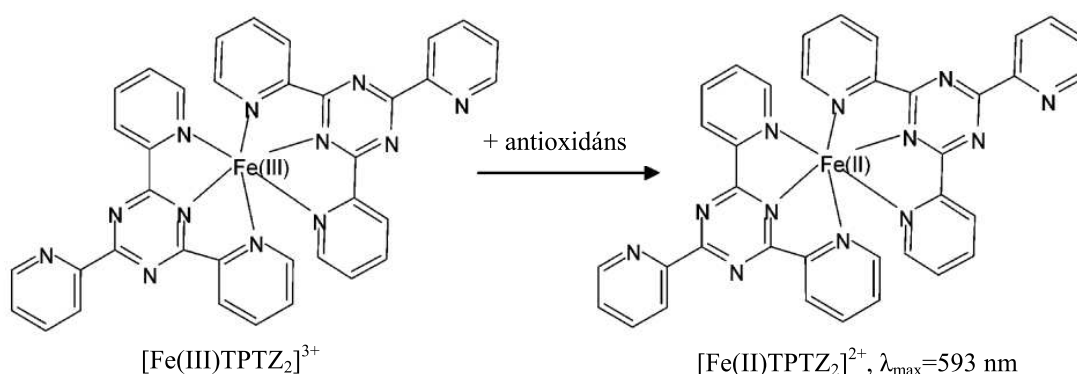
13. ábra A DPPH-gyök megkötésén alapuló módszer alapja (Teixeira et al., 2013).

Ennek a módszernek is vannak **hátrányai**. Az élő szervezetben fel nem lelhető gyököt használ, a reakciót sötétben kell végezni, mivel a $\text{DPPH}^{\bullet}$ -gyök érzékeny a fényre, továbbá oxigénre, és a pH-változásra is. A színes vegyületek gondot okozhatnak, például a karotinoidok interferálnak 515 nm-en (Prior et al., 2005). Nehézséget jelent, hogy a $\text{DPPH}^{\bullet}$ -gyök elszíntelenedése nemcsak HAT-reakcióúton, hanem ET-reakcióval is végbemehet, és a sztérikus hatások lesznek a döntőek a reakcióban. Ennek megfelelően a kisméretű molekulák, amelyek jobban hozzáférhetőek a gyök számára, nagyobb antioxidáns kapacitást fognak mutatni (Stratil et al., 2007). A módszer nem ad képet arról, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak.

Az ABTS- és DPPH-módszereket összehasonlítva elmondhatjuk, hogy mindkét módszer alkalmazható tiszta, természetben megtalálható vegyületek és komplex elegyek vizsgálatára is. Az antioxidáns kapacitás mindkét esetben leírható az IC_{50} -értékkel, ami azt fejezi ki, hogy az antioxidáns vegyület mekkora koncentrációja szükséges ahhoz, hogy a DPPH $^{\bullet}$ - és ABTS $^{*+}$ gyök mennyisége a kezdeti koncentráció felére csökkenjen, ami a kezdeti abszorbancia 50%-ával jellemezhető (De Oliveira et al., 2014). Stratil et al. (2007) egy gyümölcsökre és gabonákra kiterjedő kutatásban a DPPH- és ABTS-módszerek összehasonlítása során azt állapították meg, hogy a DPPH-módszerrel kapott antioxidáns kapacitások többször kisebbnek adódtak. Ezt azzal magyarázták, hogy a DPPH $^{\bullet}$ -gyök viszonylag stabilisabb, és ez kisebb reakcióképességben nyilvánul meg. Ez a gyök nyilvánvalóan csak a reaktívabb fenolos vegyületekkel lép reakcióba, így a módszer nem fogja detektálni a kevésbé reakcióképes komponenseket, amelyeknek azonban jelentős antioxidáns hatásuk lehet az emberi szervezetben.

2.8.1.4. FRAP-módszer

A FRAP-módszert eredetileg Benzie és Strain (1996) használta redukáló-képesség mérésére plazmában. A meghatározás a Fe^{3+} - 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) komplex antioxidánsok általi redukcióján alapul, ahol a Fe^{2+} - TPTZ-komplex színintenzitását mérik 593 nm-en spektrofotometriásan (14. ábra).



14. ábra A FRAP-módszer mérési elve (Balogh, 2010).

A módszer gyors (reakcióidő 5 perc) és egyszerűen kivitelezhető, a reakció reprodukálható, és egyenes arányosság útján jelzi az antioxidánsok koncentrációját (Benzie és Strain, 1996). A DPPH-módszerrel ellentétben a FRAP-módszer teljes mértékben elektronátmeneten alapul, így ha más módszerekkel kombináljuk, akkor nagyon hasznos lehet a különböző antioxidánsok reakcióinak megkülönböztetésére.

A $Fe(III)$ -TPTZ-komplex redox potenciálja hasonló az ABTS $^{*+}$ -gyökéhez, így hasonló vegyületek reagálnak a két reakcióban, azonban a reakciókörülmények különbözőek. Az ABTS-módszer semleges pH-n zajlik, a FRAP-módszert pedig savas pH-n (pH=3,6) kell végrehajtani, hogy a vas-ionok oldhatósága fenntartható legyen. Az alacsony pH következtében csökken az ionizációs potenciál, ami az elektronvándorlást irányítja, és

növekedik a redoxpotenciál, ami egy eltolódást eredményez a reakciómechanizmusban. A kutatók abból a szempontból vitatják a módszert, hogy egy vegyület vasredukáló-képessége kevésbé jellemzi, hogy milyen a vegyület szabad gyök befogó képessége, ami az antioxidánsok fontos tulajdonsága. Azonban a gyökök ionokká való redukciója vagy oxidációja megállítja a láncreakciókat, így a redukáló-képesség tükrözi a vegyületek redoxtónus-moduláló képességét a szövetekben.

A FRAP- és az ABTS-módszer is azon a hipotézisen alapul, hogy a redoxreakciók gyors lefolyásúak, és 4-6 perc alatt végbemegy az összes elektronvándorlás, azonban a valóságban ez nem így van. A FRAP-mérések eredményei nagyon változatosak lehetnek attól függően, hogy mennyi a reakcióidő. A gyorsan reagáló fenolok rövid reakcióidővel jellemezhetők, azonban számos polifenol sokkal lassabban reagál, és hosszabb reakcióidőre van szükség (30 perc). Egy adott időben leolvasott abszorbancia-érték tehát nem biztos, hogy a reakció végpontját jelenti.

A FRAP-módszer további **hátránya**, hogy nem mér tiol-csoporttal rendelkező antioxidánsokat, pl. glutationt (Prior et al., 2005), valamint a karotinoidokra sem érzékeny, továbbá minden olyan komponens, amelynek a redoxpotenciálja +0,77 V-nál kisebb, redukálhatja a vas(III)-iont, így a nem antioxidáns vegyületek pozitív hibát okoznak (Prior et al., 2005).

Összefoglalás. *Megállapítható, hogy nehéz kiválasztani azokat a mérési módszereket, amelyek az adott mintamátrix valódi antioxidáns tulajdonságait leírják. Korrelációt csak olyan mérések között várhatunk, amelyek ugyanolyan elven működnek, és azonos körülmények között végezték őket, de gyakran még ekkor sincs az eredmények között nagymértékű összefüggés.*

Az egyik alapvető probléma az, hogy nem olyan reakciót mérnek, ami az élő rendszerben valóban meghatározza az elegy antioxidáns kapacitását. Többségük mesterséges szabad gyököket alkalmaz, és így a biológiai rendszerekben ténylegesen végbemenő reakciókról kevés információt adnak.

Az alkalmazott eljárásokkal szemben további követelmény, hogy legyen egyszerűen és gyorsan megvalósítható, amit az előbb felsorolt módszereknél meg is tapasztalhatunk.

A módszerek alapját olyan reakcióknak kell képezniük, amelyek mechanizmusa jól ismert és végpontjuk egyértelmű. Ha nem egyértelmű a reakció végpontja, akkor a kutatók önkényesen határoznak meg egy reakcióidőt. Mivel ez nincs standardizálva, ezért más értékeket kapnak DPPH-, FRAP-, és ABTS-mérések esetében (hosszabb reakcióidő alatt nagyobb lesz az antioxidáns kapacitás), a reprodukálhatóság csökken, és a közölt eredmények összehasonlítása nem valósítható meg.

Az alkalmazott standard vegyületek használatával kapcsolatban sincs megegyezés, és emiatt sem lehetséges a mérési eredmények összehasonlítása, és ha még azonos is egy adott módszernél a standard vegyület, még akkor is eltérhetnek a végső eredmények, hiszen szárazanyag-tartalomra, friss tömegre, de extraktanyag-tartalomra is

megadhatják őket. Ezeket nekünk kell átszámolnunk, ha össze akarjuk vetni a saját eredményeinkkel, azonban ha a minta-előkészítési lépések hiányosan vannak megadva, ez sem lehetséges.

További gond lehet az is, hogy a módszerek szelektívek bizonyos vegyületekre, pl. a DPPH-metodikánál kedvezményezettek a kis molekulájú vegyületek. A növényi kivonatok összetettsége miatt ezekben az extraktumokban számos interferáló vegyület is zavarja a méréseket, és ez is megnehezítheti a módszer kiválasztását.

Összességében, ha egy biológiai minta „antioxidáns” tulajdonságaira vagyunk kíváncsiak, célszerű a mintát több (legalább három) lehetőleg különböző elven működő antioxidáns kapacitás meghatározó módszerrel vizsgálni és a kapott eredményeket együttesen kiértékelni.

2.8.2. Összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalom meghatározása

Mivel számos kutatás bebizonyította, hogy a flavonoidok és flavanolok is antioxidáns hatásokkal rendelkeznek (Pratt és Miller (1984); Lahiri-Chatterjee et al., (1999); Torres et al., (2002); Coskun et al., (2005)), ezért munkám során ezt a két vizsgálati módszert is alkalmaztam a kivonatok vizsgálatára. Ezek a módszerek annyiban különböznek a 2.8.1 fejezetben ismertetett eljárásoktól, hogy nem a kivonatok „összes” antioxidáns kapacitását mérik, hanem szelektíven csak flavonoidok, illetve flavan-3-ol típusú antioxidánsok mennyiségét határozzák meg. A kapott eredmények árnyalják azt a képet, amit a FRAP-, ABTS- és DPPH-módszerek illetve az összes polifenol-tartalom szolgáltatnak a kivonatok antioxidáns kapacitásáról, információt nyújtanak arról, hogy az antioxidáns tulajdonságok kialakításához ezen típusú vegyületek milyen mértékben járulnak hozzá. A flavonoidok antioxidáns tulajdonságai nagyban függenek a molekulaszerkezetüktől, antioxidáns képességük arányos a hidroxil-csoportok számával. Egy flavonoid jobb antioxidáns, ha a B-gyűrűn van egy *o*-dihidroxirész is (Apak et al., 2004).

A flavonoid-tartalom meghatározására többféle eljárás is található az irodalomban. Az általam alkalmazott módszer Kalita et al. (2013) meghatározásán alapul: savas környezetben a flavonoidok C4-keto és C3- vagy C5-hidroxil-csoportja stabil komplexet képez alumínium-kloriddal. A képződő komplex jelentős abszorbanciával rendelkezik és ez 415 nm-en spektrofotometriásan mérhető.

A flavan-3-ol-tartalom meghatározására kétféle módszert használnak. Vagy HPLC-vel történő elválasztást alkalmaznak különféle detektálási technikával, például tömegspektrométerrel (Grysczyńska et al., 2011), vagy spektrofotometriás úton határozzák meg a flavan-3-ol-tartalmat. Treutter (1989) munkája alapján az utóbbit választottam: ez a módszer azon alapul, hogy koncentrált kénsav jelenlétében a DMAC [(4-(dimetilamino)-fahéjaldehid)] a flavan-3-ol vegyületekkel (katechinek és procianidinek) szelektív kondenzációs reakciót ad, melynek terméke jól mérhető abszorpciós maximummal rendelkezik 640 nm-en. A többi fenolos vegyület, indolok és

terpének is reakcióba lépnek ezzel a reagenssel, de más fényelnyelésű terméket eredményeznek, vagy csak gyenge reakciót mutatnak. A módszer (-)-epikatechinre például 20-40000-szer érzékenyebb, mint egyéb fenolokra vagy szubsztituált indolokra (Treutter, 1989).

2.9. Antioxidáns hatású vegyületek extrakciójára alkalmas módszerek

Ahhoz, hogy a növényekben lévő antioxidáns hatású vegyületeket a jövőben felhasználhassuk valamilyen gyakorlati alkalmazásra, mindenképpen szükséges egy olyan extrakciós módszer, amivel ez megvalósítható. Az irodalom szerint a molekulákat friss, fagyasztott, vagy szárított növényi részekből is kivonhatjuk. Növényi részekből a kivonatok elkészítése leggyakrabban oldószeres extrakcióval történik, ugyanis ez a technika egyszerű, hatékony és széleskörűen alkalmazható. Általános elvként az oldószeres módszereknél szem előtt kell tartani, hogy a kinyerés hatásfoka nagymértékben függ az oldószer polaritásától, az extrakció időtartamától, az alkalmazott hőmérséklettől, a növényi minta és az oldószer arányától, valamint a minta kémiai és fizikai tulajdonságaitól. A polifenolok oldhatóságát a növényi minta kémiai jellege ugyanúgy meghatározza, mint a felhasznált oldószer polaritása. A növényekben különböző mennyiségben fordulhatnak elő az egyszerű polifenolok és a nagy molekulatömegű származékok, ráadásul sok polifenol más vegyületekkel (pl. szénhidrátokkal) képez asszociátumokat, vagy a sejtfalmátrixhoz kémiaiilag kapcsolódik (ún. „nem extrahálható polifenolok” formájában). Ezért nem létezik univerzális extrakciós eljárás, amely minden polifenolt képes kivonni a növényi szövetből. Az alkalmazott oldószerelegytől függően a polifenolok „keverékét” kapjuk, továbbá nem-fenolos komponensek (szénhidrátok, szerves savak, zsírok) is kerülnek az extraktumba, ezért gyakran további tisztítási lépést kell beiktatni a nemkívánatos vegyületek eltávolítása céljából (Dai és Mumper, 2010).

Az irodalomban fellelhető leggyakrabban alkalmazott oldószeres a metanol, etanol, aceton, és etil-acetát, illetve ezek vízzel alkotott különböző arányú elegyei (Dai és Mumper, 2010), de találkozhatunk olyan kutatásokkal is, ahol kloroformot (Ting et al., 1979), benzolt (Bianchini és Gaydou, 1983), vagy n-hexánt (Ludwiczuk et al., 2011) használtak.

Általánosságban elmondható, hogy a metanol főleg kis molekulatömegű polifenolok extrakciójára alkalmas, míg a nagyobb molekulatömegű vegyületeknél, pl. a flavanoloznál vizes acetonnal nagyobb extrakciós hatásfok érhető el. Az etanol szintén nagyon hatékony oldószernek számít, nagy előnye, hogy biztonsággal alkalmazható emberi fogyasztásra szánt kivonatok esetében (Dai és Mumper, 2010), valamint, hogy elfogadható áron lehet beszerezni, ami fontos szempont, ha üzemi méretekben szeretnénk az extrakciót megvalósítani. További érv az etanol mellett, hogy legnagyobb részt fermentációval állítják elő, így emiatt gyártásának ökológiai lábnyoma is kisebb (St-

Pierre et al., 2013), ezzel pedig a kivonatok elkészítése környezetbarátabb módon történhet meg.

Antocianinokban gazdag növényi szövet extrakciójához savas alkohol elegyet alkalmaznak. Ez az oldószer kombináció a sejtmembránok denaturálásával egyidejűleg kioldja az antocianinokat. A sav alkalmazásánál ügyelni kell arra, hogy gyenge szerves savakat (pl. hangyasav, ecetsav, citromsav), vagy kis koncentrációjú szervesetlen savakat használjunk (Dai és Mumper, 2010).

Az extrakció kivitelezése során nemcsak az oldószerek közül válogathatunk, hanem a kivonatok elkészítésének módszere is változatos lehet. Gyakran alkalmazott technikák az áztatás és a Soxhlet-extrakció. Ezeknek a módszereknek a hátrányai az alacsony kinyerési hatások, a hosszú extrakciós időtartam, a nagy mennyiségű növényi anyag és oldószer, így ezek a módszerek a környezetet is jelentősen terhelik. Ennek ellenére a kutatók ezeket a módszereket is előszeretettel alkalmazzák (Boulekbache-Makhlouf et al., 2013; Čujić et al., 2016). Ezeknél kedvezőbb eljárás pl. az ultrahangos extrakció. Ez a technika az előzőkhez képest számos előnnyel bír, pl. oldószer- és időtakarékos, nagy kinyerési hatásokú, így ez a módszer már megfelel korunk környezetbarát követelményeinek is (Jovanović et al., 2017). Az ultrahangos technika mellett a mikrohullámmal segített extrakció is eleget tesz a környezetkímélő szemléletnek, hiszen segítségével szintén rövid idő alatt energiatakarékos módon, nagy kinyerési hatásokkal készíthetjük el a növényi kivonatot. A mikrohullámú extrakció során elektromágneses sugárzással (0,3 és 300 GHz közötti frekvenciával) kezeljük az oldószerben lévő mintát. A növényi mátrixban a besugárzott mikrohullámú energia főleg a poláros molekulákra (pl. vízre, a növények nedvességtartalmára) hat, ennek következtében a sejtek szétszakadnak, így a számunkra érdekes vegyületek is kinyerhetővé válnak (Bouras et al., 2015).

Összességében elmondható, hogy többféle extrakciós technika és oldószer közül választhatunk, szem előtt tartva az anyagi és környezetbarát megfontolásokat is. Azonban fontos megjegyezni, hogy nem létezik olyan univerzális oldószer és eljárás, amivel minden növényi szövetből minden vegyületcsoportba tartozó komponenst azonos hatásokkal tudunk kinyerni, ezért az extrakciók kivitelezését megelőzően fontos lenne az adott szövetre és a célvegyület-csoportra kioldási módszert fejleszteni.

2.10. Polifenolos vegyületek HPLC-PDA-MS/MS elválasztása és azonosítása

A növényi részekből készült extraktumok összetett kivonatok, hiszen az adott extrakciós oldószer (pl. etanol, metanol, acetonitril, aceton, illetve ezeknek vízzel alkotott elegyei, stb.) nemcsak azokat a vegyületeket oldja ki, amire épp kíváncsiak vagyunk, számolnunk kell egyéb komponensek jelenlétével is. A kromatográfiás elválasztás célja az antioxidáns és egyéb bioaktív hatásokért felelős vegyületek elválasztása és azonosítása, ismeretlen vegyületek kutatása, valamint ezen komponensek mennyiségi meghatározása. Az antioxidáns hatású vegyületek elválasztása és azonosítása kiemelkedő fontosságú, mert azonosításukkal meg tudhatjuk, mely vegyületek felelősek egy növényi

kivonat antioxidáns és egyéb (pl. egészségvédő) tulajdonságáért. A szerkezeti információk segítségével történő azonosítás során eddig ismeretlen vegyületek leírására is sor kerülhet.

Általánosságban egy kromatográfias módszer olyan elválasztás-technikai módszer, amelynél a minta alkotóinak elválasztása egy helyhez kötött *állófázis* és az ezzel érintkező, *mozgó* fluid *fázis* közötti anyagátmeneten, valamint az egyes alkotóknak az állófázissal való eltérő kölcsönhatásán alapszik. Úgy érzük el a komponensek mozgását, hogy az állófázis felett pl. nyomáskülönbség hatására áramlást hozunk létre. A komponensek a mozgófázisban, azzal azonos sebességgel haladnak, de amikor kapcsolatba kerülnek az állófázissal, azon szerkezetüktől függően különböző időt töltenek (visszatartódnak), emiatt az egyes vegyületek az eltérő fizikai, kémiai tulajdonságaik miatt a kromatográfias állófázison történő áthaladás során elválasztódnak egymástól.

Vizsgálataimhoz a nagy-hatákonyságú folyadékkromatográfia módszerét (HPLC) alkalmaztam. A folyadékkromatográfias módszerek osztályozásának egyik alapja a fázisok polaritásának különbsége. Ez alapján normál fázisú és fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiáról beszélhetünk.

Az utóbbi 20 évben a leggyakrabban alkalmazott módszer a polifenolos vegyületek elválasztására a fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia (RP-HPLC) volt (Robbins, 2003). Alapelve, hogy az állófázis apolárosabb, mint a mozgófázis, és ennek következtében az apoláros komponensek erősebben kötődnek az állófázishoz, mint a polárosak (Burger, 2002). Ebből kiindulva állófázisként az esetek legnagyobb részében C₁₈-as oszlopokat (az állófázisként alkalmazott szilikagél felületét C₁₈-as csoportokkal módosítják, így alkalmas lesz az apoláros vegyületek elválasztására) használnak, mozgófázisként pedig többféle oldószert (általában víz és valamilyen szerves oldószer elegyét adott pH értékre pufferálva) használnak, legtöbbször gradiens elúciót alkalmazva. Mint-összetételtől függően sokféle gradiens program alkalmazható, az alkalmazott szerves oldószerek típusai azonban kevésbé változatosak: általában metanolt vagy acetonitrilt alkalmaznak, ritkábban propanolt, butanolt, tetrahidrofuránt és etil-acetátot. A vizes oldószerhez általában ecetsavat adnak, de kénsav, perklórsav, sósav alkalmazására is van példa (Robbins, 2003).

A mérés időtartama is széles intervallumban mozoghat, 30 és 150 perc között. Néhány módszert úgy fejlesztettek ki, hogy a kis és nagy molekulatömegű polifenolok is elválaszthatók legyenek, ami meghosszabbítja az analízis idejét.

Az elválasztott polifenolos vegyületeket megfelelő detektorral azonosítják. A HPLC-hez kötött detektorok korlátozottan használhatók a komponensek azonosítására. Bár alacsony kimutatási határral rendelkeznek és jó az érzékenységük, az UV, fluoreszcencia, törésmutató, fényszóródási vagy elektrokémiai detektorok által nyújtott molekulaserkezeti információk hiányosak. Ennek kiküszöbölésére általában két vagy több analitikai technikát használnak kapcsolatosan. Leggyakrabban átfolyócellás diódasoros

(DAD/PDA) detektort használnak, mely az ultraibolya (UV) illetve látható (VIS) tartományban működik, de a részletesebb és pontosabb szerkezeti- és mennyiségi információk kinyerése érdekében a HPLC-rendszert tömegspektrometriás detektorral (MS) is összekapcsolják (HPLC-MS). A diódasoros detektor használata esetében nem csak egy hullámhosszon történik a mérés, hanem egy tartomány detektálására kerül sor, majd a mérés végeztével kiválasztják azt a hullámhossz-tartományt, amire szükség van. Ennek az az előnye, hogy a különböző fényelnyelésű komponensek egyszerre mérhetők. A flavanolok mennyiségi meghatározása 280 nm-en, a flavonoidoké 300 nm-en, a hidroxifahéjsavaké 320 nm-en, az antocianinoké 520 nm-en történik. Az elválasztott komponensek UV-VIS színeképének vizsgálatára is lehetőség van ezzel a detektálással.

A tömegspektrométerekben semleges részecskékből ionokat állítunk elő, majd az ionokat elektromágneses terek segítségével tömeg/töltés arányuk szerint elválasztjuk. Fontos részelemei az ionforrás, az ionoptika, a tömeganalizátor és a detektor. Különböző ionizációs technikák terjedtek el. Ezek közül a legsokoldalúbb az elektroporlasztásos ionizáció (ESI), a mátrixszal segített lézer deszorpciót (MALDI) főleg a nagy molekulatömegű procianidinek elemzésére használják, míg a kevésbé poláros komponensek azonosítására az atmoszferikus nyomású kémiai ionizációt (APCI) alkalmazzák. A tömegspektrométer analízatoraként a repülési idő analízátor (TOF) az analit egzakt tömegét képes meghatározni, az ioncsapda analízátorral az érzékenység növelhető és ezzel a molekulák szerkezetének kutatására is lehetőség van. A legegyszerűbb analízátor az ún. kvadrupól analízátor, melyből egy (egyszeres kvadrupól) illetve három (hármass kvadrupól) egység is kerülhet egy tömegspektrométerbe. A hármass kvadrupól (QqQ) rendszer leginkább a szelektív mennyiségi meghatározásra alkalmazható.

Mivel kutatásom során a polifenolok azonosítására ESI ionizációs technikát és hármass kvadrupól/lineáris ioncsapda analízátort alkalmaztam, ezért ezekről adok részletes leírást.

Az ESI technika viszonylag régi módszer, fizikai alapjait Sir Geoffrey Taylor írta le (Taylor, 1964), majd később, 1988-ban John Fenn csapatának sikerült demonstrálnia azt, hogy a nagy molekulákat (pl. fehérjéket) képesek ionokként gázfázisba juttatni anélkül, hogy azok szerkezeti károsodást szenvedtek volna ((Meng et al., (1988), Fenn et al., (1989)). Ezután más kutatócsoportok között már gyorsan elterjedt az új technika, és ezzel új út nyílt meg a biomolekuláris tudományok területén.

Az ESI technika azért nagyon elterjedt, mert széleskörűen alkalmazható olyan mintáknál, amelyek folyékony halmazállapotban vannak, és így közvetlenül összekapcsolható folyadékkromatográfias eszközökkel. A folyadék halmazállapotból kinyert ionokra jellemző, hogy nagyon stabilak és nincsenek gerjesztett állapotban, az ionizáció nagy hatékonysággal megy végbe, továbbá a molekulák tömege nem jelent limitáló tényezőt az ionok létrehozásánál (Wilm, 2011).

Az ESI-módszer a lágy ionizációs technikák közé tartozik, ami azt jelenti, hogy nagy polaritású, kevésbé illékony, vagy termikusan instabil komponensek számára alkalmas

ionképzésre. Mivel a képződött ionok legnagyobb része protonált vagy deprotonált molekula, ezért bonyolult fragmens ionok nem képződnek. Ennek köszönhetően könnyen meghatározható a vegyület moláris tömege, és ez a technika széleskörűen alkalmazható a gyakorlatban (URL 13.).

Az ionok az ionforrásban való létrejöttük után az interfészen keresztül az analizátorba kerülnek, ahol tömeg/töltés (m/z) hányadosuk alapján szétválnak, és a detektorba kerülnek. A kvadrupól analizátor négy darab párhuzamosan elhelyezkedő, az elektromosságot vezető fémrúdból, elektródból áll. Az ionforrásból származó ionok a négy fémrúd között haladnak át. A rudakra egyen- és váltófeszültséget is kapcsolnak úgy, hogy az átlósan egymással szemben lévő rudak szimultán kapcsolódnak össze, az egymás mellettiek pedig ellentétes előjelű potenciállal rendelkeznek. A két rúdpár még egy rádiófrekvenciával vezérelt oszcillátorhoz is kapcsolódik. A létrehozott tér az ionok haladási irányára merőleges. Az ionok az egyen- és váltóáram összesített hatásának következtében a haladási irányukra merőleges transzverzális mozgást hajtanak végre. Az előre haladó ionok közül a kationokat a pozitív töltésű rudak taszítják, a negatív töltéssel rendelkező rudak pedig vonzzák. Mivel az oszcillátor működése révén az elektródok töltése folyamatosan változik, így az ionok is szabálytalan mozgást végezve haladnak előre. Csak azok az ionok jutnak át az analizátoron keresztül a detektorba, amelyek végighaladnak a rudak között, a többi ion a rudaknak csapódva elveszik.

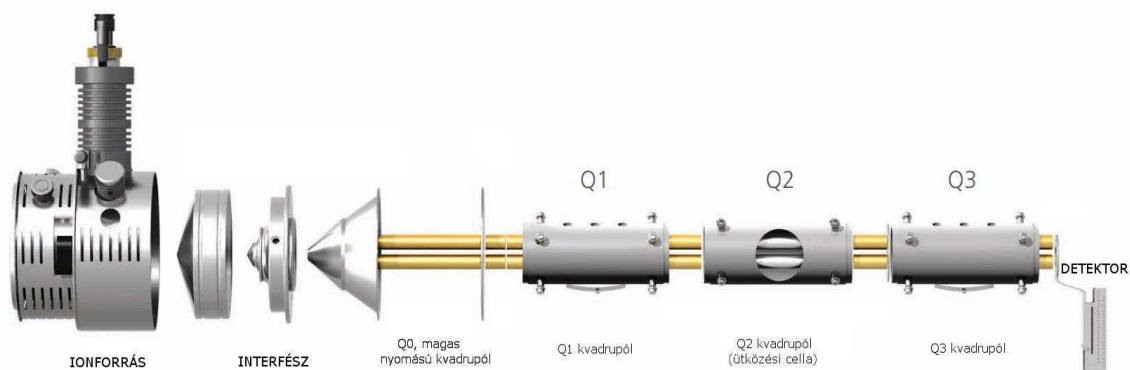
A kvadrupól analizátor előnye, hogy pozitív és negatív töltésű ionok analizátoraként is működik. A műszer méretének változtatásával beállítható az analizátor alkalmazási tartománya is. Ha növeljük a fém rudak hosszát (5-20 cm), azzal a felbontóképességet is nagyobb irányba változtatjuk, a fém rudak keresztmetszetének növelésével pedig az analizátor érzékenységét növelhetjük, ugyanis ezáltal a vizsgálandó ionok m/z arányának tartománya kisebb lesz (Burger, 2002).

Kutatásom során a polifenolos vegyületek profilozását és szerkezeti vizsgálatát a tandem tömegspektrometria segítségével végeztem, aminek alapja egy hármas kvadrupól analizátor. Az általam használt tömegspektrométer esetében a második kvadrupól ütközési cellaként, a harmadik kvadrupól lineáris ioncsapdaként is használható, ami a kimutatási határt csökkenti, és a készülék érzékenységét a hagyományos hármas kvadrupól tömegspektrométerekhez képest jelentősen növeli. A kvadrupól analizátort kétféleképpen használhatjuk: pásztázó (*scan*) vagy szűrő (*park*) üzemmódban.

A tömegtartomány pásztázása során az egyen- és váltóáram folyamatosan változik, és ennek eredményeképpen a teljes tömegtartomány feltérképezésére sor kerül. Az így kapott tömegspektrumok minőségi információt nyújtanak. A pásztázó üzemmód hátulütője, hogy az így működő kvadrupól kis érzékenységre és lassú pásztázási sebességre képes, ezért a mennyiségi meghatározást igénylő méréseknél a szűrő üzemmód alkalmazása terjedt el (URL 14.).

A hármas kvadrupól tömegspektrométerek (**15. ábra**) esetében az ionok három egymást követő kvadrupól analizátoron repülnek keresztül. A három kvadrupól megfelelő

programozásával és időbeli egymáshoz hangolásával különböző „kísérletek” hajthatók végre, melyek szelektív minőségi (molekula tömegének és szerkezetének vizsgálata céljából), illetve mennyiségi analízist tesznek lehetővé.



15. ábra A hármas kvadrupól/lineáris ioncsapda elrendezésű MS detektor felépítése (URL 15.).

A polifenolok elválasztására és azonosítására a **16. ábrán** látható HPLC-PDA-MS/MS készüléket használtam.

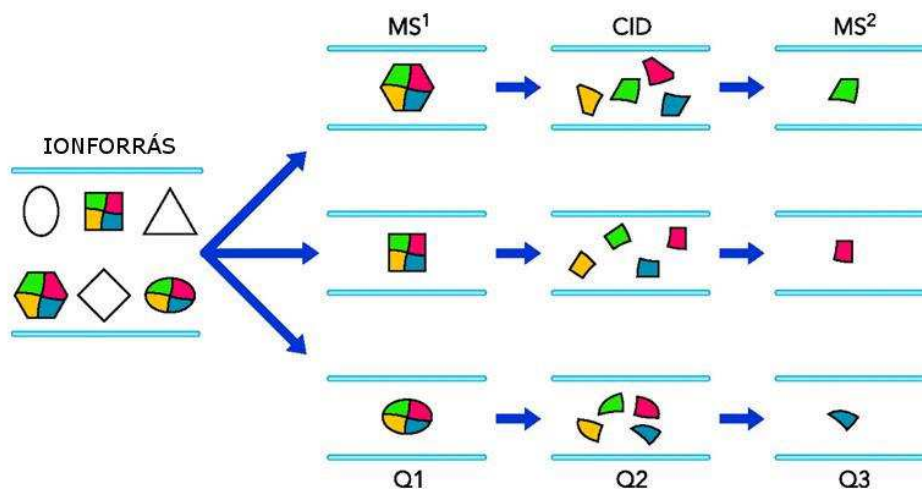


16. ábra A polifenolok elválasztására és meghatározására alkalmazott HPLC-PDA-MS/MS-készülék.

A hármas kvadrupóllal rendelkező tömegspektrométer lehetséges üzemmódjai közül az MRM (Multiple Reaction Monitoring – kiválasztott ionfolyamat követése) üzemmódot, illetve az összetett IDA funkciót (Information Dependent Acquisition – információfüggő analízis) (mely egy EMS (Enhanced MS) és azt követő EPI (Enhanced Product Ion) üzemmódot alkalmaz) használtam.

Az MRM üzemmód (**17. ábra**) elsősorban mennyiségi meghatározásra alkalmazható. Működése során az első kvadrupól „kiszűri” az adott, számunkra érdekes m/z értékkel

rendelkező iont (anyaion) úgy, hogy az attól eltérő m/z értékű ionok nem jutnak át a Q1 kvadrupólon (Q1: *park*).



17. ábra A kvadrupól analízátor MRM üzemmódja (Pisitkun et al., 2007).

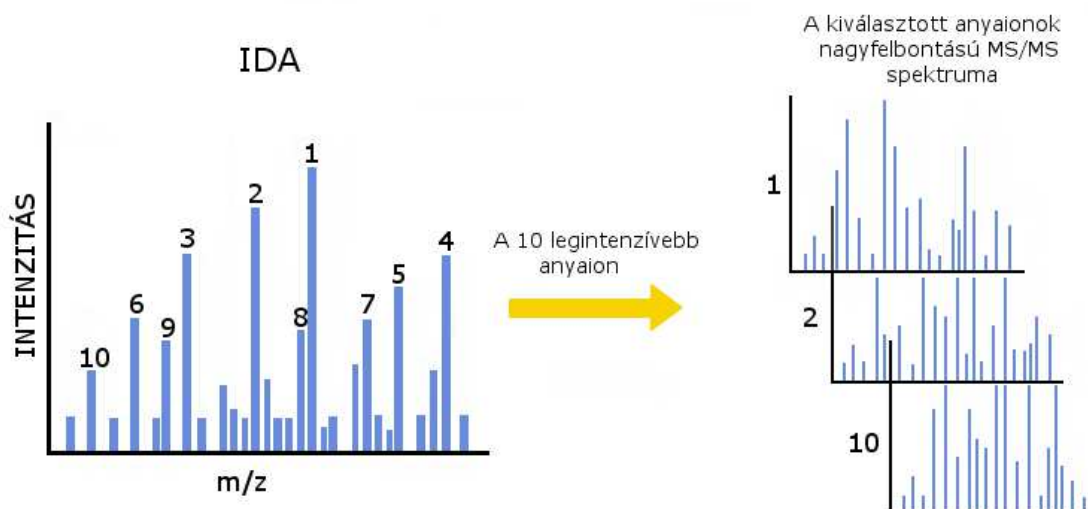
Rövidítések: **MS¹**:anyaion képződése, **CID**: collision-induced dissociation, ütközés hatására leányionok keletkeznek, **MS²**: leányionok meghatározott m/z értékkel jutnak a detektorba, **Q1**: első kvadrupól, **Q2**: második kvadrupól (ütközési cella), **Q3**: harmas kvadrupól.

Az ütközési cellában (Q2) gázbevezetés (pl. nitrogén) hatására bekövetkezik az anyaion fragmentációja, és létrejönnek az adott vegyületre jellemző leányionok. A képződött leányionok a harmadik analízátorba kerülnek, ahol csak a meghatározott m/z értékű, az anyaion fragmentációjára egyértelműen jellemző leányion jut tovább a detektorba (Q3: *park*).

Az MRM-mód dupla tömegszűrőként működik, képes drasztikusan csökkenteni a zaj szintjét, és növelni a meghatározás szelektivitását (Schreiber, 2010). A kiemelkedő szelektivitás azzal magyarázható, hogy annak ellenére, hogy több molekula is rendelkezhet azonos moláris tömeggel, annak a valószínűsége, hogy ezek a fragmentáció során ugyanolyan leányionokat képeznek, nagyon kicsi. Tehát ha az anyaion-leányion átmenetet határozzuk meg, akkor sokkal kisebb a lehetősége annak, hogy más vegyületet mérünk, mint amilyenre kíváncsiak vagyunk. Ezáltal a mérés sokkal érzékenyebb, mert sokkal nagyobb a jel/zaj aránya, és ezzel együtt a kimutatási határ is csökken (URL 16.). Ennek megfelelően az MRM üzemmódot mennyiségi meghatározásra használjuk. A gyakorlatban egy vegyületre legalább 2 MRM átmenetet figyelünk, ebből egyet a minőségi azonosításra (*qualifier*) a másikat a mennyiségi azonosításra (*quantifier*) használunk. A vegyület minőségi azonosításához természetesen a kromatográfias retenció adatokat is felhasználhatjuk.

Az IDA funkció alapja, hogy időbeni program alapján a legnagyobb intenzitással rendelkező anyaionok fragmentálódnak az ütközési cellában. Ennek az elve a **18. ábrán** látható. Egy IDA ciklus a következőképpen írható le: egy adott időpillanatban a tömegspektrométer Q1 tartományába jutó ionok feltérképezésre (survey scan) kerülnek (Q1: *scan*). Ebből a tömegspektrumból egy algoritmus kiválasztja a kívánt számú

legintenzívebb anyaiant. A következő időpillanatokban a Q1 tartomány a kiválasztott anyaiionokat egymás után rendre átengedi (*pass*), a Q2 fragmentálja, a Q3 tartományban pedig a leányionok, frgmentsek pásztázása történik meg (*dependent scan*). Megfelelő programozás esetén az összes kiválasztott anyaiionról részletes fragmentációs (MS^n) spektrum nyerhető, melyből a molekula szerkezetére vonatkozóan nyerhető információ (molekulatömeg, szerkezet, stb.). Természetesen a tömegspektrométer „gyorsasága”, a kromatográfiás csúcs szélessége és a vegyületek koncentrációja gátat szab az egy ciklusban (100-1000 msec) felvehető értékelhető fragmentációs spektrumok számának.



18. ábra Az IDA mérési mód elmélete (URL 17.).

Összefoglalás. A növényi szövetek antioxidáns paramétereinek meghatározására sokféle módszert dolgoztak ki, mivel a szövetekben lévő antioxidánsok is nagyon sokfélék. Ha egy kivonat átfogó antioxidáns kapacitását kívánjuk meghatározni, egyszerű, gyors és költséghatékony módon, akkor érdemes a szabad gyökök megkötésén alapuló spektrofotometriás módszereket választani. Ha azt is szeretnénk tudni, hogy milyen vegyületek tehetők ezekért a tulajdonságokért felelőssé, akkor más eszközökhöz is kell folyamodnunk, pl. a HPLC-PDA-MS/MS technikához.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásom elsődleges célja a Magyarországon előforduló legfontosabb erdei fajok leveléből és kérgéből készült kivonatok antioxidáns tulajdonságainak összehasonlító vizsgálata, valamint az antioxidáns hatásért felelős polifenolok minőségi és mennyiségi meghatározása volt. Fontosnak találtam meghatározni, hogy mely kivonatokban, milyen körülmények között mérhetők a legnagyobb értékek, így ennek segítségével a későbbiekben a kivonatok ipari alkalmazását is fontolóra lehet venni.

1. Első lépésként a mintavételi-, minta-előkészítési- és extrakciós eljárások összehasonlítását tűztem ki célul, azok optimalálásának érdekében.
2. Céлом volt a kiválasztott erdei fajokból vett levélminták antioxidáns paramétereinek összehasonlító vizsgálata a vegetációs időszak különböző pontjain, hogy megállapítsam, mikor rendelkeznek a legmagasabb antioxidáns kapacitással a levelek. Ennek érdekében hasonló elven működő, de más gyököt alkalmazó módszerekkel mértem az antioxidáns kapacitás értékeket, meghatároztam az összes polifenol-tartalmat, továbbá az összes flavonoid-tartalom és az összes flavan-3-ol-tartalmat. A fajokot úgy választottam ki, hogy legyen közöttük olyan, aminek antioxidáns kapacitására találni irodalmi példát, és olyan is, amit még nem vizsgáltak ebből a szempontból.
3. Célul tűztem ki a magyarországi, erdészeti és faipari szempontból is jelentős erdei fajok külső- és belső kérgének antioxidáns kapacitás értékeinek és polifenol tartalmainak összehasonlító vizsgálatát.
4. Céлом volt kiválasztott fajok és szövetek esetében (a kiválasztás szempontja vagy a nagy mennyiségben való előfordulás, vagy a kiemelkedő polifenol-tartalom és antioxidáns kapacitás értékek voltak) a polifenolos antioxidánsok elválasztása valamint tömegspektrometriás minőségi és mennyiségi vizsgálata HPLC-PDA-MS/MS technika segítségével.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérletek, mérések helye

A minta-előkészítést és az antioxidáns kapacitás méréseket a Soproni Egyetem Erdőmérnöki Kar Kémiai Intézetében, míg a HPLC-PDA-MS/MS-meghatározásokat a Természeti Erőforrások Kutató Központban végeztem.

4.2. Növényi minták és mintavétel, vizsgálatok ütemezése

4.2.1. Levélminták gyűjtése

A levélminták gyűjtése a Soproni Egyetem Élő Növénygyűjteménye (Botanikus Kert) területén történt. A vizsgált fajok egyedei ennek megfelelően ugyanolyan termőhelyi, környezeti paramétereknek voltak kitéve. Olyan fákat választottam, amelyek érett korúak és egészségesek voltak. Fajonként egy reprezentatív egyedről történt mindig a mintavétel. A leveleket a lombkorona 3-4 méteres magasságából, ugyanazokról az ágakról vettem, délelőtt 8-11 óra között. A lombhullató fák esetében fajonként és mintavételenként hozzávetőlegesen 15 árnyék- és 15 fénylevelet gyűjtöttem be. A tűlevelű fák esetében 3 ágvégnyi levelet vizsgáltam, ezek mennyiségét 300 db-ra becsültem. Megjegyzem, hogy a levelek darabszáma csak irányérték, hiszen az egyes fajok leveleinek a mérete rendkívül különböző lehet. Összességében 18-20 gramm mennyiségű levelet gyűjtöttem be mintavételenként (a mikrohullámú enzim inaktiválás vizsgálata során ennek a dupláját). Árnyéklevélnek azt tekintettem, amely levél a nap nagy részében nem kapott direkt napfényt, a fénylevelek pedig a nap jelentős részében közvetlen napsugárzásnak voltak kitéve. A begyűjtött fény- és árnyékleveleket homogenizáltam és egy reprezentatív mintának tekintettem. Ezekből a mintákból történtek a vizsgálatok, kivéve, amikor valamilyen okból egyéb más mintákat is vettem más időpontokban. A mintavétel körülményeinek standardizálásával igyekeztem a levelek antioxidáns tulajdonságait befolyásoló külső paraméterek hatásait, valamint a lombkorona inhomogenitásából adódó eltéréseket csökkenteni.

A levelek begyűjtése nejlon zacskókba történt, a lehető legtöbb levegő kizárásával. A mintákat hűtőtáskába gyűjtöttem, és feldolgozásig (kb. 1 óra) 4 °C-on tartottam őket. A *szezonális változás* vizsgálata (2014. május-szeptember) során a mintavétel a hónapok közel azonos napjain (egy-két nap eltéréssel) zajlott, így a mintavételek között 29-31 nap eltérés volt.

A *napon belüli változás* vizsgálata során (2014. július 7-én) a csertölgy esetében külön gyűjtöttem a fent megadott (18-20 grammnak megfelelő mennyiségű) fényleveleket, árnyékleveleket, és ezen kívül még ún. félárnyékos leveleket is, amelyek a napsütéses órák egyik felében kaptak napsugárzást, a nap másik felében pedig árnyékban voltak. A mintavételt a **7. táblázatnak** megfelelő időpontokban végeztem el egy napon belül, ügyelve arra, hogy az adott típusú levelet mindig a fának ugyanarról az ágairól vegyem.

Időpont	Benapozottság
7:00	Fénylevél Árnyéklevél Félárnyékos levél
10:00	
12:00	
15:00	
18:00	

7. táblázat Levélmintavétel a csertölgy esetében 2014. július 7-én.

4.2.2. Vizsgálatok levélmintákból

A 8. táblázatban láthatók a vizsgált fajok és a mintákból elvégzett vizsgálatok. Először a mikrohullámú enzim inaktiválás hatását vizsgáltam (2013. október. 4.-i mintavétel) a levélszövetek esetében. A fajonként 18-20 g-nak megfelelő levelet inaktiváltam 700 W-on 2 percig Ceni et al. (2009) munkáját alapul véve. A mikrohullámmal nem kezelt levelekből is készítettem extraktumokat. Ebben az esetben a mintavétel után a levelek 5 napig laborklímán (18 °C-on), sötétben száradtak a mikrohullámmal kezelt levelekkel együtt, az extrakció ezután történt meg.

Időpont	Faj	Latin név	Elvégzett vizsgálatok
2013. október 4.	Nagylevelű hárs	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	Mikrohullámú kezelés hatása Extraktanyag-tartalom Összes polifenol-tartalom Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS). Bükk levél kivonat HPLC-PDA- MS/MS vizsgálata
	Bükk	<i>Fagus sylvatica</i> L.	
	Keleti gyertyán	<i>Carpinus orientalis</i> Mill.	
	Szelídgesztenye	<i>Castanea sativa</i> Mill.	
	Vadgesztenye	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	
	Korai juhar	<i>Acer platanoides</i> L.	
	Hamvas éger	<i>Alnus incana</i> (L.) Moench.	
	Fehér akác	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	
	Molyhos tölgy	<i>Quercus pubescens</i> Willd.	
2014. május 9.	Magas kőris	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Oldószer optimálás Szezonális és napon belüli változás vizsgálata Extraktanyag-tartalom Összes polifenol-tartalom Összes flavonoid Összes flavan-3-ol Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS) Gyertyán kivonat komponenseinek HPLC-PDA- MS/MS elválasztása és azonosítása
	Bükk	<i>Fagus sylvatica</i> L.	
	Közönséges gyertyán	<i>Carpinus betulus</i> L.	
	Molyhos tölgy	<i>Quercus pubescens</i> Willd.	
	Nyár	<i>Populus x euramericana</i> Dode	
	Fehér akác	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	
	Korai juhar	<i>Acer platanoides</i> L.	
	Csertölgy	<i>Quercus cerris</i> L.	
	Szelídgesztenye	<i>Castanea sativa</i> Mill.	
	Kocsányos tölgy	<i>Quercus robur</i> L.	
	Kocsánytalan tölgy	<i>Quercus petraea</i> Liebl.	
	Erdeifenyő	<i>Pinus sylvestris</i> L.	
	Feketeifenyő	<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold	

8. Táblázat A levélvizsgálatokhoz felhasznált fajok és az elvégzett vizsgálatok.

A mikrohullámmal előkezelt és nem előkezelt bükk levél extraktumok esetében elvégeztem a polifenolok HPLC-PDA-MS/MS analízisét abból a célból, hogy megállapítsam, okoz-e a mikrohullámú inaktiválás valamilyen változást a polifenol profilban. A kezeletlen minta 5 napos szárítására azért volt szükség, hogy ugyanakkora egyensúlyi nedvességtartalma legyen a mikrohullámmal kezelt és a nem kezelt mintának,

nehogy az eltérő nedvességtartalom miatt adódjanak különbségek a csúcsterületekben a kromatográfiás elválasztás során.

Ezután a levélminták esetében már csak a mikrohullámmal inaktivált szövetekből készült extraktumokat vizsgáltam. 2014 májusában elvégeztem az extrakciós oldószer-összetétel hatásának vizsgálatát ultrahangos extrakciót alkalmazva. Ennek alapján meghatároztam melyik elegy a leghatékonyabb az antioxidánsok kivonására a vizsgált erdei fák levélszöveiteiből. Ezután a levelek antioxidáns paraméterei és fenolos vegyületei mennyiségének *szezonális változását* tanulmányoztam (2014. májustól-szeptemberig tartó időszakban). A kémiai paraméterek egy *napon belüli változásának* vizsgálatát a csertölgy esetében végeztem el a 2014. júliusi mintavétellel egybekötve a **7. táblázat** alapján. A vizsgálati sorozat végén a legjobb antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező kivonatokból elvégeztem a polifenolos antioxidánsok HPLC-PDA-MS/MS elválasztását és azonosítását.

4.2.3. Kéregminták gyűjtése

A mintákat a Soproni Tanulmányi Erdőgazdaság Zrt. Hegyvidéki Erdészetének állományából származó faegyedekről vettem. Mivel mindegyik fafaj példánya azonos mintaterületről származott, a klimatikus valamint egyéb környezeti hatások is hasonlóak voltak. A mintavétel során olyan fák kerültek kiválasztásra, amelyek érett korúak (mellmagassági törzsátmérőjük 30-50 cm) és egészségesek voltak. Mindegyik fafaj esetében egy reprezentatív törzsről vettem mintát, kivéve a bükköt, ahol összesen 3 törzs mintavételezését hajtottam végre. Minden faj esetében közvetlenül a döntés után történt a mintavétel. A kéreg lehántását 1,5 - 3 méter közti magasságból fejsze segítségével végeztem el, 5 kg mennyiségben (kivéve a bükk esetében, ahol 2 kg-nyi kérget gyűjtöttem be). A kéregmintákat azonnal a laborba vittem és megkezdtem a feldolgozást. Először a kérget szikével szétválasztottam hánásra és a héjkéregre. Ez alól a közönséges gyertyán és a bükk volt a kivétel, ugyanis e fafajok kérge legtöbbször túl vékony ahhoz, hogy ezt a két réteget precízen el lehessen választani (gyertyán) illetve a háncs jelentősen vastagabb, mint a rendkívül vékony héjkéreg (bükk). Ezért a gyertyán esetében az egész kéregmintát, a bükk esetében csak a háncsot vizsgáltam. A szétválasztott frakciókat kalapácsos darálóval daráltam, majd szitáltam és a 0,2-0,63 mm méretű szemcsefrakciót használtam fel a vizsgálataimhoz (kivéve a bükk minták esetében).

4.2.4. Vizsgálatok kéregmintákból

A **9. táblázatban** láthatók a mintavételi időpontok, a kéregvizsgálatokhoz felhasznált fafajok és a mintákból elvégzett vizsgálatok.

Az első mérések a bükk (*Fagus sylvatica* L.) kéregből történtek, a vizsgálatok célja az extrakciós módszer és oldószer optimálása volt bükk kéregre (2014. január – Optimálás I). A mintagyűjtés (2 kg) és előkészítés az előző fejezetben ismertetett módszerrel történt. A kéregmintákat ezután mikrohullámú kezelésnek vettem alá (250 g-os adagokat 700 W-on 2 percre), inaktiválva a polifenolokat oxidáló enzimeket (Makk et al., 2013), majd

1 napig levegőn, laborklímán (18 °C-on), sötétben szárítottam. A minták egy másik részét nem kezeltem mikrohullámú sugárzással, azt 2 napig szárítottam laborklímán (18 °C-on), sötétben. A kéregdarabokról a hánccsot ráspoly (8 grain) segítségével különítettem el, és a továbbiakban ezt vizsgáltam. A kapott szemcsék mérete összemérhető volt a többi kéregvizsgálat esetében kapott szitált (0,2-0,63 mm) frakciók szemcseméretével. Az extraktumok elkészítése rögtön ezután történt meg a mikrohullámmal inaktívált mintákból.

A mikrohullámmal előkezelt és nem előkezelt (csak 2 napig szárított) minták esetében azonos körülmények közt végeztem egy-egy extrakciót. Az extraktumokat HPLC-PDA-MS/MS eljárással vizsgáltam abból a célból, hogy megállapítsam, okoz-e a mikrohullámú inaktíválás valamilyen változást a bükk kéreg polifenol profiljában. A kezeletlen minta szárítására azért volt szükség, hogy ugyanakkora egyensúlyi nedvességtartalma legyen a mikrohullámmal kezelt és a nem kezelt mintának, nehogy az eltérő nedvességtartalom miatt adódjanak különbségek a csúcsterületekben a kromatográfiás elválasztás során.

Időpont	Faj	Latin név	Elvégzett vizsgálatok
2014. január	Bükk	<i>Fagus sylvatica</i> L.	Optimálás I. - Extrakciós módszer és oldószer
			Extraktanyag-tartalom
			Összes polifenol-tartalom
2014. február	Fehér nyár	<i>Populus alba</i> L.	Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)
			HPLC-PDA-MS/MS elválasztás, profilozás
			Optimálás II. - Mikrohullámú kezelés hatásának vizsgálata
2014. december	Fehér akác	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Extraktanyag-tartalom
			Összes polifenol-tartalom
			Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)
2014. december	Kocsánytalan tölgy	<i>Quercus petraea</i> Liebl.	Extraktanyag-tartalom
			Összes polifenol-tartalom
			Összes flavonoid-tartalom
2014. december	Fekete nyár	<i>Populus nigra</i> L.	Összes flavan-3-ol-tartalom
			Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)
			Extraktanyag-tartalom
2014. december	Közönséges nyír	<i>Betula pendula</i> Roth	Összes polifenol-tartalom
			Összes flavonoid-tartalom
			Összes flavan-3-ol-tartalom
2014. december	Vörösfenyő	<i>Larix decidua</i> Mill.	Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)
			Extraktanyag-tartalom
			Összes polifenol-tartalom
2014. december	Erdeifenyő	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Összes flavonoid-tartalom
			Összes flavan-3-ol-tartalom
			Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)
2014. december	Fekete cseresznye	<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	Extraktanyag-tartalom
			Összes polifenol-tartalom
			Összes flavonoid-tartalom
2014. december	Közönséges gyertyán	<i>Carpinus betulus</i> L.	Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)
			Extraktanyag-tartalom
			Összes polifenol-tartalom
2014. december	Szelídgesztenye	<i>Castanea sativa</i> Mill.	Összes flavonoid-tartalom
			Összes flavan-3-ol-tartalom
			Antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP, ABTS)

9. táblázat A kéregminták, és az azokból elvégzett vizsgálatok.

A 2014. februári mintavétel esetében a fő cél a mikrohullámú kezelés hatásának vizsgálata volt több fafaj esetében, az optimális extrakciós módszert alkalmazva. A vizsgált fafajok kérge döntés után a **19. ábrán** látható.



19. ábra Az akác, a fehér nyár, a kocsánytalan tölgy törzse (balról jobbra, sorrendben) döntés után 2014 februárjában.

A mintavétel és a kéregminták elkülönítése a korábban már ismertetett módszerek alapján történt. A minták egyik felét a már ismertetett eljárással mikrohullámú inaktiválásnak vettem alá, a másik felét laborklímán szárítottam a bükk kéreghez hasonlóan. Ezután a kéregmintákat ledaráltam, szitáltam, majd elkészítettem az extraktumokat.

A 2014. decemberi mintavétel esetében az optimális extrakciós módszerrel és oldószerrel, mikrohullámú inaktiválás nélkül, a kiválasztott magyarországi erdei fafajok kéreg extraktumaiból meghatároztam az antioxidáns kapacitás értékeket, valamint a fenolos vegyületek mennyiségét.

4.3. Felhasznált vegyszerek, reagensek

A kromatográfiás célra használt kétszer desztillált víz a Soproni Egyetem Erdőmérnöki Kar Kémiai Intézetében készült. A HPLC-minőségű metanol és LS-MS minőségű acetonitril a VWR-től (VWR International, Budapest, Magyarország) származott. A (+)-katechin, kvercetin, aszkorbinsav, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxilsav (trolox), ABTS, kálium-perszulfát, DPPH, 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), vas(III)-klorid, *p*-dimetil-amino-fahéjaldehid (DMACA), ecetsav, hangyasav, nátrium-acetát, kálium-acetát, sósav, kénsav, nátrium-karbonát, dikálium-hidrogén-foszfát és kálium-dihidrogén-foszfát a Sigma-Aldrichtől (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) került beszerzésre. A Folin-Ciocalteu-reagenst a Merck (Darmstadt, Németország) gyártotta.

4.4. A mérések során használt műszerek és eszközök

A mikrohullámú kezelés végrehajtása hagyományos háztartási mikrohullámú sütővel történt. A levélminták darálása háztartási kávédarálóval, a kéregminták darálása Retsch SK3 típusú kalapácsos daráló (Retsch GmbH, Haan, Németország) segítségével történt. Az extraktanyag-tartalom meghatározásához és a kéreg/levélminták szárításához szárítószekrényt használtam, melyet 70 °C-ra állítottam.

Az ultrahangos extrakcióhoz Elma Transsonic T570 (Elma Schmidbauer, Singen, Németország) ultrahangos fürdőt, a mágneses kevertetéshez IKA RO 15 P (IKA Werke, Staufen, Németország) típusú mágneses keverőt használtam. A mikrohullámmal segített extrakcióhoz a Michem MD6 A/C (Peking Michem Instrumentation, Peking, Kína) készüléket használtam. Ez a feltárási berendezés alkalmas összetett minták inert (teflon) edényzetben emelt nyomáson és hőmérsékleten megvalósítható extrakciójához vagy akár feltáráshoz is. A készülék mikrohullámú frekvenciája 2450 MHz, a programozható hőmérséklet-tartománya 0-300 °C. A maximális nyomás (mely a felfűtés hatására automatikusan képződik a mintatérben) 6 MPa.

A spektrofotometriás méréseket az U-1500-as spektrofotométeren végeztem el (Hitachi, Tokió, Japán). A polifenolos vegyületek elválasztását egy Shimadzu LC-20 típusú folyadékkromatográfal hajtottam végre, azonosításuk pedig Shimadzu SPD-

M20A (Shimadzu Corporation, Kyotó, Japán) típusú diódasoros detektorral és AB Sciex 3200 QTRAP hármas kvadрупól/lineáris ioncsapra tömegspektrométerrel (AB Sciex, Framingham, USA) történt.

4.5. Minták extrakciója

4.5.1. Levélminták extrakciója

A légszáraz/mikrohullámmal kezelt darált levelekből analitikai pontossággal 0,2 g-ot centrifugacsőbe/csiszolatoss Erlenmeyer-lombikba mértem. Hozzáadtam 20 ml oldószert (víz / metanol:víz 80:20 v/v% / etanol:víz 80:20 v/v%), majd mágneses kevertetés esetén 24 órán keresztül fénytől elzárva, szobahőmérsékleten kevertettem. Ultrahangos extrakció esetében ugyanilyen bemérési arányok mellett 2x10 percig ultrahangoztam, ügyelve arra, hogy az ultrahangos kádban lévő víz hőmérséklete ne emelkedjen 30 °C fölé. Az extrakció után a kivonatokat 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn szűrtem, sötétített barna üvegekbe töltöttem, és felhasználásig fagyasztoóban tároltam őket -20 °C-on.

4.5.2. Levelek extraktanyag-tartalmának meghatározása

Az elkészült kivonatokról műanyag bemérőcsőnekba pipettáztam 5,0 ml extraktumot, majd szárítószekrényben 70 °C-on szárítottam, amíg az oldószer teljes mennyisége el nem párologott (körülbelül 4-5 óra). Az extraktanyag értékét (mg/ml) a DPPH IC₅₀-érték kiszámításához használtam fel.

4.5.3. Levelek szárazanyag-tartalmának meghatározása

A levelek esetében nem végeztem külön szárazanyag-tartalom meghatározást, mivel egy kísérletben ezt elvégezve a mikrohullámmal kezelt és a légszáraz levelek szárazanyag-tartalma minden esetben 99% feletti volt.

4.5.4. Kéregminták extrakciója

Az előkészített kéregmintákról 0,15/0,20 g-ot mértem be analitikai pontossággal, majd 15/20 ml oldószert (víz / metanol:víz 80:20 v/v% / etanol:víz 80:20 v/v%) adtam hozzá.

Az első vizsgálati sorozatban, 2014. januárjában a **bükk kéreg** esetében többféle extrakciós módszert és oldószert alkalmaztam, hogy megtudjam, melyik módszer és oldószer a legalkalmasabb a kéregben található antioxidáns hatású vegyületek kinyerésére. Ennek során mágneses kevertetés esetében 2/5/24 órán keresztül fénytől elzárva, szobahőmérsékleten történt az extrakció. A mikrohullámmal segített extrakció esetében 10/20 percig 60 °C-on/80 °C-on/100 °C-on/120 °C-on történt az extraktum készítése. Ultrahangos extrakció esetében pedig 10/20/30 percig ultrahangoztam a mintákat szobahőmérsékleten. Oldószerként metanol:víz 80:20 v/v%, etanol:víz 80:20 v/v% elegyet és vizet alkalmaztam. Az extraktumokat 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn szűrtem, és sötétített barna üvegekbe töltöttem azokat. Felhasználásig fagyasztoóban tároltam őket -20 °C-on.

A második vizsgálati sorozatban, 2014 februárjában a **fehér nyár, akác és kocsánytalan tölgy** esetében a bükk kéregre kapott eredmények alapján ultrahangos módszerrel 20 perces extrakciós időt és metanol:víz 80:20 v/v% elegyet alkalmazva készítettem el a kivonatokat, amiket 0,45 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn szűrtem, és sötétített barna üvegekben -20 °C-on tároltam.

A harmadik vizsgálati sorozatban, 2014 decemberében a **fekete nyár, a közönséges nyír, a vörösfenyő, az erdeifenyő, a fekete cseresznye, a közönséges gyertyán és a szelídgesztenye** esetében szintén 20 percig ultrahangozva, metanol:víz 80:20 v/v% eleggyel készítettem el a kivonatokat. Ezután szűrtem, és felhasználásig fagyasztoóban tároltam azokat.

4.5.5. Kéregminták extraktanyag-tartalmának meghatározása

Az elkészült kivonatokból műanyag bemérőcsónakba pipettáztam 5,0 ml extraktumot, majd szárítószekrényben 70 °C-on szárítottam, amíg az oldószer teljes mennyisége el nem párologott (körülbelül 4-5 óra). Az extraktanyag értékét (mg/ml) a DPPH IC₅₀-érték kiszámításához használtam fel.

4.5.6. Kéregminták szárazanyag-tartalmának meghatározása

A 2013. decemberi és a 2014. februári mintavétel esetében a kezelt és nem kezelt minták laborklímán történő szárítását követően, a 2014. decemberi mintavétel során a mintavétel után történt a szárazanyag-tartalom meghatározás. A szárítószekrényben 105 ± 2 °C-on kiszárított és exszikkátorban lehűtött mérőedényt fedéllel együtt analitikai mérlegen lemértem (M), majd a felaprított mintából 5-10 g-ot bemértem és ismét lemértem a mérőedényt fedéllel együtt (A). Ezután a mintát szárítószekrénybe helyeztem, és 105 ± 2 °C-on 5-6 órán keresztül szárítottam. Miután exszikkátorban kihűlt, újra lemértem a mérőedényt és a fedelét (B). A szárazanyag-tartalmat a következő képlettel számítottam ki:

$$SZ\% = 100 - \frac{A - B}{A - M} \cdot 100$$

4.6. Vizsgálati módszerek

4.6.1. Antioxidáns kapacitás értékek meghatározása

4.6.1.1. *Folin-Ciocalteu-féle összes polifenol-tartalom*

Az összes polifenol-tartalmat Singleton és Rossi (1965) módszere alapján határoztam meg. 20 µl extraktumhoz 480 µl metanol:víz 80:20 v/v% elegyet, majd 2,5 ml Folin-reagenst, körülbelül 1 perc múlva 2 ml 0,7 M Na₂CO₃-oldatot adtam. Ezt pontosan 5 percig 50 °C-os vízfürdőbe helyeztem, majd hűtővízbe téve, lehűlés után 760 nm-en mértem a kék színű reakcióoldat abszorbanciáját spektrofotométerrel. Minden kivonatból 3 párhuzamos mérést hajtottam végre. A mennyiségi meghatározásához kvercetin használtam standard vegyületként. Az eredményeket mg kvercetin/g szárazanyagban (mg Q/g sz.a.) adtam meg. A szárazanyag (sz.a.) a levél/kéreg száraz tömegét jelenti. Az

irodalomban a Folin-Ciocalteu-féle összes polifenol-tartalmat a meghatározás elve alapján antioxidáns kapacitást mérő módszerként tartják számon, azonban az eredményeim ismertetésénél a többi összfenolos paraméterrel együtt tárgyalom, mert logikailag oda sorolható.

4.6.1.2. **ABTS-módszer**

Az ABTS-gyök elszíntelenedésén alapuló módszert Stratil et al. (2007) leírása alapján végeztem el. A meghatározás első lépéseként az ABTS-gyököt készítettem el a következőképpen: kálium-perszulfát- (125 mmol/l) és ABTS-oldat (7,0 mmol/l) 1:49 arányú elegyét 12 órára sötétben, szobahőmérsékleten állni hagytam, hogy a gyökképződés végbemenjen. Ezt követően a gyököt tartalmazó oldat abszorbanciáját pH 7,4 foszfát-pufferrel hígítva 0,650-re állítottam be. A kivonatokból 40 µl-t mértem be, hozzáadtam az ABTS-gyök oldatából 1960 µl-t -t és az oldat abszorbanciáját 734 nm-en 10 perc várakozási idő után mértem. A kalibrációs egyenes felvételéhez standard vegyületként troloxot használtam. Minden kivonat esetében 3 párhuzamos mérést hajtottam végre, és az eredményeket mg trolox/g szárazanyagban (mg T/g sz.a.) adtam meg. A szárazanyag (sz.a.) a levél/kéreg száraz tömegét jelenti.

4.6.1.3. **DPPH-módszer**

A DPPH-gyök elszíntelenedésén alapuló vizsgálatot Sharma és Bhat (2009) módszere nyomán végeztem el, apróbb módosításokat alkalmazva. 2090 µl metanolhoz adtam hozzá 900 µl metanolos DPPH-oldatot (2×10^{-4} M) és 10 µl növényi kivonatot. A reakciót sötétben kell elvégezni, ezért alufóliával letakarva, sötét helyen tartottam a reakcióelegyeket a mérés előtt 30 percen keresztül. Az elszíntelenedés mértékét az abszorbancia 515 nm-en történő meghatározásával állapítottam meg. A DPPH antioxidáns kapacitást IC_{50} -értékben (µg/ml) határoztam meg, ami azt jelenti, hogy ennyi µg extraktanyagnak kell lenni egy ml reakcióelegyben, hogy 50%-os inhibíció történjen a reakció során. Ennek számítása két lépésben történt meg:

$$I = \frac{100 \cdot (A_{DPPH} - A)}{A_{DPPH}}, \text{ ahol}$$

I: inhibíció mértéke (%)

A_{DPPH} : a DPPH-oldat maximális koncentrációjához tartozó abszorbancia

A: reakcióelegy abszorbanciája,

$$DPPH (IC_{50}) = \frac{1000 \cdot E \cdot V}{3000} \cdot \frac{50}{I}, \text{ ahol}$$

E: extraktanyag-tartalom (mg/ml)

V: reakcióelegybe mért kivonat mennyisége (µl)

3000: reakcióelegy végtérfogata (µl).

Minden kivonat esetében 3 párhuzamos mérést hajtottam végre.

A DPPH-méréseket nagyfokú odafigyeléssel kellett végeznem, ugyanis méréseim során gyakran előfordult, hogyha a reakcióelegy túl nagy mennyiségű mintát, túl sok antioxidánst tartalmazott, akkor a reakcióelegy szinte azonnal, vagy pár perc alatt sárga

lett. Ebben az esetben még volt antioxidáns a rendszerben, de már nem volt DPPH. Ennek érdekében, ha a reakcióelegy pillanatszerűen sárga lett, vagy abszorbanciája 0,2 alá csökkent, akkor hígítottam a mintát és újra elvégeztem a mérést úgy, hogy az inhibíció ne legyen 60%-nál magasabb.

4.6.1.4. *FRAP-módszer*

Ezzel az antioxidáns kapacitást meghatározó módszerrel a kivonatok Fe^{3+} - redukáló képességét határoztam meg Benzie és Strain (1996) nyomán. 10 μl növényi extraktumhoz 40 μl metanolt adtam, majd 1,5 ml FRAP-reagenst (ami 25 ml 300 mM-os, 3,6-os pH-jú acetát puffer, 2,5 ml 20 mM-os FeCl_3 -oldat, és 2,5 ml 10 mM-os TPTZ-oldat elegye). A reakcióidő 5 perc volt, és az oldat abszorbanciáját 593 nm-en mértem. Standard vegyületként aszkorbinsavat alkalmaztam. A FRAP-mérések esetében egy kivonatból négy párhuzamos mérést hajtottam végre (a mérési módszer nagyobb szórása miatt), az eredményeket mg aszkorbinsav/g szárazanyagban (mg AS/g sz.a.) adtam meg. A szárazanyag (sz.a.) a levél/kéreg száraz tömegét jelenti.

4.6.2. **Összes flavonoid-tartalom meghatározása**

Méréseimnél a Kalita et al. (2013) által leírt módszert alkalmaztam. A reakcióelegyet az irodalmi referenciamunka alapján állítottam össze, vagyis 0,5 ml növényi kivonathoz 1,5 ml metanolt, 0,1 ml 1%-os AlCl_3 -oldatot, 0,1 ml 1 M-os kálium-acetát-oldatot és 2,8 ml desztillált vizet adtam. Annak érdekében, hogy extraktum színének reakcióelegy abszorbanciájára gyakorolt hatását kiküszöböljem, minden extraktum esetében készítettem mintavakot is, az AlCl_3 - és a kálium-acetát oldat desztillált vízzel történő helyettesítésével, majd az így kapott abszorbanciát kivontam a reakcióelegy abszorbanciájából. A reakcióelegy homogenizálását követően az abszorbanciát 415 nm-en mértem. A kalibrációs egyenes felvételéhez kvercetint alkalmaztam. Minden kivonatból 3 párhuzamos mérést végeztem, és az eredményeket mg kvercetin/g szárazanyagban (mg Q/g sz.a.) adtam meg. A szárazanyag (sz.a.) a levél/kéreg száraz tömegét jelenti.

4.6.3. **Összes flavan-3-ol-tartalom meghatározása**

Az összes flavan-3-ol-tartalom meghatározása Treutter (1989) munkája alapján történt. A mérésekhez (+)-katechint használtam standardként. A DMAC-reagenst a mérés napján frissen készítettem a következőképpen: 1,0%-os DMAC-oldatot készítettem, ahol a DMAC-t metanol és 3 M-os H_2SO_4 1:1 arányú elegyében oldottam fel. Az elkészült reagenst felhasználásig és a 20 perces inkubálási idő alatt fénytől védve fagyasztoóban tároltam.

A reakcióoldat összeállítása során 20 μl növényi kivonathoz 2350 μl metanolt és 100 μl DMAC-reagenst adtam, szobahőmérsékleten ($\sim 20^\circ\text{C}$ -on) fénytől védve tartottam 20 percig, majd spektrofotométeren mértem az oldat abszorbanciáját 640 nm-en. Ennél a meghatározásnál is három párhuzamos mérést végeztem el, és az eredményeket mg

katechin/ g szárazanyagban (mg C/g sz.a.) adtam meg. A szárazanyag (sz.a.) a levél/kéreg száraz tömegét jelenti.

4.6.4. Polifenolos vegyületek HPLC-PDA-MS/MS elválasztása és azonosítása

4.6.4.1. Közös gyertyán levélextraktum

A közös gyertyán levél-extraktum HPLC elválasztása során állófázisként Phenomenex Luna C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm-es szemcseméretű töltettel rendelkező oszlopot használtam, mely elé egy Phenomenex SecurityGuard ULTRA LC előtétoszlopot csatoltam. Az állófázis 40 °C-ra termosztált térben volt elhelyezve. Mozgófázisként **A** (víz + 0,1% hangyasav) és **B** (acetonitril+ 0,1% hangyasav) elegyét használtam. Az áramlási sebesség 1,2 ml/min, az injektált térfogat 8 µl volt. A gradiens elúció programja a **10. táblázatban** látható.

A diódasoros detektálás tartományát 250-380 nm-közöttire állítottam, a tömegspektrométeres detektálásnál az ionizáció negatív elektroporlasztásos módon történt. Az elválasztás során a mozgófázis térfogatárama 1,2 ml/min volt, a tömegspektrométer felé split áramlással jutott tovább a minta (0,6 ml/min), amit egy osztószelep segítségével állítottam be.

Idő (min)	A %	B %
0-4	97	3
5-22	95	5
23-45	85	15
46-83	43	57
84-90	0	100
91-98	0	100
99-106	97	3

10. táblázat Gradiens elúció programja a gyertyán levélextraktum elválasztása során.

A polifenolok **minőségi azonosítása** az IDA (Information Dependent Analysis) analízis segítségével történt, ami időbeni programozást és a tömegspektrométer ionsapdját használja fel az automata on-line MS/MS detektáláshoz. A tömegspektrométer ionforrásának beállításait a **11. táblázat** tartalmazza. Az adatok begyűjtése és kiértékelése az Analyst 1.6.1 szoftver segítségével történt. Az MS/MS spektrumok kiértékelése a RIKEN tandem MS spektrum adatbázisa (Sawada et al., 2012), a MassBank adatbázisa (URL 18.), az irodalomban talált eredmények, valamint fragmentációs szabályok alapján (Újszász és Frigyes, 2003) történt.

A tömegspektrométer beállításai	
Ionforrás hőmérséklete	500 °C
Függőgáz (N ₂) nyomása	40 psi
Száritógáz (N ₂) nyomása	30 psi
Porlasztógáz (N ₂) nyomása	30 psi
Kapilláris feszültség	-4500 V
Q1 tartomány (survey scan)	150 - 1300 m/z
Q3 tartomány (dep. scan)	80 - 1300 m/z

11. táblázat A tömegspektrométer beállításai a gyertyán levélextraktum vizsgálata során.

4.6.4.2. *Bükk kéregextraktum*

A bükk kéreg-extraktumának HPLC elválasztása során állófázisként Phenomenex Kinetex C18, 150 mm x 4,6 mm, 2,6 μ m-es szemcseméretű, héjszerkezetű töltettel rendelkező oszlopot használtam, mely elé egy Phenomenex SecurityGuard ULTRA LC előtétoszlopot csatoltam. Az állófázis 40 °C-ra termosztált térben volt elhelyezve.

Mozgófázisként **A** (víz + 0,1% hangyasav) és **B** (acetonitril+ 0,1% hangyasav) elegyét használtam. Az áramlási sebesség 1,2 ml/min, az injektált térfogat 8 μ l volt. A gradiens elúció programja a **12. táblázatban** látható.

A diódasoros detektálás tartományát 250-380 nm közöttire állítottam. A tömegspektrométer ionforrásába szintén split áramlással jutott a minta.

Idő (min)	A %	B %
0-1	90	10
2-13	85	15
14-23	38	62
24-29	0	100
30-36	90	10

12. táblázat Gradiens elúció programja a bükk kéregextraktum elválasztása során.

A tömegspektrométeres detektáláshoz negatív elektroporlasztásos ionizációt alkalmaztam. Az elválasztás során a mozgófázis térfogatárama 1,2 ml/min volt, a tömegspektrométer felé split áramlással jutott tovább a minta (0,6 ml/min), amit egy osztószelep segítségével állítottam be.

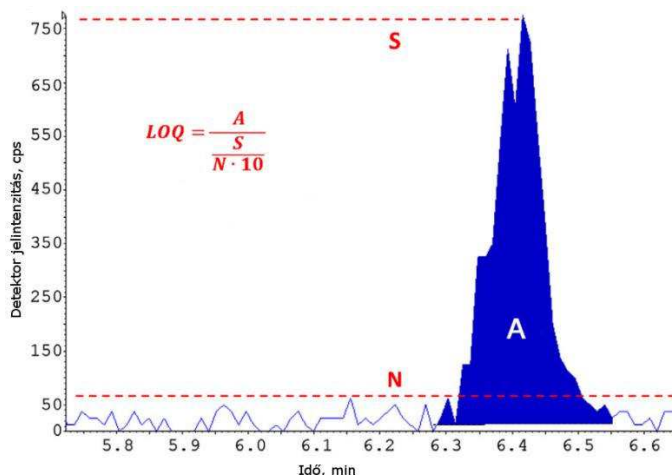
A polifenolok **minőségi azonosítása** szintén az IDA (Information Dependent Analysis) analízis segítségével történt, a tömegspektrométer ionforrásának beállításai a **13. táblázatban** láthatók. Az adatok begyűjtése és kiértékelése az Analyst 1.6.1 szoftver segítségével történt. Az MS/MS spektrumok kiértékelése a gyertyán levél-extraktumához hasonlóan történt.

A tömegspektrométer beállításai	
Ionforrás hőmérséklete	500 °C
Függőnygáz (N ₂) nyomása	40 psi
Szárítógáz (N ₂) nyomása	30 psi
Porlasztógáz (N ₂) nyomása	30 psi
Kapilláris feszültség	-4500 V
Q1 tartomány (survey scan)	170 - 1100 m/z
Q3 tartomány (dep. scan)	50 - 1100 m/z

13. táblázat A tömegspektrométer beállításai a bükk kéregextraktum vizsgálata során.

A **menyiségi meghatározás** az MRM-vizsgálat során kapott csúcs alatti területek segítségével történt, minden extraktumból három párhuzamos mérést végeztem. Azért választottam ezt a módszert, mert a (+)-katechin és (–)-epikatechin kivételével nem álltak rendelkezésre standard vegyületek, továbbá az UV-kromatogramon több komponens is azonos retenciós idővel jelent meg, így a kromatogramon lévő csúcs alatti területek nem szolgáltatnak egyértelmű mennyiségi információt. Az MRM vizsgálat során kapott csúcs alatti területek kiértékelésével a különböző módszerekkel kapott extraktumok összetételét tudtam összehasonlítani, a vegyületek abszolút koncentrációjának meghatározása nélkül.

A jellegzetes MRM átmenetek meghatározása úgy történt, hogy a bükk extraktumot közvetlenül az MS detektorba juttattam fecskendő infúzió segítségével, majd mindegyik, a minőségi azonosítás során meghatározott anyai m/z értékére elvégeztem az MRM optimalizálást. A mennyiségi meghatározás alsó határát (LOQ = lower limit of quantitation) a **20. ábrán** feltüntetett módon számoltam ki.



20. ábra A jel/zaj arány, és az LOQ kiszámítása egy adott MRM átmenet esetében. **Rövidítések:** A: csúcs alatti terület, S: jelintenzitás, N: zajintenzitás.

A tömegspektrométer komponens-függő beállításai (MRM átmenetek, illetve feszültségértékek) melyeket az MRM relatív mennyiségi meghatározáshoz használtam a **VIII. Mellékletben** találhatók. Vegyületenként csak egy MRM átmenetet figyeltem, mivel a tömegspektrométer beállításai csak ezt tették lehetővé, az így is rövid MRM-csatornánkénti figyelési idő (80 msec) miatt. Mivel csak *quantifier* MRM átmenetet figyeltem és *qualifier* MRM átmenetet nem, ezért a retenciós idők azonosságát kísértem figyelemmel annak megerősítésére, hogy ténylegesen a meghatározandó minta eluálódik-e abban az időtartományban, amelyben a megfelelő MRM kvantitálást végzem.

4.7. Statisztikai elemzések

A táblázatokban feltüntetett eredmények a párhuzamos mérések átlagait és a szórást tartalmazzák. A mérési adatokból az eredmények kiszámítása a Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, USA) programmal történt. Az egyszempontos varianciánálízist (ANOVA), a szignifikancia-vizsgálathoz a Tukey HSD tesztet (különböző p értékekkel) a Statistica 11 program (Statsoft Inc, Tulsa, USA) segítségével végeztem el. Ahhoz, hogy az ANOVA vizsgálat követelményei teljesüljenek, a mérési eredmények normáloszlásának vizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov-próbával hajtottam végre, illetve a varianciák homogenitását a Bartlett Chi-négyzet teszttel ellenőriztem.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Mielőtt a kapott eredményeket értékelném, szeretném összefoglalni, hogy milyen vizsgálatokat végeztem el.

A levél- és kéreganalízisek esetében is optimalám a minta-előkészítést. Ennek első lépéseként mindkét növényi rész esetében megvizsgáltam, hogy milyen hatása van a növényi szövetek mikrohullámú előkezelésének a kivonatok antioxidáns kapacitására és polifenolos összetételére. Ezután a kivonatok elkészítésének különböző lehetőségeit (extrakciós módszerek, és oldószerek megválasztása) vizsgáltam, melynek eredményeként olyan extrakciós körülményeket választottam ki, melyek lehetőséget biztosítanak a vizsgált fajok levél- és kéreg antioxidánsainak hatékony kinyerésére, mennyiségük összehasonlító vizsgálatára.

A *kéregminták* esetében az extrakció-optimalást bükkre végeztem el. A közönséges (laboratóriumi) körülmények közt leggyorsabb extrakciós módszert (ultrahangos extrakciót) alkalmaztam a továbbiakban az összes kéreg- és levélmintára. Ezután meghatároztam a vizsgált fafajok hancs- és héjkéreg szöveiben az antioxidáns paramétereket és az eredményeket egy pontrendszer segítségével kiértékeltem.

A *levélminták* esetében egy kiválasztott fafajra (csertölggy) vizsgáltam az antioxidáns paraméterek napon belüli változását a lombkorona három kiválasztott részén, hogy megtudjam, a napszak mely részében és honnan érdemes reprezentatív, a fajra és egyedre jellemző mintát venni. Ezután 12 kiválasztott fafaj esetében megvizsgáltam a fenolos vegyületek és antioxidáns kapacitások szezonális változását, az eredményeket összesítve egy pontrendszer segítségével megállapítottam a fajok közti rangsort.

Vizsgálataim kiegészítéseképpen a közönséges gyertyán levél- és a bükk kéreg extraktumából elválasztottam és azonosítottam a polifenolos komponenseket HPLC-PDA-MS/MS technikával.

5.1. Levélvizsgálatok

5.1.1. A minta-előkészítés és a mintavétel optimalása

5.1.1.1. A mikrohullámú kezelés hatása

Gyümölcsök és egyéb növények esetében több példát is találunk a mikrohullámú kezelés alkalmazására (Irfan et al. (1998); Huang et al. (2007); Chávez-Reyes et al. (2013)), a peroxidáz – és polifenol-oxidáz enzimek inaktiválására, de erdei fák leveleinek vizsgálatánál ismereteim szerint a kutatók ennek a kezelésnek a hatását nem tanulmányozták. Ennek megfelelően az első levélvizsgálatok során (2013. októberben) párhuzamos minta-előkészítést alkalmaztam, hogy megtudjam, milyen hatása van az antioxidáns-tartalomra annak, ha a polifenolokat oxidáló enzimeket inaktíválom. Ennek során a levelek egy részét mikrohullámmal kezeltem, a másik felét pedig laborklímán szárítottam. A mintákat metanol: víz 80:20 v/v% eleggyel, mágneses kevertetési módszerrel extraháltam. A vizsgálat célja az volt, hogy összehasonlítsam a

mikrohullámmal kezelt és utána szárított, valamint a csak szárított levelek antioxidáns tulajdonságait. Nemcsak iparilag fontos, hanem még nem vizsgált fajok (molyhos tölgy, keleti gyertyán) leveleit is vizsgáltam (**8. táblázat**). Ezekből a levelekből az összes polifenol-tartalmakat, és az antioxidáns kapacitásokat (DPPH- és FRAP-módszerrel) határoztam meg. Az eredmények a **14. táblázatban** láthatók.

A legmagasabb összes polifenol-tartalmat a keleti gyertyán esetében mértem. Jelentős értékekkel rendelkezett még a szelídgesztenye és a molyhos tölgy kivonata, míg közepes eredményeket a bükk, a vadgesztenye, a hamvas éger, az akác és a magas kőris mutatott. A legalacsonyabb polifenol-tartalma a nagylevelű hárs kivonatának volt. A polifenol-tartalom eredmények alapján a mikrohullámú kezelés polifenol-tartalom növelő hatással bír a bükk, a szelídgesztenye, a hamvas éger, az akác, a molyhos tölgy és a magas kőris esetében a légszáraz levelekhez képest.

Fafaj	Összes polifenol (mg Q/g sz.a.)	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	FRAP (mg AS/g sz.a.)
Nagylevelű hárs, M	19,4 ± 0,84 ^{A α}	85,8 ± 5,28 ^{H α}	14,5 ± 0,36 ^{A β}
Nagylevelű hárs	18,6 ± 0,73 ^{a α}	136 ± 5,51 ^{e β}	12,8 ± 0,90 ^{a α}
Bükk, M	37,9 ± 0,78 ^{CD β}	39,5 ± 3,42 ^{EF α}	31,8 ± 1,47 ^{D β}
Bükk	31,4 ± 1,58 ^{c α}	47,0 ± 0,56 ^{c α}	24,5 ± 0,44 ^{bcd α}
Keleti gyertyán, M	63,7 ± 3,10 ^{F α}	13,2 ± 0,60 ^{AB α}	63,7 ± 3,15 ^{F β}
Keleti gyertyán	60,7 ± 2,99 ^{f α}	12,7 ± 0,41 ^{a α}	58,6 ± 1,84 ^{f α}
Szelídgesztenye, M	50,2 ± 7,41 ^{E β}	15,3 ± 1,56 ^{AB α}	61,5 ± 1,79 ^{F β}
Szelídgesztenye	42,7 ± 0,76 ^{d α}	14,1 ± 0,67 ^{a α}	49,2 ± 1,74 ^{c α}
Vadgesztenye, M	42,6 ± 1,40 ^{D α}	48,4 ± 6,77 ^{FG α}	29,3 ± 1,38 ^{CD β}
Vadgesztenye	39,3 ± 1,59 ^{d α}	36,1 ± 2,47 ^{b α}	26,4 ± 1,00 ^{cd α}
Korai juhar, M	27,0 ± 1,85 ^{B α}	35,3 ± 3,00 ^{DE α}	26,9 ± 0,58 ^{C β}
Korai juhar	23,8 ± 1,60 ^{b α}	36,1 ± 5,3 ^{b α}	23,3 ± 1,03 ^{bc α}
Hamvas éger, M	40,7 ± 2,58 ^{D β}	29,4 ± 2,77 ^{CD α}	42,7 ± 1,46 ^{E β}
Hamvas éger,	29,6 ± 1,50 ^{c α}	46,2 ± 2,44 ^{c β}	27,5 ± 1,62 ^{d α}
Akác, M	41,9 ± 3,27 ^{D β}	20,8 ± 1,33 ^{BC α}	21,4 ± 1,15 ^{B β}
Akác	22,6 ± 0,35 ^{ab α}	52,9 ± 1,63 ^{c β}	14,1 ± 1,03 ^{a α}
Molyhos tölgy, M	57,6 ± 2,77 ^{F β}	10,0 ± 0,35 ^{A α}	63,3 ± 2,55 ^{F α}
Molyhos tölgy	49,9 ± 1,60 ^{e α}	11,0 ± 1,01 ^{a α}	62,3 ± 2,05 ^{g α}
Magas kőris, M	33,7 ± 1,51 ^{C β}	50,8 ± 3,49 ^{G α}	26,1 ± 0,69 ^{C β}
Magas kőris	23,1 ± 1,57 ^{ab α}	95,8 ± 0,9 ^{d β}	22,0 ± 0,39 ^{b α}

14. táblázat A mikrohullámú kezelés hatása a levelek összes polifenol-tartalmára és antioxidáns kapacitására. Az eredmények átlag ± szórás értékkel vannak feltüntetve. A módszereken belül a felső indexben lévő eltérő betűk (nagybetű: mikrohullámmal kezelt (M) minták között, kisbetű: mikrohullámmal nem kezelt minták között), és egy fajon belül a felső indexben lévő görög betűk (kezelt és nem kezelt minták között) szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten.

A DPPH esetében a legkisebb inhibíció a nagylevelű hársra volt jellemző. A vadgesztenye, a magas kőris és a bükk kivonata is nagyobb IC₅₀-értéket mutatott, ez kisebb antioxidáns kapacitást jelent. A legnagyobb DPPH-féle antioxidáns kapacitással az összes polifenol-tartalomhoz hasonlóan a keleti gyertyán rendelkezett, ezenkívül a szelídgesztenye és a molyhos tölgy is jól teljesített, a többi fajnál közepes értékeket mértem. Ennél a módszernél a nagylevelű hárs, a hamvas éger, a magas kőris és az akác

esetében látható, hogy a mikrohullámmal nem kezelt levelek magasabb IC₅₀-értékkel, vagyis kisebb antioxidáns kapacitással rendelkeznek, mint a kezelt levelek, a többi fajnál nincs szignifikáns különbség.

A FRAP módszer esetében a legmagasabb antioxidáns kapacitást szintén a keleti gyertyán esetében mértem, valamint a szelídgesztenye és a molyhos tölgy leveléből készült kivonatok is jelentős antioxidáns kapacitással rendelkeztek. A leggyengébb vasredukáló-képességet a nagylevelű hárs mutatta, de az akác és a magas kőris is kisebb értékekkel rendelkezett a többi fajhoz képest. Ennél a módszernél egyértelműen megmutatkozik a mikrohullámú kezelés kedvező hatása: a molyhos tölgy kivételével a nem kezelt leveleknél alacsonyabb antioxidáns kapacitás mérhető.

A mikrohullámú kezelés az antioxidáns hatású vegyületek levegő hatására bekövetkező enzimatis oxidációja ellen azért hatékony, mert a kezelés során a polifenolokat oxidáló enzimek fehérje része denaturálódik, így oxidáló képességük megszűnik (Pinelo et al., 2006).

A mikrohullámú kezelés mellett az irodalomban többféle módszert is alkalmaznak az enzimek inaktiválására, például hagyományos melegítést. Irfan et al. (1998) ezt azért nem találták olyan hatékonynak, mert a melegítéssel az anyag külső felületének hőmérséklete emelkedik meg, míg a mélyebb rétegek, ahol az enzimek találhatóak, alacsonyabb hőmérsékletűek maradnak, és nem biztos, hogy eléri azt a hőfokot, ami az inaktiválásukhoz szükséges. Makk et al. (2013) hasonló következtetésre jutottak tölgyfa kéreg peroxidáz- és polifenol-oxidáz enzimjeinek inaktiválása során, melyet szárítószekrényben (105-110 °C-on) végeztek.

Bükk levél esetében a mikrohullámmal kezelt és nem kezelt (5 napig levegőn, sötétben szárított) minták kivonatainak polifenol profilját is meghatároztam HPLC-PDA-MS/MS eljárással annak ellenőrzésére, hogy kimutathatók-e degradációs termékek (ld. **IV. Melléklet**). Megállapítottam, hogy a kromatogramok összhangban vannak a **14. táblázat** eredményeivel, miszerint a polifenolos vegyületek mennyisége magasabb a kezelt mintákban. Annak eldöntése, hogy ez nem csak a mikrohullámú sugárzás enzim inaktiváló hatásának az eredménye, hanem a sugárzás következtében felszabaduló többlet polifenolokat is magában foglalja, további kutatásokat igényel (szükséges lenne az eredmények összevetése folyékony nitrogénben tárolt vagy liofilizált friss levélminták extraktumának folyadékkromatográfiás polifenol profiljával).

Mivel a legtöbb vizsgált fafaj esetében a mikrohullámmal kezelt levelek magasabb polifenol-tartalmat és jobb antioxidáns kapacitást mutattak (illetve nem mutattak rosszabbat a kezelt levelek a nem kezelt leveleknél, egyes fajoknál, pl.: bükk, keleti gyertyán, korai juhar), egyértelmű a mikrohullámú enzim-inaktiválás kedvező hatása a vizsgált erdei fafajok levél antioxidánsainak hatékony megőrzésére. Ezért a további levélvizsgálatok esetében már csak a mikrohullámmal inaktivált levelekből készített kivonatokot vizsgáltam.

5.1.1.2. *Extrakciós oldószer optimalása*

Vizsgálatom célja az volt, hogy megtaláljam azt az ideális oldószerkeletet, amelynek segítségével a lombhullató és örökzöld fák levélmintáiból a legtöbb antioxidáns hatású vegyület kinyerhető, figyelembe véve a gazdaságossági szempontokat és az extraktumok további analíziseit is.

Ezt a kísérletsorozatot a 2014 májusában vett 12 fafaj esetében végeztem el, ezek közül 10 lombhullató (bükk, közönséges gyertyán, molyhos tölgy, nyár, akác, korai juhar, csertölgy, szelídgesztenye, kocsányos tölgy kocsánytalan tölgy) és 2 örökzöld (erdeifenyő és feketefenyő) faj volt. A falevelek mikrohullámú előkezelése után minden növényi mintából 3-féle kivonatot készítettem (metanol:víz 80:20 v/v%, etanol víz 80:20 v/v%, és víz segítségével). A vizsgálatokhoz ultrahangos extrakciót (2x10 perc) alkalmaztam, melyről a fakéreg minták esetében már megállapítottam, hogy szobahőmérsékleten és közönséges laboratóriumi körülmények között a leggyorsabban és leghatékonyabban vonja ki a vizsgált antioxidánsokat. Minden kivonatból meghatároztam az összes polifenol tartalmat, a 3-féle antioxidáns kapacitás értéket (DPPH, FRAP, ABTS), valamint az összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalmat. Az ebből a mérési sorozatból származó eredményeket a **15. táblázatban** tüntettem fel. Minden fafaj esetében külön varianciaanalízist végeztem ($p < 0,05$ szinten) az egyes paramétereknél.

Ha a polifenol-mérés értékeit megvizsgáljuk, azt láthatjuk, hogy minden fafaj esetében a leghatékonyabb oldószerek a szerves elegyek voltak, míg a víz kevésbé volt eredményes. Egy kivétel van ez alól, mégpedig a közönséges gyertyán, ahol a legnagyobb összes polifenol-tartalom a vizes extraktum esetében volt mérhető. Ez magyarázható azzal, hogy a gyertyán levelében nagy mennyiségű hidrolizálható tannin található (Hofmann et al., 2016), ami vízzel nagyobb mértékben kioldható a növényi részekből (ld. 5.1.3.2. fejezet).

A többi mérési paraméternél az összes polifenol-tartalomhoz hasonló tendencia jellemző, vagyis a szerves oldószerek hatékonyabbak, mint a tiszta víz. Ettől egy-egy eltérő eredményt találunk, pl. a molyhos tölgy esetében a DPPH, és FRAP antioxidáns kapacitás értéke a víz esetében statisztikai szempontból ugyanakkora, mint a metanolos extrakcióval kapott érték, vagyis a molyhos tölgy esetében a víz ugyanolyan hatékonyságú az antioxidáns vegyületek kinyerése szempontjából, mint a metanol:víz 80:20 v/v%. Az ABTS antioxidáns kapacitás és összes flavonoid-tartalom esetében egyértelműen a szerves oldószerek oldották ki a legtöbb antioxidáns hatású anyagot.

Az összes flavan-3-ol-tartalom esetében csak a bükk, nyár, akác, kocsányos és kocsánytalan tölgy esetben kaptam értékelhető eredményt a vizes kivonatoknál. Ennek az oka, hogy a flavan-3-olok közé a (+)-katechin, (–)-epikatechin, ezek dimerjei, és oligomerjei tartoznak (Ossipov et al., 1997), és ezek a vegyületek rosszul oldódnak vízben. Ez alól kivételt csak az akác jelent, amelynél a vizes kivonatok flavan-3-ol-tartalma magasabb, mint a szerves oldószerek esetében.

Fafaj	Extrahálószer	Össz. polifenol (mg Q/g sz.a.)	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	ABTS (mg T/g sz.a.)	FRAP (mg AS/ g sz.a.)	Összes flavonoid (mg Q/g sz.a.)	Összes flavan-3-ol (mg C/g sz.a.)
Bükk	metanol:víz 80:20 v/v%	37,8 ± 1,01 ^b	10,5 ± 1,25 ^a	119 ± 6,64 ^b	30,3 ± 1,60 ^b	4,34 ± 0,07 ^b	12,4 ± 0,40 ^b
	etanol:víz 80:20 v/v%	39,7 ± 1,33 ^b	11,4 ± 0,53 ^{ab}	112 ± 2,61 ^b	31,1 ± 2,15 ^b	6,41 ± 0,11 ^c	12,1 ± 0,25 ^b
	víz	23,7 ± 1,09 ^a	13,6 ± 1,28 ^b	76,3 ± 2,34 ^a	22,5 ± 1,57 ^a	2,84 ± 0,10 ^a	1,53 ± 0,03 ^a
Közönséges gyertyán	metanol:víz 80:20 v/v%	78,8 ± 0,59 ^a	6,87 ± 0,39 ^a	330 ± 23,9 ^c	78,8 ± 3,05 ^b	11,1 ± 0,52 ^c	0,47 ± 0,02 ^a
	etanol:víz 80:20 v/v%	76,8 ± 2,07 ^a	6,36 ± 0,45 ^a	262 ± 15,9 ^b	71,4 ± 3,88 ^b	8,18 ± 0,64 ^b	0,55 ± 0,01 ^b
	víz	88,1 ± 1,11 ^b	11,2 ± 0,30 ^b	109 ± 13,0 ^a	53,0 ± 4,98 ^a	4,49 ± 0,24 ^a	n.k.
Molyhos tölgy	metanol:víz 80:20 v/v%	37,5 ± 0,54 ^b	8,16 ± 1,49 ^a	158 ± 6,29 ^b	48,9 ± 2,20 ^b	3,80 ± 0,31 ^b	0,52 ± 0,01 ^a
	etanol:víz 80:20 v/v%	29,3 ± 1,07 ^a	10,3 ± 0,50 ^a	128 ± 3,61 ^a	39,7 ± 2,61 ^a	3,14 ± 0,34 ^b	0,54 ± 0,02 ^a
	víz	30,8 ± 0,81 ^a	8,48 ± 0,21 ^a	138 ± 5,00 ^a	47,2 ± 3,12 ^b	1,82 ± 0,25 ^a	n.k.
Nyár	metanol:víz 80:20 v/v%	29,0 ± 0,29 ^b	30,0 ± 2,69 ^a	92,8 ± 1,67 ^b	20,6 ± 0,21 ^a	8,40 ± 0,39 ^b	4,17 ± 0,15 ^b
	etanol:víz 80:20 v/v%	31,2 ± 1,40 ^b	26,3 ± 1,51 ^a	94,7 ± 0,35 ^b	25,9 ± 0,34 ^c	10,2 ± 0,12 ^c	4,14 ± 0,04 ^b
	víz	25,5 ± 0,68 ^a	36,5 ± 2,47 ^b	76,1 ± 2,32 ^a	24,6 ± 0,34 ^b	7,67 ± 0,09 ^a	1,88 ± 0,07 ^a
Akác	metanol:víz 80:20 v/v%	29,3 ± 0,99 ^b	11,6 ± 1,73 ^a	136 ± 8,78 ^b	34,9 ± 2,20 ^a	4,65 ± 0,23 ^b	11,7 ± 0,46 ^a
	etanol:víz 80:20 v/v%	28,9 ± 0,12 ^b	13,1 ± 0,45 ^a	129 ± 6,01 ^b	31,5 ± 1,99 ^a	5,29 ± 0,30 ^b	11,6 ± 0,58 ^a
	víz	23,5 ± 0,84 ^a	14,9 ± 1,44 ^a	115 ± 7,30 ^a	30,9 ± 0,78 ^a	3,76 ± 0,29 ^a	17,1 ± 2,32 ^b
Korai juhar	metanol:víz 80:20 v/v%	46,6 ± 2,80 ^b	6,59 ± 0,81 ^a	166,5 ± 3,53 ^b	46,2 ± 0,63 ^b	5,08 ± 0,18 ^b	7,27 ± 0,11 ^a
	etanol:víz 80:20 v/v%	47,0 ± 1,28 ^b	8,67 ± 0,40 ^a	167,9 ± 2,42 ^b	38,4 ± 1,63 ^a	7,04 ± 0,26 ^c	7,28 ± 0,22 ^a
	víz	7,5 ± 0,00 ^a	51,7 ± 2,49 ^b	33,2 ± 2,94 ^a	62,7 ± 4,11 ^c	1,93 ± 0,02 ^a	n.k.
Csértölgy	metanol:víz 80:20 v/v%	79,0 ± 3,35 ^b	6,02 ± 0,93 ^a	257 ± 5,44 ^b	107 ± 2,73 ^b	5,99 ± 0,21 ^b	1,38 ± 0,02 ^a
	etanol:víz 80:20 v/v%	70,4 ± 3,43 ^b	6,06 ± 0,53 ^a	245 ± 6,90 ^b	84,4 ± 5,30 ^a	6,28 ± 0,53 ^b	1,53 ± 0,03 ^b
	víz	51,7 ± 1,81 ^a	6,58 ± 0,40 ^a	204 ± 8,22 ^a	88,3 ± 4,97 ^a	2,98 ± 0,39 ^a	n.k.
Szelídgesztenye	metanol:víz 80:20 v/v%	71,3 ± 3,53 ^b	11,9 ± 4,21 ^a	324 ± 16,0 ^b	80,2 ± 1,94 ^c	5,72 ± 0,28 ^b	0,29 ± 0,00 ^a
	etanol:víz 80:20 v/v%	66,2 ± 1,33 ^b	35,6 ± 2,01 ^b	316 ± 1,36 ^b	59,5 ± 3,45 ^b	5,23 ± 0,22 ^b	0,34 ± 0,00 ^a
	víz	38,7 ± 1,34 ^a	26,1 ± 0,00 ^b	182 ± 5,33 ^a	43,7 ± 3,51 ^a	2,43 ± 0,04 ^a	n.k.
Kocsányos tölgy	metanol:víz 80:20 v/v%	59,9 ± 2,27 ^c	10,9 ± 2,42 ^a	200 ± 5,42 ^c	60,3 ± 3,21 ^c	5,66 ± 0,20 ^b	13,3 ± 0,44 ^c
	etanol:víz 80:20 v/v%	51,6 ± 2,16 ^b	7,99 ± 0,47 ^a	158 ± 3,14 ^b	47,5 ± 1,36 ^a	6,60 ± 0,08 ^c	12,0 ± 0,31 ^b
	víz	37,1 ± 0,31 ^a	11,3 ± 0,35 ^a	115 ± 2,87 ^a	54,6 ± 2,11 ^b	3,62 ± 0,07 ^a	1,85 ± 0,04 ^a
Kocsánytalan tölgy	metanol:víz 80:20 v/v%	56,5 ± 1,34 ^c	9,16 ± 2,06 ^a	193 ± 7,36 ^c	68,6 ± 4,20 ^b	4,85 ± 0,41 ^b	6,93 ± 0,21 ^b
	etanol:víz 80:20 v/v%	47,6 ± 2,01 ^b	7,35 ± 0,56 ^a	163 ± 5,37 ^b	53,5 ± 3,22 ^a	4,73 ± 0,44 ^b	6,75 ± 0,24 ^b
	víz	32,8 ± 0,72 ^a	10,0 ± 0,52 ^a	129 ± 2,00 ^a	54,2 ± 1,97 ^a	2,58 ± 0,19 ^a	1,18 ± 0,01 ^a
Erdeifenyő	metanol:víz 80:20 v/v%	27,1 ± 0,78 ^b	30,4 ± 3,69 ^a	104 ± 2,95 ^a	18,1 ± 0,62 ^b	1,90 ± 0,04 ^b	4,27 ± 0,07 ^b
	etanol:víz 80:20 v/v%	32,6 ± 0,63 ^c	24,9 ± 0,74 ^a	118 ± 7,11 ^b	17,6 ± 0,52 ^b	3,49 ± 0,32 ^c	4,07 ± 0,08 ^a
	víz	21,8 ± 0,24 ^a	54,1 ± 2,84 ^b	94,2 ± 3,96 ^a	14,3 ± 0,94 ^a	1,19 ± 0,05 ^a	n.k.
Feketefenyő	metanol:víz 80:20 v/v%	27,4 ± 0,97 ^b	17,1 ± 0,88 ^a	99,5 ± 2,78 ^c	24,2 ± 1,15 ^c	0,82 ± 0,04 ^a	7,86 ± 0,11 ^b
	etanol:víz 80:20 v/v%	27,2 ± 0,91 ^b	21,8 ± 0,74 ^b	92,3 ± 2,48 ^b	22,5 ± 0,44 ^b	1,49 ± 0,07 ^c	5,70 ± 0,08 ^a
	víz	22,4 ± 1,01 ^a	39,7 ± 0,77 ^c	75,6 ± 0,47 ^a	19,0 ± 0,89 ^a	1,21 ± 0,03 ^b	n.k.

15. táblázat Oldószer optimalásra kapott eredmények a levélminták esetében. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. A felső indexben lévő eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek egy fajon belül adott mérési módszer esetében $p < 0,05$ szinten. Ennek értelmezésénél az *a* a legkisebb érték, a *b* és *c* a legnagyobb (DPPH esetében a legkisebb), és egyben a legjobb érték is. Rövidítések: n.k.: nem kimutatható.

A többi mérési paraméternél az összes polifenol-tartalomhoz hasonló tendencia jellemző, vagyis a szerves oldószerek hatékonyabbak, mint a tiszta víz. Ettől egy-egy eltérő eredményt találunk, pl. a molyhos tölgy esetében a DPPH, és FRAP antioxidáns kapacitás értéke a víz esetében nem tér el szignifikánsan a metanolos extrakcióval kapott értéktől. Az ABTS antioxidáns kapacitás és összes flavonoid-tartalom esetében egyértelműen a szerves oldószer tartalmú extraktumokból mértem a legmagasabb értékeket.

Az eredményeket összefoglalva megállapítható, hogy a vizsgált szerves oldószer tartalmú elegyek sokkal hatékonyabbak a bioaktív vegyületek kinyerése szempontjából. Habár az etanolos és metanolos kivonatok között az esetek legnagyobb részében statisztikailag nincs szignifikáns különbség, a további vizsgálatokhoz a metanol:víz 80:20 v/v% elegyet választottam, mivel a szakirodalom alapján a metanolt gyakrabban alkalmazzák levél polifenolok és általában növényi kivonatok készítéséhez, mint az etanolt, aminek a legfőbb oka a metanol alacsonyabb ára az etil-alkoholéhoz képest.

Az eredmények alapján a vizsgált fajok esetében az egyes fajok antioxidáns paramétereinek összehasonlíthatósága céljából a levélkivonatok elkészítésére legalkalmasabb oldószerelegyenek a metanol:víz 80:20 v/v% elegyet tekintettem és a továbbiakban azt alkalmaztam a vizsgálataimban.

5.1.1.3. *Mintavételi időpont optimalizálása*

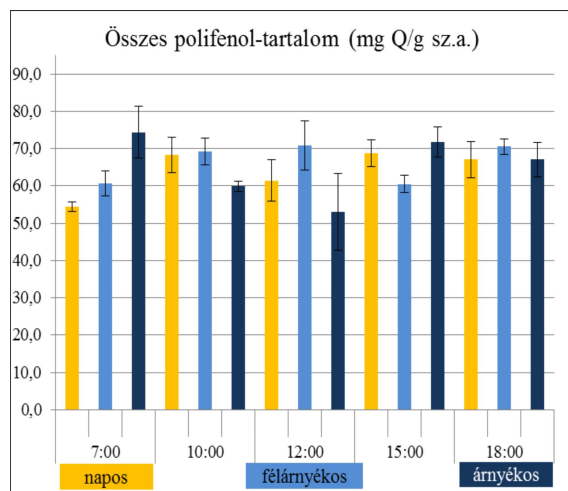
Lágyszárú növények esetében több kutatás is szól arról, hogy a növény életciklusa során hogyan változik az összes polifenol-tartalom (Çirak et al., 2006; Vagiri et al., 2015). Az orbáncfűfélék vizsgálata során szoros összefüggést találtak a növényi szövet fenoltartalma, és a napon belüli, valamint a fenológiai ciklus között (Ayan et al., 2007).

Bükk levelek esetében az enzimatisz antioxidáns rendszer (aszorbát-peroxidáz, dehidroaszorbát-reduktáz, glutation-reduktáz) napon belüli változását Peltzer és Polle (2001) vizsgálta. Mivel felmerül a lehetősége a falevelek nem-enzimatisz antioxidáns tartalom napon belüli jelentős koncentráció változásának is, ezért fontosnak tartottam, hogy optimalizáljam azt a napon belüli időszakot, amikor a levélmintákat veszem. Így a csertölgy esetében a 2014. július 7.-i mintavétellel egybekötve egy nap alatt több időpontban, különböző benapozottságú levelekből (napos, félárnyékos, árnyékos) vettem mintát rendre a lombkorona ugyanazon részeiről (ugyanazokról az ágakról) (**8. táblázat**). Azért a csertölgyet választottam a napon belüli változás vizsgálatára, mert az előző mérésekből kiderült (**5.1.2.1.-es** alfejezet, **20. táblázat**), hogy ez az egyik olyan faj, aminek a legmagasabb volt az antioxidáns kapacitás értéke és az összes polifenol-tartalma. Ennek alapján úgy gondoltam, ha van a levelek esetében valamilyen napon belüli változás, akkor a csertölgy esetében biztosan kimutatható lesz.

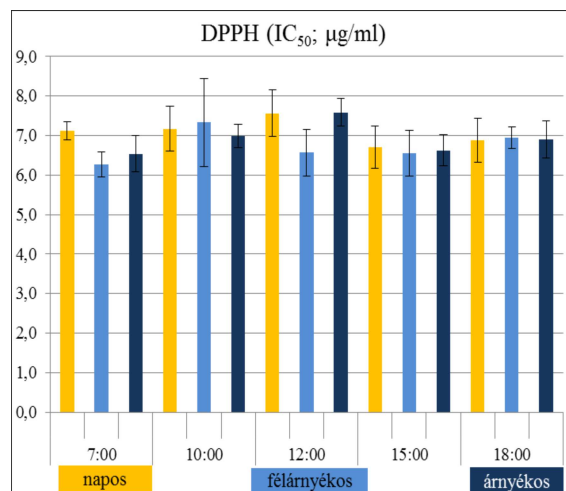
Az előzőekben megállapított optimális minta-előkészítési módszerek alapján a vizsgált levélmintákban az oxidáló enzimeket mikrohullám segítségével inaktiváltam, majd a leveleket ledaráltam és elkészítettem a metanol:víz 80:20 v/v% oldószeres extraktumokat ultrahangos extrakcióval. Meghatároztam az antioxidáns kapacitásokat

DPPH-, FRAP-, és ABTS-módszerrel, valamint az összes polifenol-, az összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalmat. Ezek az eredmények a *V. Mellékletben*, illetve a **21-26. ábrákon** láthatók.

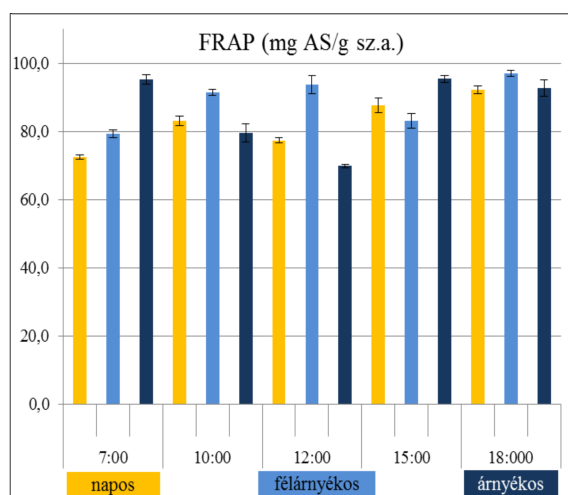
A polifenol-mérés eredményeiből látható, hogy a napos és félárnyékos pontokról vett levelek polifenol-átlagértéke között nincs statisztikailag szignifikáns különbség. Az árnyékban lévő levelek esetében egy déli minimum érzékelhető. Az eredmények alapján nem állapítható meg egyértelműen, hogy az egyes levéltípusok összes polifenol-tartalma között van-e valamilyen egyértelmű, minden napszakra egységesen érvényes különbség.



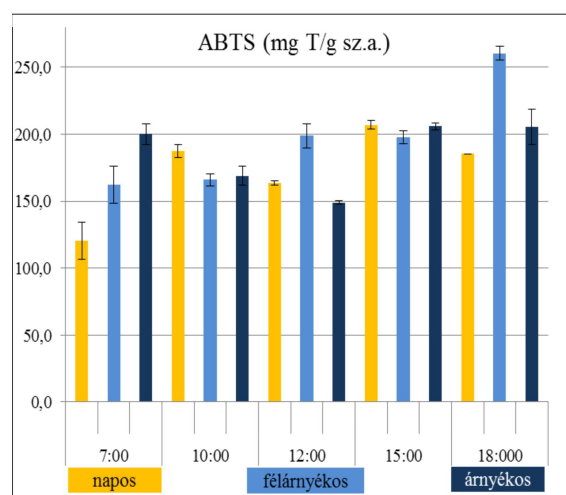
21. ábra A csertölgylevelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért összes polifenol-tartalom értékek (átlag ± szórás).



22. ábra A csertölgylevelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért DPPH antioxidáns kapacitás értékek (átlag ± szórás).



23. ábra A csertölgylevelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért FRAP antioxidáns kapacitás értékek (átlag ± szórás).

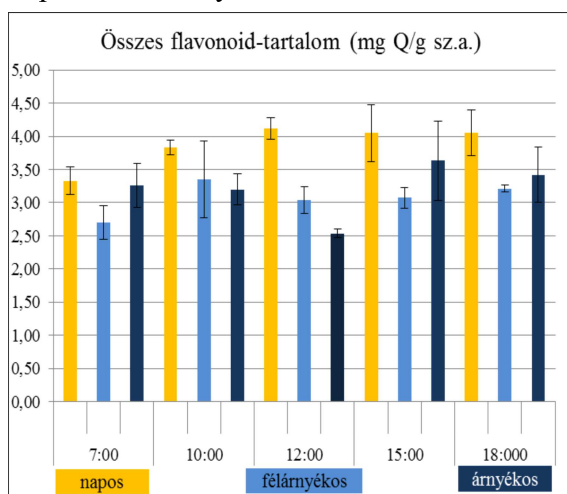


24. ábra A csertölgylevelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért ABTS antioxidáns kapacitás értékek (átlag ± szórás).

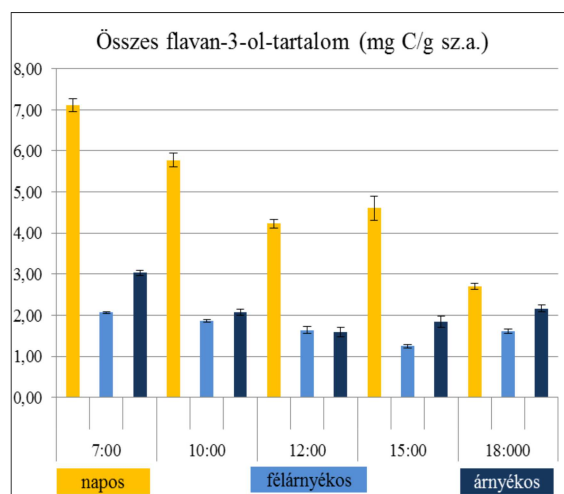
A DPPH IC₅₀-értékek esetében nem találtam összefüggést sem a mintavételi időponttal, sem a benapozottsággal kapcsolatban, a DPPH értéke nem függ a napszaktól.

A FRAP esetében változatos tendencia jellemző, a napos mintavételi pontoknál az eredmények időről időre fluktuálnak, este nagyobb az antioxidáns kapacitás, mint reggel. A félárnyékos és árnyékos mintavételi pontoknál változóak az értékek, de az esti leveleknél szintén jellemző, hogy nagyobb az antioxidáns kapacitásuk. A FRAP antioxidáns kapacitás esetén sem igazolható (az összes polifenol-tartalomnál mértekhez hasonlóan) egyértelmű különbség az egyes levéltípusok között napszakonkénti vonatkozásban.

Az ABTS esetében a napos leveleknél szintén fluktuációt lehet észrevenni. A félárnyékos leveleknél 18 óra felé haladva szignifikánsan nő az antioxidáns kapacitás értéke, míg az árnyékos leveleknél statisztikailag nincs szignifikáns különbség az ABTS antioxidáns kapacitás értékekben a vizsgált napszakok között. Egyértelmű különbségek nem fedezhetők fel a napos, félárnyékos és árnyékos levelek között, amelyek minden napszakra érvényesek lennének.



25. ábra A csertőlgly levelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért összes flavonoid-tartalom értékei (átlag $\pm$ szórás).



26. ábra A csertőlgly levelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért összes flavan-3-ol-tartalom értékei (átlag $\pm$ szórás).

Az összes flavonoid-tartalom meghatározás értékeinél az árnyékos levelek esetében (az összes polifenol-tartalom értékeihez hasonlóan) déli minimumot mértem. Mindegyik napszakban a napos levelek összes flavonoid-tartalma magasabb volt, mint az árnyékos levelek értékei, azonban az eltérés a vizsgált szignifikanciaszinten csak a déli mintavételi időpontban volt szignifikáns.

Az összes flavan-3-ol tartalom esetében a napos és félárnyékos levelek flavan-3-ol tartalma a nap előrehaladtával szignifikánsan csökkent, míg az árnyékos levelek esetében ez a napon belül csökkenő tendencia csak nagyon kismértékű volt. A napnak közvetlenül kitett levelek összes flavan-3-ol tartalma szignifikánsan magasabb, mint a félárnyékos illetve árnyékos levelek értékei.

Összefoglalva elmondhatom, hogy a különböző vizsgált levéltípusok tekintetében, egyedül az összes flavonoid és flavan-3-ol tartalom az, amely kimutatható eltérést mutatott az egyes levéltípusok között, a többi antioxidáns paraméter illetve az összes polifenol-tartalom nem. A napszak a FRAP, az összes polifenol-tartalom (déli

minimum) illetve az összes flavan-3-ol-tartalom (napon belüli monoton csökkenés) értékére gyakorolt hatást a legnagyobb mértékben. Ezek az eredmények természetesen csak a csertölgyre vonatkoznak, más fajok levelei esetében egyéb hatások is előfordulhatnak. Más napon, napokon (eltérő időjárási, környezeti feltételek mellett) a mért tendenciák még hangsúlyosabbak lehetnek. A jelen vizsgálatok célja az volt, hogy egy kiválasztott fajon tanulmányozva a mért paraméterek napi dinamikáját tanulmányozzam és ezáltal a mintavételt úgy standardizáljam, hogy a vegetációs időszak különböző pontjain vett minták antioxidáns paraméterei összehasonlíthatóak legyenek.

Az eredmények alapján a további vizsgálataimban napos és árnyékos leveleket egyaránt gyűjtöttem egy mintavétel alkalmával és ezekből képeztem egy homogén „átlagmintát”. A mintavételt délelőtt hajtottam végre 8 és 11 óra között. Ezzel standardizáltam a mintavételt, a napon belüli ciklusokból adódó esetleges módszeres mintavételi hibát kiküszöböltem.

5.1.2. A levelek antioxidáns paramétereinek szezonális változása

Ebben a mérési sorozatban 12 Magyarországon elterjedt faj leveleiből készült metanolos kivonat antioxidáns kapacitását, összes polifenol-, összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalmát vizsgáltam (**7. táblázat**). Továbbá azt is meghatároztam, hogy milyen tendenciát mutatnak ezek a paraméterek a 2014. májustól szeptemberig tartó időszakban. *A mérések célja az volt, hogy megállapítsam, hogy egy esetleges jövőbeli felhasználás, alkalmazás tekintetében a vegetációs időszak melyik részében található meg, illetve nyerhető ki a vizsgált fajok leveleiből a legtöbb (elsősorban polifenolos) antioxidáns. Növényélettani, növényfiziológiai vizsgálatokra, illetve ilyen jellegű következtetések levonására nem vállalkoztam, mivel ez a kutatás témakörén kívül esik.*

5.1.2.1. Az antioxidáns kapacitás szezonális változása

Ebben a mérési sorozatban háromféle módszert választottam az antioxidáns kapacitás meghatározására, ugyanis számos befolyásoló tényező miatt (az alkalmazott gyök, mintamátrix, pH) többféle módszerrel mért eredményekből lehet következtetni a növényi kivonatok valódi antioxidáns kapacitására.

A **16. táblázat** mutatja be az **ABTS-módszerrel** kapott eredményeket. A legmagasabb értékeket májusban és júniusban mértem a fajok nagy részénél. Ettől egy eltérés vehető észre a korai juhar (szeptember, 195 mg T/g sz.a.) esetében. Sati et al. (2013) szintén őszi maximum értéket határoztak meg az ABTS-féle antioxidáns kapacitásra a páfrányfenyő (*Ginkgo biloba* L.) esetében.

Összességében a közönséges gyertyán (május, 330 mg T/g sz.a.), a szelídgesztenye (május, 324 mg T/g sz.a.) és a csertölgy (június, 275 mg T/g sz.a.) levélextraktumok mutatták a legnagyobb gyökfogó képességet az ABTS⁺-gyök ellen. A bükk, az erdei- és

feketefenyő, a nyár és az akác leveléből készült kivonatok rendelkeztek a legkisebb ABTS antioxidáns kapacitással.

Fafajok	ABTS (mg T/g sz.a.)				
	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	120 ± 6,64 ^{a bc}	157 ± 4,82^{b a}	132 ± 11,6 ^{a bc}	116 ± 3,55 ^{a bc}	155 ± 11,5 ^{b bc}
Közönséges gyertyán	330 ± 23,9^{c h}	315 ± 3,21 ^{bc e}	281 ± 4,57 ^{b f}	294 ± 14,5 ^{bc h}	236 ± 5,68 ^{a f}
Szelídgesztenye	324 ± 16,0^{c h}	305 ± 12,1 ^{bc e}	199 ± 5,00 ^{a e}	280 ± 13,3 ^{b h}	276 ± 13,1 ^{b g}
Akác	136 ± 3,53 ^{cd cd}	148 ± 2,19^{d a}	112 ± 1,84 ^{b a}	75,3 ± 8,23 ^{a a}	127 ± 4,88 ^{c a}
Korai juhar	166 ± 4,54 ^{a e}	187 ± 4,57^{bc b}	187 ± 2,96 ^{bc e}	182 ± 4,52 ^{b ef}	195 ± 3,58 ^{c de}
Molyhos tölgy	158 ± 6,29 ^{b de}	236 ± 2,04^{c e}	143 ± 2,47 ^{a cd}	209 ± 4,04 ^{d fg}	180 ± 6,60 ^{c cd}
Csertölgy	257 ± 5,44 ^{bc g}	275 ± 4,20^{c d}	190 ± 4,05 ^{a e}	235 ± 23,0 ^{bc g}	221 ± 22,6 ^{ab ef}
Kocsányos tölgy	200 ± 5,42^{d f}	198 ± 6,85 ^{cd b}	126 ± 1,05 ^{a b}	141 ± 3,56 ^{b cd}	186 ± 5,44 ^{c d}
Kocsánytalan tölgy	193 ± 7,36 ^{b f}	183 ± 2,39 ^{b b}	155 ± 3,18 ^{a d}	163 ± 2,59 ^{a de}	214 ± 2,35^{c ef}
Nyár	92,8 ± 1,67 ^{a a}	159 ± 3,75^{d a}	126 ± 1,48 ^{b b}	138 ± 6,32 ^{c cd}	131 ± 2,02 ^{bc ab}
Erdeifenyő	104 ± 2,95 ^{a ab}	155 ± 0,52^{d a}	141 ± 3,23 ^{c c}	105 ± 2,92 ^{a b}	123 ± 6,89 ^{b a}
Feketefenyő	99,5 ± 2,78 ^{a ab}	159 ± 2,24^{d a}	134 ± 2,06 ^{c bc}	122 ± 8,00 ^{b bc}	108 ± 2,68 ^{a a}

16. táblázat ABTS-módszerrel mért antioxidáns kapacitások (átlag ± szórás) szezonális változása. Szignifikáns különbséget jeleznek a felső indexben lévő eltérő betűk a hónapok, míg az alsó indexben lévő eltérő betűk a fafajok között $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legjobb antioxidáns kapacitást mutatják adott faj esetében.

Ezeket az eredményeket nehéz összevetni az irodalomban található adatokkal, mert a mérések kivitelezése (a többi antioxidáns kapacitás esetében is) minden kutatás esetében máshogy történik meg. Vannak szakemberek, akik a reakció végén mérik a reakcióelegy abszorbanciáját (Razali et al., 2012). Mások a reakció kezdetén és végén mért abszorbancia-különbségből számolnak gyökfogó képességet (Fu et al., 2015). Továbbá a kalibrációhoz használt standard vegyület sem mindig ugyanaz, és a mérési eredményeket is többféle módon adhatják meg a kutatók. Az antioxidáns kapacitást vonatkoztathatják az extraktum (Uysal et al., 2016), de a száraz növényi rész tömegére is. Razali és munkatársai a *Tamarandus indica* levele metanolos kivonatának antioxidáns kapacitását átszámolva az általam használt mértékegységre, 413 mg T/ g sz.a.-nak mérték (Razali et al., 2012). A közönséges gyertyán és a szelídgesztenye májusi mintáinak értékei (rendre 330 és 324 mg T/ g sz.a.) a *Tamarandus indica* leveleinél kisebb értékeket mutatnak.

Teleszko és Wojdyło (2015) szintén ABTS-féle antioxidáns kapacitást határozott meg az alma (*Malus domestica* (Borkh.)) (átszámolva 89,9 mg T/g sz.a.) és a birs (*Cydonia oblonga* (Mill.)) (átszámolva 291 mg T/g sz.a.) leveleiből. Ha az általam mért legjobb eredményekhez hasonlítom, akkor a közönséges gyertyánra és szelídgesztenye (rendre 330 és 324 mg T/g sz.a.) értékei sokkal jobbak az alma és a birs értékéhez képest. A *Malus domestica*-nál szinte az összes faj jobb ABTS antioxidáns kapacitást mutat, míg a *Cydonia oblonga*-nál csak a gyertyán és a szelídgesztenye rendelkezik jobb ABTS-féle antioxidáns kapacitással.

A FRAP-mérés eredményei a **17. táblázatban** láthatók.

Fafajok	FRAP (mg AS/g sz.a.)				
	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	30,3 ± 1,60 ^{a_{bc}}	40,1 ± 0,71 ^c	36,4 ± 0,53 ^b	36,7 ± 0,63 ^{b_c}	53,1 ± 1,53^{d_c}
Gyertyán	78,8 ± 0,39 ^{ab_g}	77,9 ± 1,21 ^{a_g}	84,0 ± 2,67 ^{b_h}	106 ± 3,10^{d_i}	92,1 ± 1,21 ^{c_{gh}}
Szelídgesztenye	80,2 ± 1,94 ^{c_g}	71,7 ± 3,37 ^{b_f}	62,8 ± 2,57 ^{a_f}	83,9 ± 2,28 ^{c_g}	93,3 ± 0,39^{d_h}
Akác	34,9 ± 2,20 ^{b_c}	32,2 ± 0,49 ^{b_b}	40,6 ± 2,63 ^{c_{bcd}}	11,6 ± 0,72 ^{a_a}	51,4 ± 1,87^{d_c}
Korai juhar	46,2 ± 0,63 ^{a_d}	47,8 ± 2,54 ^{a_d}	50,1 ± 1,82 ^{a_e}	64,8 ± 1,37 ^{b_f}	69,3 ± 3,45^{b_d}
Molyhos tölgy	48,9 ± 2,20 ^{a_d}	80,4 ± 2,58 ^{c_g}	67,0 ± 2,12 ^{b_{fg}}	96,2 ± 1,83^{d_h}	79,6 ± 3,46 ^{c_e}
Csertölgy	107 ± 2,73^{c_h}	70,4 ± 1,94 ^{a_f}	69,2 ± 2,28 ^{a_g}	92,6 ± 2,87 ^{b_h}	87,6 ± 1,54 ^{b_{fg}}
Kocsányos tölgy	60,3 ± 3,20 ^{c_e}	51,2 ± 1,82 ^{b_d}	43,1 ± 2,93 ^{a_{cd}}	48,8 ± 0,65 ^{b_e}	82,8 ± 6,37^{d_{ef}}
Kocsánytalan tölgy	68,6 ± 4,20 ^{b_f}	58,6 ± 2,11 ^{a_e}	64,2 ± 2,52 ^{ab_{fg}}	67,6 ± 1,43 ^{b_f}	85,9 ± 1,79^{c_f}
Nyár	20,6 ± 2,19 ^{a_a}	40,3 ± 3,12 ^{b_c}	38,6 ± 1,27 ^{b_{bc}}	45,2 ± 0,92 ^{c_{de}}	47,9 ± 1,51^{c_{bc}}
Erdeifenyő	18,1 ± 0,62 ^{a_a}	25,8 ± 0,86^{d_a}	20,0 ± 0,33 ^{b_a}	17,2 ± 0,66 ^{a_b}	22,2 ± 1,10 ^{c_a}
Feketefenyő	24,3 ± 1,15 ^{a_{ab}}	38,5 ± 0,79 ^{b_c}	45,7 ± 1,80^{d_{de}}	42,1 ± 0,78 ^{c_d}	43,6 ± 1,74 ^{cd_b}

17. táblázat FRAP-módszerrel mért antioxidáns kapacitások (átlag ± szórás) szezonális változása. Szignifikáns különbséget jeleznek a felső indexben lévő eltérő betűk a hónapok, míg az alsó indexben lévő eltérő betűk a fajok között $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legjobb antioxidáns kapacitást mutatják adott faj esetében.

Ahogy az ABTS módszerrel kapott eredményeknél, itt is szignifikáns különbségek vannak a hónapok között minden faj esetében. Általánosságban elmondható, hogy a legmagasabb értékeket augusztusban és szeptemberben mértem. Ez alól kivétel volt a feketefenyő (július, 45,7 mg AS/g sz.a.), az erdeifenyő (június, 25,8 mg AS/g sz.a.) és a csertölgy (május, 107 mg AS/g sz.a.). Ezek az értékek nem szokatlanok, a *Ginkgo biloba* esetében szintén a vegetációs időszak kezdetén mutattak a FRAP-értékek maximumot (Sati et al., 2013).

A fajok közül a legnagyobb FRAP-féle antioxidáns kapacitást a közönséges gyertyán mutatja, de a csertölgy és a szelídgesztenye is nagyon jó vasredukáló-képességgel rendelkezik. A legkisebb értékkel az erdei fenyő rendelkezik.

A **18. táblázatban** láthatók a **DPPH-módszerrel** meghatározott antioxidáns kapacitás értékek. Látható, hogy nincs szignifikáns különbség az IC₅₀-érték és a hónapok között a közönséges gyertyán, a szelídgesztenye, a molyhos tölgy, a kocsányos tölgy és az erdeifenyő esetében. Kimutatható antioxidáns kapacitás növekedést csak a nyár esetében lehet megállapítani. A többi faj esetében nincs egyértelmű tendencia a különböző hónapok között.

Összességében a közönséges gyertyán augusztusi kivonata rendelkezett a legjobb DPPH antioxidáns kapacitással, míg az egész vegetációs időszak alatt a leggyengébbel az erdeifenyő augusztusban.

Fafajok	DPPH (IC ₅₀) (µg/ml)				
	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	10,5 ± 1,25 ^a _{ab}	18,2 ± 1,92 ^c _c	13,4 ± 0,63 ^{ab} _{cd}	15,2 ± 1,04 ^{bc} _e	11,3 ± 0,73 ^a _{cde}
Gyertyán	6,87 ± 0,39 ^a _a	6,37 ± 1,90 ^a _a	5,51 ± 0,85 ^a _a	4,6 ± 0,88 ^a _a	4,69 ± 0,28 ^a _a
Szelídgesztenye	11,9 ± 4,21 ^a _{ab}	9,17 ± 2,98 ^a _{ab}	10,5 ± 2,16 ^a _{bc}	7,05 ± 0,66 ^a _{abc}	9,02 ± 0,30 ^a _{bcd}
Akác	11,6 ± 1,73 ^a _{ab}	18,2 ± 0,35 ^{bc} _c	10,2 ± 0,70 ^a _{bc}	22,8 ± 4,50 ^c _f	12,5 ± 1,23 ^a _{de}
Korai juhar	6,59 ± 0,81 ^{ab} _a	8,21 ± 0,66 ^b _a	7,32 ± 0,44 ^{ab} _{ab}	6,36 ± 0,31 ^a _{ab}	6,30 ± 0,46 ^a _{ab}
Molyhos tölgy	8,16 ± 1,49 ^a _a	7,82 ± 0,35 ^a _a	8,06 ± 0,38 ^a _{ab}	7,49 ± 0,78 ^a _{abc}	8,41 ± 0,43 ^a _{abcd}
Csertölgy	6,02 ± 0,93 ^a _a	7,58 ± 0,35 ^{ab} _a	7,21 ± 0,47 ^{ab} _{ab}	6,20 ± 0,47 ^a _{ab}	8,38 ± 0,89 ^b _{abc}
Kocsányos tölgy	10,9 ± 2,42 ^a _{ab}	10,3 ± 2,68 ^a _{ab}	10,4 ± 0,59 ^a _{bc}	10,7 ± 1,20 ^a _{bcd}	11,1 ± 1,81 ^a _{cde}
Kocsánytalan tölgy	9,16 ± 2,06 ^{bc} _{ab}	14,5 ± 1,38 ^d _{bc}	7,73 ± 0,67 ^{ab} _{ab}	11,7 ± 0,22 ^{cd} _{cde}	5,02 ± 0,40 ^a _{ab}
Nyár	30,0 ± 2,69 ^a _c	24,4 ± 1,61 ^a _d	26,6 ± 1,58 ^a _e	15,7 ± 0,14 ^b _{de}	14,0 ± 2,11 ^b _e
Erdeifenyő	30,4 ± 3,69 ^a _c	38,0 ± 2,32 ^a _e	38,7 ± 2,19 ^a _f	42,4 ± 0,00 ^a _g	37,8 ± 2,99 ^a _g
Feketeenyő	17,1 ± 0,88 ^{ab} _b	17,6 ± 1,82 ^{ab} _c	14,8 ± 0,47 ^{ab} _d	14,0 ± 1,46 ^a _{de}	18,9 ± 1,53 ^b _f

18. táblázat DPPH- módszerrel mért antioxidáns kapacitások (átlag ± szórás) szezonális változása. Szignifikáns különbséget jeleznek a felső indexben lévő eltérő betűk a hónapok, míg az alsó indexben lévő eltérő betűk a fajok között $p < 0,02$ szinten.

Az irodalomban található eredményekkel is összehasonlíthatom a mért értékek szezonális változását. Egy kínai hagyományos orvoslásban használt növény, a kínai gumifa (*Eucommia ulmoides* Oliver), levélextraktum antioxidáns paramétereinek szezonális változását vizsgálva (a májustól októberig tartó időszakban) azt tapasztalták, hogy a májusi és augusztusi levelekből készült extraktum antioxidáns kapacitása volt a legnagyobb a vegetációs időszak folyamán, így a kutatók ezeket a hónapokat javasolták a begyűjtésre (Zhang et al., 2013).

Összefoglalásaként elmondható, hogy *a különböző módszerek esetében eltérő tendencia tapasztalható a vegetációs időszak folyamán, ami a különböző módszerek eltérő szelektivitásával, valamint az egyes fajok leveleinek eltérő antioxidáns-összetételével magyarázható. Az alkalmazott módszerek eltérő szelektivitása miatt csak a különböző módszerekkel kapott eredmények együttes kiértékelésével kaphatunk információt egy adott kivonat antioxidáns „erejéről”.*

Ezt egy saját magam által felállított pontrendszer segítségével valósítottam meg felhasználva a DPPH, FRAP és ABTS antioxidáns kapacitás meghatározás eredményeit. Egy adott módszeren belül az eredményeket [0-1] tartományra normalizáltam. 0 pontot kapott az a faj, amelyik egy mérési paraméter esetében a legkisebb antioxidáns kapacitást, és 1-et az, amelyik a legnagyobb értéket mutatta. A DPPH esetében fordított számozást alkalmaztam, mert az alacsony IC₅₀-érték magas antioxidáns kapacitást jelent. Végül a különböző antioxidáns kapacitások normalizált értékeit összegeztem. Így a maximálisan elérhető pontszám 3 volt (abban az esetben, ha egy faj adott hónapban vizsgált mintája mindhárom módszer esetében a legjobb antioxidáns kapacitást mutatta). Az összegzett pontszámok a **20. táblázatban** láthatók. Megállapítható, hogy *a vizsgált fajok közül a legnagyobb összegzett antioxidáns kapacitással a közönséges gyertyán, a szelídgesztenye és a csertölgy rendelkezik. A legtöbb faj esetében az augusztusi/szeptemberi minták rendelkeznek a legmagasabb összegzett antioxidáns*

kapacitással. Ez alól kivétel az erdeifenyő (június), a feketefenyő (július) és a csertölgy (május).

Fafaj	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	1,21	1,26	1,25	1,14	1,57
Gyertyán	2,65	2,59	2,54	2,85	2,48
Szelídgesztenye	2,50	2,41	1,87	2,50	2,53
Akác	1,30	1,14	1,30	0,52	1,41
Korai juhar	1,62	2,27	1,76	2,34	2,02
Molyhos tölgy	1,67	1,73	1,77	1,93	2,03
Csertölgy	2,68	2,32	1,99	2,44	2,27
Kocsányos tölgy	1,84	1,74	1,38	1,49	2,01
Kocsánytalan tölgy	1,94	1,65	1,79	1,74	2,32
Nyár	0,50	1,11	0,90	1,31	1,35
Erdeifenyő	0,50	0,58	0,44	0,18	0,42
Feketefenyő	0,90	1,27	1,32	1,25	1,09

20. táblázat Az antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP és ABTS) pontrendszer alapján történt kiértékelésének és összesítésének eredménye. Maximum pontszám: 3.

5.1.2.2. A fenolos vegyületek szezonális változása

Az antioxidáns hatást a fenolos vegyületek közvetlenül befolyásolják (Awika et al., 2003). Megvizsgáltam a kivonatok összes polifenol-, összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalmát is, hogy megállapítsam, mely típusú fenolos vegyületek felelősek az antioxidáns hatásért.

A **21. táblázat** mutatja be a kivonatok **összes polifenol-tartalmát**. Az eredményekből látható, hogy a fajok egy részénél a polifenol-tartalom májustól augusztusig/szeptemberig növekedett (bükk, akác, kocsányos- és kocsánytalan tölgy), míg a csertölgy, szelídgesztenye és az erdeifenyő esetében májusi vagy júniusi, illetve júliusi (gyertyán, korai juhar, nyár, feketefenyő) maximumot mértem.

Összes polifenol-tartalom (mg Q/g sz.a.)					
Fafajok	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	37,8 ± 1,01 ^a _b	56,8 ± 0,99 ^c _d	48,1 ± 1,28 ^b _{bc}	47,4 ± 3,14 ^b _b	57,7 ± 2,59^c_{bc}
Gyertyán	78,8 ± 0,59 ^a _f	93,1 ± 3,29 ^b _h	106 ± 5,57^c_h	94,3 ± 5,38 ^b _g	80,8 ± 3,05 ^a _e
Szelídgesztenye	71,3 ± 3,5 ^{ab} _c	78,5 ± 1,13^b_g	62,5 ± 1,59 ^a _{de}	76,3 ± 5,25 ^b _f	75,5 ± 4,67 ^b _{de}
Akác	29,3 ± 0,99 ^a _b	29,7 ± 0,73 ^b _a	43,2 ± 0,21 ^c _{ab}	19,9 ± 2,89 ^a _a	49,6 ± 1,84^d_b
Korai juhar	46,6 ± 2,80 ^a _c	57,4 ± 1,98 ^b _d	80,2 ± 1,47^e_g	65,9 ± 2,83 ^c _{def}	73,7 ± 1,26 ^d _{de}
Molyhos tölgy	37,5 ± 0,54 ^a _b	71,7 ± 2,32 ^c _{fg}	63,8 ± 3,31 ^c _e	92,9 ± 3,67^d_g	60,3 ± 5,73 ^b _c
Csertölgy	79,0 ± 3,35^c_f	65,8 ± 1,59 ^{ab} _{ef}	65,9 ± 1,54 ^{ab} _{ef}	73,7 ± 5,81 ^b _{ef}	59,7 ± 2,52 ^a _c
Kocsányos tölgy	59,9 ± 2,27 ^b _d	58,5 ± 2,50 ^b _{de}	48,3 ± 4,82 ^a _{bc}	49,4 ± 4,2 ^a _{bc}	72,2 ± 0,46^c_d
Kocsánytalan tölgy	56,5 ± 1,34 ^a _d	51,2 ± 3,89 ^a _{cd}	59,2 ± 4,06 ^a _{de}	53,7 ± 2,14 ^a _{bcd}	70,0 ± 2,42^b_d
Nyár	29,0 ± 0,29 ^a _a	53,6 ± 3,24 ^b _{cd}	73,7 ± 3,05^d_{fg}	62,0 ± 2,74 ^c _{cde}	57,6 ± 0,58 ^b _{bc}
Erdeifenyő	27,1 ± 0,78 ^a _a	42,6 ± 1,62^b_b	37,5 ± 3,9 ^b _a	24,6 ± 3,98 ^a _a	36,1 ± 1,74 ^b _a
Feketefenyő	27,4 ± 0,97 ^a _a	46,6 ± 4,23 ^b _{bc}	53,8 ± 1,56^b_{cd}	45,4 ± 5,51 ^b _b	35,8 ± 2,30 ^a _a

21. táblázat A levelekből készült extraktumok összes polifenol-tartalmának (átlag ± szórás) szezonális változása. Szignifikáns különbséget jeleznek a felső indexben lévő eltérő betűk a hónapok, míg az alsó indexben lévő eltérő betűk a fajok között $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legtöbb polifenol-tartalmat mutatják.

Falevelek összes polifenol-tartalmának szezonális változásáról több kutatás is született, ezek közül több is arról számol be, hogy a polifenol-tartalom tavasztól őszig növekedő tendenciát mutat.

A *Moringa oleifera* Lam. levelei esetében a polifenol-tartalom a frissen kihajtott levelek esetében volt a legalacsonyabb, és a polifenol-tartalom a levelek érettségével párhuzamosan növekedett (Iqbal és Bhangar, 2006). Pirvu et al. (2013) bükk levelei esetében szintén növekedést írt le az őszi időszak felé haladva: a legnagyobb összes polifenol-tartalmat a szeptemberi levelek esetében határozták meg. A *Ginkgo biloba* L. esetében Sati et al. (2013) szintén nagyobb mennyiségű fenolos vegyületet találtak az őszi levelekben, mint a tavasziakban.

A két tűlevelű fafaj esetében a polifenol-tartalom maximum értéke az erdeifenyő esetében júniusban (42,6 mg Q/g sz.a.), a feketefenyő esetében pedig júliusban (53,8 mg Q/g sz.a.) volt mérhető. Ezek a fenyők abban különböznek a többi fától, hogy a tűleveleik egész évben a fán maradnak, és nem hullanak le meghatározott időközönként. Ewers és Schmid (1981) szerint a tűlevelek élettartama nagyon változatos lehet, néhány hónaptól akár több évtizedig is a fán maradhatnak, ezért nehéz meghatározni az érettségi fokukat. Ilyen jellegű vizsgálatokat a két tűlevelű faj esetében nem végeztem.

Összességében az akác esetében mértem a legkevesebb polifenol-tartalmat (augusztus, 19,9 mg Q/g sz.a.), a legnagyobbat pedig a közönséges gyertyán júliusi (106 mg Q/g sz.a.), a molyhos tölgy augusztusi (92,9 mg Q/g sz.a.), a csertölgy májusi (79,0 mg Q/g sz.a.) és a szelídgesztenye júliusi (78,5 mg Q/g sz.a.) mintája esetében. A kocsányos és kocsánytalan tölgy, a bükk, a nyár és a tűlevelűek közepes értékeket mutattak.

Az **összes flavonoid-tartalomra** vonatkozó eredmények a **22. táblázatban** láthatók. Általánosságban az vehető észre, hogy az összes flavonoid-tartalom szezonális változása jelentősen eltér az összes polifenol-tartalom változás tendenciájától. Ennek egyik magyarázata, hogy nem minden polifenolos extraktanyag flavonoid-típusú, így a két mennyiség nem szükségszerűen korrelál egymással. Másrészt az összes polifenol-tartalom mérésére alkalmazott Folin-Ciocalteu módszer nem csak a polifenolokat határozza meg, mivel számos interferáló vegyület zavarhatja a mérést (ld. 2.8.1.1. fejezet).

Az összes flavonoid-tartalom májustól augusztusig/szeptemberig csökken a bükk, a csertölgy, a kocsánytalan tölgy és az akác esetében, míg tavasztól ősz felé haladva nő az összes flavonoid-tartalom a közönséges gyertyán, a korai juhar, a nyár és a fenyők esetében. A bükknél tapasztalt szezonális tendencia összhangban van a Pirvu és munkatársai által mért eredményekkel (Pirvu et al., 2013).

A hónapról hónapra változó értékek esetében azt figyelhetjük meg, hogy augusztusban minimum figyelhető meg az akác (2,60 mg Q/g sz.a.) és a kocsányos tölgy esetében. Ugyanakkor a gyertyán (12,8 mg Q/g sz.a.), a korai juhar (6,74 mg Q/g sz.a.) és a feketefenyő (1,46 mg Q/g sz.a.) esetében ugyanebben a hónapban volt az

összes flavonoid-tartalom a legnagyobb. Májusi maximummal a bükk, a szelídgesztenye, az akác, a molyhos tölgy, a cser és a kocsánytalan tölgy rendelkezett.

Összes flavonoid-tartalom (mg Q/g sz.a.)					
Fafajok	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	4,34 ± 0,07^{cd}	4,15 ± 0,10 ^{de}	2,80 ± 0,14 ^{bc}	2,23 ± 0,07 ^a	2,70 ± 0,09 ^{bc}
Gyertyán	11,1 ± 0,52 ^b	11,0 ± 0,75 ^b	10,0 ± 0,68 ^b	12,8 ± 0,28^c	8,42 ± 0,26 ^a
Szelídgesztenye	5,72 ± 0,28^a	4,73 ± 0,53 ^a	4,66 ± 0,38 ^a	5,15 ± 0,09 ^a	5,16 ± 0,37 ^a
Akác	4,65 ± 0,23^c	4,43 ± 0,26 ^{bc}	4,27 ± 0,24 ^{bc}	2,60 ± 0,16 ^{bc}	4,00 ± 0,11 ^b
Korai juhar	5,08 ± 0,46 ^a	5,33 ± 0,19 ^a	6,06 ± 0,15 ^b	6,74 ± 0,20^b	6,47 ± 0,23 ^b
Molyhos tölgy	3,80 ± 0,31^a	3,26 ± 0,07 ^a	3,71 ± 0,36 ^a	3,75 ± 0,39 ^a	3,25 ± 0,47 ^a
Csertölgy	5,99 ± 0,21^b	4,03 ± 0,24 ^a	3,76 ± 0,52 ^a	4,52 ± 0,24 ^a	3,93 ± 0,23 ^a
Kocsányos tölgy	5,66 ± 0,40 ^{ab}	5,71 ± 0,28^b	4,59 ± 1,02 ^{ab}	4,09 ± 0,19 ^a	5,54 ± 0,43 ^{ab}
Kocsánytalan tölgy	4,85 ± 0,41^b	3,18 ± 0,30 ^a	3,19 ± 0,19 ^a	2,96 ± 0,05 ^a	3,54 ± 0,35 ^a
Nyár	8,40 ± 0,39 ^a	15,1 ± 0,09^d	12,8 ± 0,37 ^c	12,8 ± 0,16 ^c	10,2 ± 0,05 ^b
Erdeifenyő	1,90 ± 0,04 ^a	2,57 ± 0,09^b	2,30 ± 0,09 ^b	2,36 ± 0,03 ^b	2,09 ± 0,09 ^a
Feketefenyő	0,82 ± 0,04 ^a	1,07 ± 0,08 ^{ab}	0,93 ± 0,17 ^{ab}	1,46 ± 0,06^c	1,12 ± 0,07 ^b

22. táblázat A levelek összes flavonoid-tartalmának (átlag ± szórás) szezonális változása. Szignifikáns különbséget jeleznek a felső indexben lévő eltérő betűk a hónapok, míg az alsó indexben lévő eltérő betűk a fajok között $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legtöbb flavonoid-tartalmat mutatják.

A szakirodalom szerint az összes flavonoid tartalmat a faj mellett még sok más tényező befolyásolhatja, közöttük az egyik a növény neme. Zhang et al. (2016) szerint a *Pistacia chinensis* Bunge fa esetében a női egyedeknél márciustól szeptemberig nőtt a falevelek összes flavonoid-tartalma, míg a hím egyedeknél ugyanez a paraméter csökkenő tendenciát mutatott.

Összességében a legnagyobb flavonoid-tartalmat a nyár (június, 15,1 mg Q/g sz.a.) és a közönséges gyertyán (augusztus, 12,8 mg Q/g sz.a.) levél-extraktumából mértem, míg a legkisebb értékeket a tülevelű fajok kivonataiból kaptam.

Az **összes flavan-3-ol-tartalom** mérési eredményei a **23. táblázatban** láthatók. Az összes flavan-3-ol-tartalom esetében is változatos tendenciák figyelhetők meg.

Tavaszi őrre növekedés figyelhető meg a szelídgesztenye, a molyhos tölgy és a bükk esetében. A többi fajtánál más-más hónapokban mértem a legnagyobb értékeket. Júliusi maximum volt jellemző az akác, a korai juhar, a feketefenyő és a közönséges gyertyán esetében. A molyhos tölgy és a csertölgy legnagyobb összes flavan-3-ol-tartalma augusztusban volt mérhető, míg a kocsányos tölgy, a nyár és az erdeifenyő esetében a legtöbb flavan-3-ol a júniusi levelekben volt megtalálható.

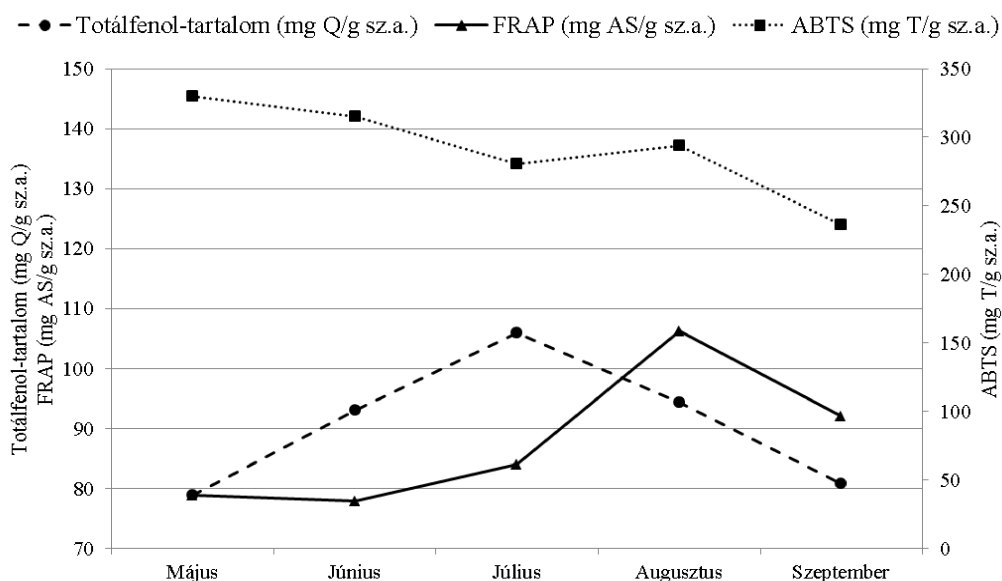
A fajok közül a legtöbb flavan-3-ol jellegű vegyület a bükk szeptemberi, a feketefenyő júliusi, a korai juhar júliusi, az akác júliusi és a kocsányos tölgy júniusi levélkivonatában volt kimutatható. Legkevesebb flavan-3-ol-típusú vegyület a közönséges gyertyán, a szelídgesztenye és a csertölgy leveleiben volt.

Összes flavan-3-ol-tartalom (mg C/g sz.a.)					
Fafajok	Május	Június	Július	Augusztus	Szeptember
Bükk	12,4 ± 0,40 ^{a_{gh}}	22,6 ± 1,04 ^{c_i}	23,0 ± 0,65 ^{c_k}	15,5 ± 0,61 ^{b_h}	24,1 ± 0,10^{c_g}
Gyertyán	0,47 ± 0,02 ^{a_b}	0,73 ± 0,01 ^{b_a}	1,82 ± 0,02^{e_b}	1,66 ± 0,01 ^{d_a}	1,10 ± 0,05 ^{c_a}
Szelídgesztenye	0,29 ± 0,00 ^{a_a}	1,36 ± 0,02 ^{c_b}	1,13 ± 0,01 ^{b_a}	3,43 ± 0,06 ^{d_{cd}}	4,90 ± 0,12^{e_c}
Akác	11,7 ± 0,46 ^{bc_g}	12,8 ± 0,44 ^{c_h}	16,5 ± 0,99^{d_i}	3,27 ± 0,19 ^{a_c}	10,9 ± 0,18 ^{b_e}
Korai juhar	7,27 ± 0,11 ^{a_f}	10,9 ± 0,80 ^{b_h}	18,7 ± 0,75^{c_j}	11,5 ± 0,57 ^{b_g}	11,2 ± 0,61 ^{b_e}
Molyhos tölgy	0,52 ± 0,01 ^{a_c}	3,65 ± 0,01 ^{b_e}	4,35 ± 0,04 ^{c_e}	5,85 ± 0,01^{e_e}	5,15 ± 0,04 ^{d_c}
Csertölgy	1,38 ± 0,04 ^{a_d}	2,08 ± 0,01 ^{b_c}	2,27 ± 0,04 ^{b_c}	4,87 ± 0,10^{d_e}	2,73 ± 0,10 ^{c_b}
Kocsányos tölgy	13,3 ± 1,10 ^{b_h}	15,5 ± 1,03^{c_f}	14,6 ± 0,11 ^{bc_h}	9,67 ± 0,67 ^{a_f}	13,3 ± 0,46 ^{b_f}
Kocsánytalan tölgy	6,93 ± 1,20^{d_f}	2,50 ± 0,06 ^{ab_d}	3,44 ± 0,12 ^{c_d}	2,08 ± 0,11 ^{a_b}	2,90 ± 0,07 ^{bc_b}
Nyár	4,17 ± 0,15 ^{a_e}	11,4 ± 0,24^{d_h}	7,84 ± 0,08 ^{b_g}	8,27 ± 0,19 ^{b_f}	9,56 ± 0,42 ^{c_d}
Erdeifenyő	4,27 ± 0,18 ^{b_e}	7,71 ± 0,13^{e_g}	5,66 ± 0,33 ^{d_f}	3,64 ± 0,10 ^{a_d}	5,04 ± 0,12 ^{c_c}
Feketefenyő	7,86 ± 0,27 ^{a_f}	13,1 ± 0,55 ^{c_h}	18,9 ± 0,29^{d_j}	11,8 ± 0,61 ^{b_g}	9,13 ± 0,20 ^{a_d}

23. táblázat Az összes flavan-3-ol-tartalom (átlag ± szórás) szezonális változása. Szignifikáns különbséget jeleznek a felső indexben lévő eltérő betűk a hónapok, míg az alsó indexben lévő eltérő betűk a fajok között $p < 0,02$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legtöbb flavan-3-ol-tartalmat mutatják.

A bükk leveléből mért flavan-3-ol-tartalmak összevethetők az irodalomban talált értékekkel. Sen et al. (2013) a megsárgult és zöld bükk levelek összes flavan-3-ol-tartalmát vizsgálva azt állapították meg, hogy a teljes flavan-3-ol-tartalom 30 és 100 mg C/g sz.a. között változott attól függően, hogy a növényt melyik évben vizsgálták, és a levelek milyen egészségi állapotban voltak. Ez utóbbit a színük alapján állapították meg. Feucht és Treutter (1994) azt a következtetést vonták le, hogy a flavan-3-ol jellegű vegyületek fontos szerepet töltenek be a bükk leveleiben lévő antioxidáns, és védelmi rendszerében.

A fenolos vegyületek szezonális változását összehasonlítva az összesített antioxidáns kapacitás értékeivel (**20. táblázat**), megállapítható, hogy a polifenol-tartalom is ugyanazoknál a fajoknál, vagyis a közönséges gyertyánnál, a szelídgesztenyénél és a csertölgynél volt a legnagyobb. Tehát e fajok esetében az antioxidáns hatáshoz a polifenolos jellegű vegyületek jelentős mértékben hozzájárulnak. A közönséges gyertyán (ami minden szempontból a legjobban teljesítő faj) leveléből készült kivonatok esetében a flavonoid-tartalom magas volt, azonban flavan-3-ol jellegű vegyületekből kevesebbet tartalmazott. Összességében tehát a közönséges gyertyán leveleinek magas antioxidáns kapacitásaért a flavonoidok, és más polifenolos vegyületek tehetők felelőssé, azonban a flavan-3-ol-szerkezettel rendelkező vegyületek nem találhatók meg számottevő mértékben a gyertyán levelekben. Ez összhangban van a gyertyán levélextraktumból elvégzett HPLC-PDA-MS/MS-vizsgálatokkal, miszerint a katechinek és a polimer procianidinek kisebb koncentrációban vannak jelent az extraktumban, mint a fenolos savak és a flavonoid jellegű vegyületek (ld. 5.1.3. fejezet). A közönséges gyertyánnál érdemes még megemlíteni, hogy a különböző paraméterek más-más szezonális tendenciát mutatnak (**27. ábra**).



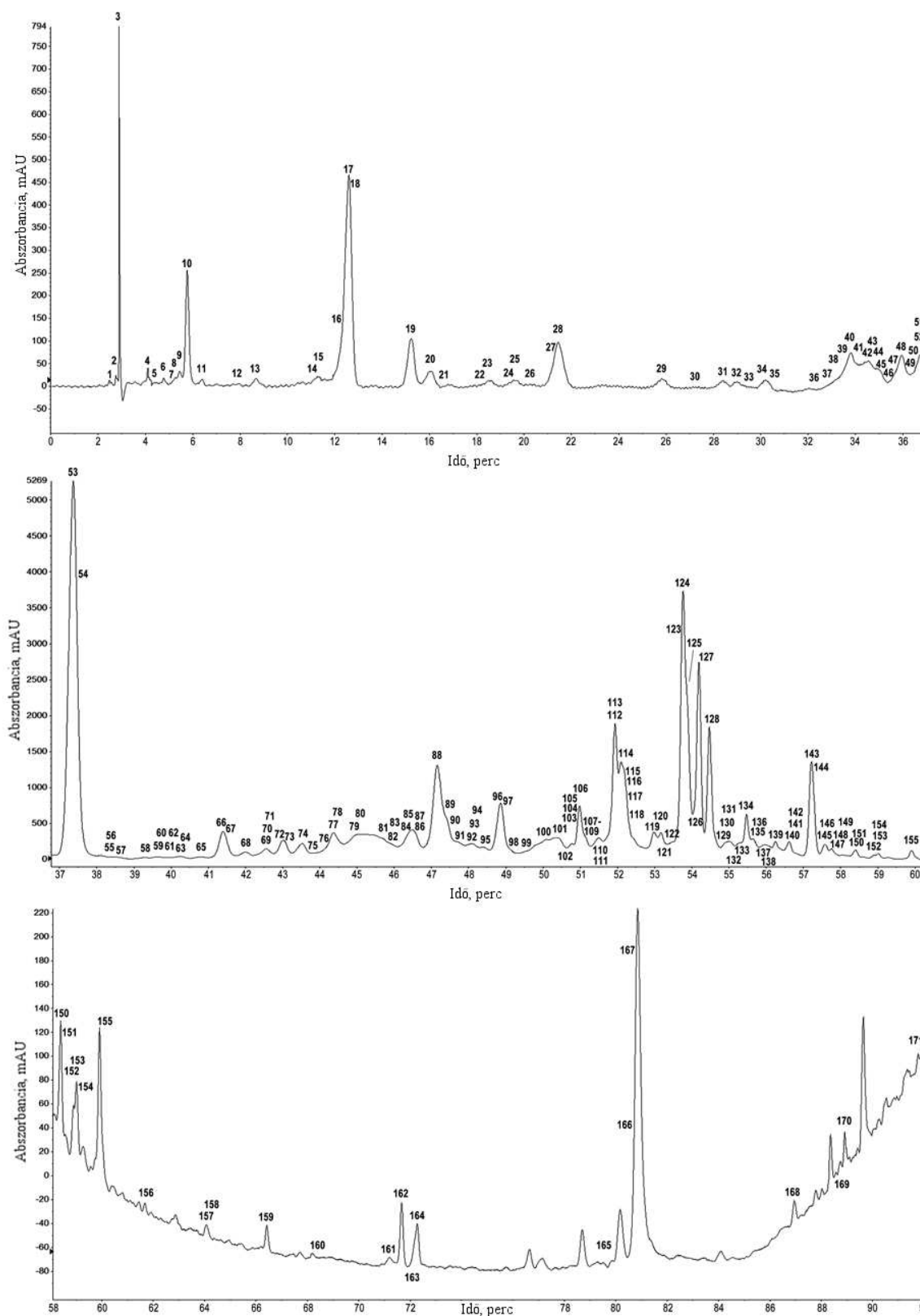
27. ábra A közönséges gyertyán levélkivonatából mért paraméterek szezonális változása.

Az **27. ábra** azt szemlélteti, hogy a legjobb antioxidáns kapacitás értékek késő nyáron/kora őszelel mérhetők. A szelídgesztenye és a molyhos tölgy esetében is hasonló tendencia észlelhető, azonban a flavonoid-tartalmuk alacsonyabb, a flavan-3-ol-tartalmuk pedig kismértékben magasabb a gyertyánénál.

A vizsgált fajok különböző hónapokban mutatják a legnagyobb antioxidáns kapacitásukat, amit figyelembe kell venni a levelek felhasználás céljából történő begyűjtésénél.

5.1.3. Közönséges gyertyán levél polifenoljainak HPLC-PDA-MS/MS elválasztása és azonosítása

A kiválasztott fajok közül a közönséges gyertyán mutatta a legnagyobb antioxidáns kapacitás értékeket. Korábbi kutatások kimutatták már, hogy ennek a fajnak a levelei értékes nyersanyagok lehetnek. Kuiters és Sarink (1986) a közönséges gyertyán októberi avarának extraktumaiban más fajokkal összehasonlítva jelentősen magasabb összes polifenol-tartalmat és nagy mennyiségű fenolos savat találtak, Cieckiewicz et al. (2012) a fiatal levelek jelentős rákellenes hatásait tanulmányozták. Ezek alapján döntöttem amellett, hogy az augusztusi levélkivonat esetében feltérképezem, hogy milyen vegyületek tehetők felelőssé az antioxidáns hatásért. A folyadékkromatográfiás elválasztás után detektorként diódasoros detektort és tömegspektrométert használtam. Az UV-detektálás 250 és 380 nm közötti tartományának kromatogramja a **28. ábrán** található. Az azonosított komponensek a retenciós időkkel és MS/MS fragmensekkel feltüntetve az **VI. Mellékletben** találhatók.



28. ábra A közönséges gyertyán levélkivonatának HPLC elválasztása és PDA (250-380 nm) kromatogramja.

A gyertyán levelét célzó korábbi kutatások fenolos savakat (galluszsav, gentizinsav, vanillinsav, protokatechusav, *p*-kumarinsav, *o*-kumarinsav) és aldehideket (*p*-hidroxibenzaldehid, sziringaldehid) is azonosítottak szililezési származékképzés

segítségével gázkromatográfiás elválasztással és lángionizációs detektálással (Kuiters és Sarink, 1986). Mivel azonban ezek a mérések már lehullott, részben bomlásban lévő levelekből történtek, az általuk azonosított vegyületek lehetnek bomlástermékek is.

A HPLC kromatogram és az egyes vegyületek tömegspektrumainak kiértékelése alapján megállapítottam, hogy jelentős mennyiségű polifenolos vegyület található a kivonatban, többek között fenolos savak, ellagitanninok, gallotanninok, flavonoidok, katechinek, procianidinek. Számos vegyületet nem sikerült azonosítani a kapott fragmentációs tömegspektrumok alapján, mivel azok nem tartalmaztak elég információt az egyértelmű szerkezeti jegyek igazolására. Az ismeretlen vegyületeket is feltüntettem a táblázatban, az $[M-H]^-$ anyaionjukkal és fragmenseikkel együtt. Összességében 171 vegyület leírására került sor (az ismeretlennek megjelölt vegyületekkel együtt), mely alapjául szolgálhat a gyertyán levél bioaktív vegyületeinek további tanulmányozásához.

A fenolos savak és a flavonoidok általában glikozidok formájában fordulnak elő a levélkivonatban. A leggyakoribb cukorrészek, amelyek a fenolos vázhoz kötődnek, a pentózok, hexózok és a ramnóz. A cukorrészek azonosítása fragmenseik segítségével történt. A $[M-H-120]^-$ és $[M-H-162]^-$ semleges veszteségek (hexozil-egység) és $[M-H-180]^-$ (egy hexóz vesztese) hexóz cukorra vezethetők vissza. A $[M-H-132]^-$ és $[M-H-150]^-$ veszteségek pedig pentóz cukorral történő konjugációra utalnak. A ramnóz egység leválásra pedig többek között a $[M-H-146]^-$ semleges veszteségből lehet következtetni.

A cukorrész kétféleképpen is kötődhet a fenolos vázhoz: C- vagy O-glikozidos módon. A két kapcsolódási mód megkülönböztetése a fragmentáció mintája alapján lehetséges (Cuyckens és Claeys, 2004, Vukics és Guttman, 2010).

Az azonosított vegyületeket anyagcsoportok szerint tárgyalom az alábbiakban, kitérve az MS/MS tömegspektrum alapján történő szerkezeti azonosítás főbb jegyeire.

5.1.3.1. *Fenolos savak és származékaik*

A gyertyán levelében talált fenolos vegyületek közül a legelterjedtebbek a fenolos savak, és ezek származékai. Glikolizált vagy sikimisavval, illetve kinasavval konjugált formában vannak jelen, de pl. a galluszsavat, ellagsavat és az (izo)-vanillinsavat szabad formában is sikerült azonosítani.

Ahogy a kromatogramon is látható (**28. ábra**), a klorogénsav 53-as számmal jelölt izomerjéből (kínasav-O-kávésav észter) jelentős mennyiség található meg, míg a 41, és 66-os számú izomerből jóval kevesebb fordul elő a levélkivonatban. A klorogénsav $[M-H]^-$ anyaionja a 353-as m/z értéknél, valamint a fragmensek 191 [kínasav-H] $^-$, 179 [kávésav-H] $^-$ és 135 m/z -nél [kávésav-H-CO₂] $^-$ jellegzetes molekularészletek, amelyek csak a klorogénsavra és izomerjeire jellemzőek. Nemcsak klorogénsavból, hanem ellagsavból (125) is jelentős mennyiség található meg a kivonatban.

A kávésav-sikimisav észtereket (86; 99) a kávésav molekularészletek (179; 161; 135 m/z), és a sikimát-egység semleges elvesztése $[M-H-156]^- = 179$ m/z , valamint a

sikimisav fragmenseinek ($155\ m/z$ [sikimisav-H-H₂O]⁻, és $111\ m/z$ [sikimisav-H-H₂O-CO₂]⁻) letöredezéséből sikerült azonosítani.

A kromatogramon lévő 42-es csúcs kávéssav-*O*-hexozidként került azonosításra a kávéssav fragmensei, valamint a $[M-H-162]^- = 179\ m/z$ [kávéssav-H]⁻ semleges vesztes segítségével.

A 15-ös, a 16-os és a 18-as csúcsokat a kinasav-hidroxi-dihidrokávéssav észterei izomerjeiként lettek azonosítva, a kinasav-*O*-kávéssav észterhez hasonló fragmensek miatt (353 ; 191 ; 179 ; $135\ m/z$), valamint a $371\ m/z$ -nél $[M-H]^-$ lévő anyaiion következtében. A $371 - 353 = 18\ m/z$ tömegkülönbség két hidrogén- és egy oxigénatommal magyarázható, ami a klorogénsav vázhoz kapcsolódott hozzá.

A 21-es és 24-es csúcsok szintén kinasav-*O*-kávéssav észtereket jelölnek, a 191 és $173\ m/z$ -vel rendelkező kinasav és a 179 és $135\ m/z$ -vel rendelkező kávéssav fragmensek miatt.

Két metoxibenzoessav-*O*-hexozid is azonosításra került (26 ; 27), egyrészt a $183\ m/z$ -t eredményező cukorrész semleges veszteséből $[M-H-162]^-$, valamint az aglikon rész további fragmentálódásából ($168\ m/z$ $[M-H-162-CH_3]^-$, és $139\ m/z$ $[M-H-162-CO_2]^-$).

A sziringsavat *O*-hexozid konjugált formában sikerült detektálni (29 ; 32 ; 35). Az *O*-hexozid részt szintén a semleges veszteséből $[M-H-162]^- = 197\ m/z$ azonosítottam, az aglikon részt pedig a további molekulatöredezésekből: $[sziringsav-H-CH_3]^- = 182\ m/z$, $[sziringsav-H-2CH_3]^- = 167\ m/z$ és $[sziringsav-H-CO_2]^- = 153\ m/z$.

A protokatechusavnak egy *O*-pentozidos formáját találtam a gyertyán levelében (30). A pentóz részt a $153\ m/z$ -nek megfelelő semleges vesztes $[M-H-132]^- = [protokatechusav-H]^-$ alapján, a protokatechusavat a molekula további fragmentációja ($[protokatechusav-H-H_2O]^- = 135\ m/z$ és $[protokatechusav-H-CO_2]^- = 109\ m/z$ alapján sikerült meghatározni.

Kuiters és Sarink (1986) eredményeivel ellentétben sziringaldehidet nem találtam a levélkivonatban, azonban szinapaldehidet (melyet az előbbi két kutató nem mutatott ki) igen (58).

5.1.3.2. **Tanninok**

A közös gyertyán levélkivonatában számos hidrolizálható tannin, gallotannin és ellagitannin megtalálható. A gallotanninok a jellegzetes 169 és $125\ m/z$ -s MS/MS fragmenseikből azonosíthatók, amelyek rendre a $[galluszsav-H]^-$ és $[galluszsav-H-CO_2]^-$ tömegvesztéseknek felelnek meg. A változatos számú galloil-egység glükóz molekulához kapcsolódik, melynek fragmensei szintén megfigyelhetők a tömegspektrumokban. A galloil rész azonosítása a tömegspektrum alapján a $152\ m/z$ -s tömegkülönbség, valamint a galluszsav ($170\ m/z$) semleges vesztes segítségével történt. Az ellagitanninok esetében az iránymutató fragmension a $301\ m/z$ [ellagsav-H]⁻ volt, valamint az egy vagy több HHDP (hexahidroxi-difenoil-egység) elvesztése, amely

a tipikus $[M-H-302]^-$ fragmensionot illetve a 302 m/z tömegvesztések sorozatából keletkező fragmensionokat eredményezte a spektrumon (Sanz et al., 2010). A nagyméretű ellagitanninok gyakran dupla töltésű molekulaionokat képeztek ($[M-2H]^{2-}$), amely abból igazolható, hogy a molekulaion esetében izotópcsúcsok (1 m/z helyett 0,5 m/z) jelentek meg. A gallotanninok és ellagitanninok esetében is tipikus fragmensionok voltak a 313 m/z -vel $[galloil-glükóz-H_2O]^-$ és a 331 m/z -vel $[galloil-glükóz-H]^-$ rendelkező molekularészletek.

A monogalloil-glükózokat (5; 8; 11; 12; 31) a 331 m/z -s molekulaionokból, valamint a 169 és 125 m/z -vel jellemezhető fragmensionokból (galluszsavból), valamint a 120-as (211 m/z) és 162-es (169 m/z) semleges vesztesékből (hexóz) azonosítottam.

A 633 m/z -s molekulaionnal rendelkező galloil-HHDP-glükózt (73) a 463 m/z -s $[M-H-galluszsav]^-$ és 331 m/z -s $[M-H-HHDP]^-$ fragmensionok alapján írtam le.

A 483 m/z -s molekulaionnal rendelkező digalloil-glükóz izomereket (53; 137) a 313 m/z -s $[M-H-galluszsav]^-$, valamint a 169 és 125 m/z -s fragmensionok azonosították (Wang et al., 2011).

A 785 m/z -s molekulaionnal rendelkező digalloil-HHDP-glükóz izomerek a 615 m/z -s $[M-H-galluszsav]^-$, a 313 m/z -s $[M-H-galluszsav-HHDP]^-$ és a 301 m/z -s molekularészletek alapján kerültek meghatározásra.

Egy digalloil-bisz-HHDP-glükóz molekula (139) is volt a levélkivonatban, 1087 m/z $[M-H]^-$ és 543 m/z $[M-2H]^{2-}$ molekulaionokkal. Jellegzetes fragmensei: 313 m/z -nél $[M-H-HHDP-HHDP-galluszsav]^-$ és 301 m/z -nél $[ellagsav-H]^-$ voltak. Ezt a vegyületet a *Betula pubescens* (Ehrh.) levelében is azonosították, amely a közönséges gyertyánnal közeli rokonságban álló faj (Salminen et al., 1999).

A 635 m/z -s molekulaionnal rendelkező trigalloil-glükózból 4 izomert (59; 77; 83; 91) sikerült detektálni a 483 m/z -s $[M-H-galloil]^-$ és 313 m/z -s $[M-H-galloil-galluszsav]^-$ fragmensek alapján. Két trigalloil-HHDP-glükóz izomer (114; 127) is volt a kivonatban, amelyek a 785 m/z -s duplatöltésű molekulaion $[M-2H]^{2-}$, valamint a 767 m/z -s $[M-H-galluszsav]^-$, 465 m/z -s $[M-H-galluszsav-HHDP]^-$ és 313 m/z -s $[M-H-galluszsav-HHDP-galloil]^-$ fragmensionok által vált beazonosíthatóvá.

Három tetragalloil-glükóz (118; 119; 123) 787 m/z -s molekulaionnal is megtalálható volt a levélkivonatban. A jellegzetes fragmensionok a következők voltak: 635 m/z $[M-H-galloil]^-$, 617 m/z $[M-H-galluszsav]^-$, 465 m/z $[M-H-galluszsav-galloil]^-$, 447 m/z $[M-H-2galluszsav]^-$, és 313 m/z $[M-H-galluszsav-2galloil]^-$.

Három pentagalloil-glükózt is azonosítottam (134; 140; 147) 939 m/z -s és 469 m/z -s $[M-2H]^{2-}$ molekulaionnal. Az azonosításul szolgáló fragmensek: 769 m/z $[M-H-galluszsav]^-$, 617 m/z $[M-H-galluszsav-galloil]^-$, 465 m/z $[M-H-galluszsav-2galloil]^-$, és 313 m/z $[M-H-galluszsav-3galloil]^-$.

Több, nem azonosított galluszsav-származékot is elválasztottam. Az egyik a 345 m/z -s $[M-H]^-$ molekulaionnal rendelkező komponens (19), továbbiak a 461 m/z -vel (149, 150), és a 477 m/z -vel megjelenő molekulaionok (76), valamint a 651 m/z -s (65; 78) és a 969 m/z -s vegyületek. Mindegyikükre jellemző, hogy töredezésük során galluszsav fragmens látható a tömegspektrumon. Nem azonosított ellagitanninok is láthatók a kromatogramon: 935 m/z -s (90), 951 m/z -s (88), 953 m/z -s (101; 112), 1105 m/z -s (113; 116) és 1109 m/z -s (84; 97; 100) $[M-H]^-$ molekulaionokkal, amelyek jellemző fragmensei a galluszsav és az ellagsav. Néhány vegyület esetében (985 m/z (117), 1083 m/z (54; 69), és 1127 m/z (63; 87; 111; 148) $[M-H]^-$ molekulaionokkal) a fragmentáció mintázata nem volt látható, mivel ezen komponensek kis jelintenzitással jelentek meg. Ezek a nem azonosított vegyületek a jövőben további kutatást igényelnek.

Több, kis molekulatömegű galluszsav konjugátumot is leírtam. A kinasav-monogalloil-glükóz észter (62), a kinasav-galluszsav észter (9; 14; 17), és a digalloil-kinasav (52) a galluszsav (125 és 169 m/z) és a kinasav (191 és 173 m/z) jellegzetes fragmentációját mutatta. A sikimisav-galluszsav észter izomerjei (25; 28; 33) a sikimát-egység semleges $[M-H-156]^- = 169$ m/z , és a galloil-egység (169 és 125 m/z) elvesztése, valamint a sikimisav fragmensei (155 és 111 m/z) alapján váltak azonosíthatóvá.

A metil-gallát (183) a 168 m/z -s $[M-H-CH_3]^-$ és a 139 m/z -s $[M-H-CO_2]^-$ fragmensionok által került detektálásra. Két galloil-kvercetin izomer (60; 64) is látható a kromatogramon, amelyeket a galluszsav és kvercetin (301, 300 m/z) molekularészletei alapján azonosítottam. A 104-es és 107-es vegyületek kumársav-*O*-galloil-glükóz izomerek (Wang et al., 2011).

A közönséges gyertyán levelében az eukaglobulin (154) is megtalálható, amely egy egyedi monoterpén-glikozid galluszsavval alkotott konjugátuma. Ezt a komponenst az *Eucalyptus globulus* levelében is kimutatták (Boulekbache-Makhlouf et al., 2013).

A **28. ábrán** látható kromatogramon lévő csúcsmagasságok alapján megállapítható, hogy a leggyakoribb tannin típusú vegyületek az ismeretlen ellagitanninok (88; 97; 112; 113), a trigalloil-HHDP-glükózok (114; 127) és a tetragalloil-glükóz.

5.1.3.3. *Flavonoid-glikozidok*

A levélkivonat jelentős mennyiségű flavonoid-glikozidot tartalmazott. Közös jellemzőjük, hogy a flavonoidok *C*- vagy *O*-glikozidos formában kapcsolódnak a cukor molekularészhez. Szabad aglikonokat nem sikerült kimutatnom.

Összesen nyolc kvercetin-*O*-glikozidot azonosítottam, ezek közül öt (89; 93; 106; 126; 135) kvercetin-*O*-hexozid volt 463 m/z -s molekulaionnal, kettő (115; 141) kvercetin-*O*-pentozid (molekulaion: 433 m/z), és egy kvercetin-*O*-ramnozid 447 m/z -s molekulaionnal (143). A galluszsav kvercetinnel alkotott konjugátuma már korábban említésre került (galloil-kvercetin, 60; 64). A kvercetin aglikonként való előfordulása a jellegzetes 301 és 300 m/z -s ionok, valamint a 272; 257 és 255 m/z -s MS/MS

fragmensionok alapján került leírásra. Germanò et al. (2012) a *Betula pendula* (amely faj a gyertyánnal közös családból származik) leveleiben szintén számos kvercetin-glikozidot írtak le.

A miricetin vegyületek közül négy glikozid volt megtalálható a kivonatban. A miricetin aglikon azonosítása a jellegzetes 316; 317, valamint a 287; 271 és 179 m/z -vel rendelkező fragmensionok alapján történt. Összességében két miricetin-*O*-hexozidot (103; 108), egy miricetin-*O*-pentozidot (122) és egy miricetin-*O*-ramnozidot (124) sikerült azonosítani.

A kempferol-glikozidok közül a kempferol-*O*-ramnozid (155) és kempferol-di-*O*-ramnozid (162; 164) kimutatása történt meg. Az aglikon részt a 285; 284; 255 és 227 m/z -vel rendelkező fragmensionok azonosították. A di-*O*-ramnozid molekularészletet a 146-os semleges vesztes ($577 \rightarrow 431 \rightarrow 285 \text{ } m/z$) segítségével sikerült meghatározni, ami azt bizonyítja, hogy az aglikon két különböző *O* atomja glikozilálódott (Cuyckens és Claeys, 2004; Vukics és Guttman, 2010).

A kromatogramon 128-as csúcs jelzi az egyetlen luteolin-glikozidot, a luteolin-*O*-hexozidot. Molekulaionja (447 m/z), és a fragmentálódása is igazolja a vegyületet. Habár a kempferol és luteolin azonos molekulatömeggel rendelkezik, továbbá MS/MS-spektrumuk is nagyon hasonló, ráadásul kempferol-glikozidok azonosítása is megtörtént a kivonatból, a 128-as csúcs egyértelműen a luteolin hexozidja. A kempferol fragmentációs spektrumában a 285 és 284 m/z ionok intenzíven jelennek meg, valamint tartalmazzák a jellegzetes 255 és 227 m/z ionokat. A luteolin fragmentációja szintén intenzív 285 és 284 m/z ionokat eredményez, azonban kisebb intenzitásban sok más fragmension is keletkezik (227; 199; 175; 151; 133 m/z) (Sanchez-Rabaneda et al., 2003).

Két apigenin-glikozid is meghatározásra került. Az egyik egy apigenin-di-*C*-hexozid (81) volt, 593 m/z -s molekulaiionnal $[M-H]^-$. Azt, hogy a cukormolekula valóban *C*-atomon keresztül kapcsolódik az aglikonhoz, az bizonyítja, hogy az MS/MS spektrumban a molekulaiion és a 431 m/z -s $[M-H-162]^-$ fragmension között több cukor fragmens (pl. 503 m/z $[M-H-90]^-$ és 473 m/z $[M-H-120]^-$) csúcs is nagy jelintenzitással jelenik meg, ami a *C*-glikozidok jellegzetessége, az *O*-glikozidokra nem jellemző (Cuyckens és Claeys, 2004; Vukics és Guttman, 2010). A másik *C*-atomon keresztül kapcsolódó hexóz részt a 383 m/z -s ($[M-H-120-90]^-$), és 353 m/z -s ($[M-H-120-120]^-$) fragmensionok segítségével azonosítottam. A vegyület MS/MS spektrum által elvégzett azonosításának eredményét irodalmi adatok alapján is megerősítettem (Benayad et al., 2014).

A másik apigenin-származék apigenin-*O*-hexozid (144), amelyet az *O*-hexozid és az apigenin aglikon karakterisztikus fragmentációja (269; 225; 201; 151; 149 m/z) alapján azonosítottam.

A gyertyán levél-extraktumából összesen három izoramnetin-*O*-glikozidot, közöttük két izoramnetin-*O*-hexozidot (120; 132) és egy izoramnetin-*O*-pentozidot (142) sikerült

identifikálni. Az izoramnetin aglikon jellegzetes csúcsai 315 és 314 m/z -nél látszóttak, ezeken kívül egy metil-csoport elvesztése következtében 300 és 299 m/z -nél is intenzív csúcs látszott a tömegspektrumon.

A **28. ábrán** lévő kromatogramon látszik, hogy a legnagyobb mennyiségben előforduló flavonoid jellegű vegyületek a közönséges gyertyán augusztusi levél-extraktumában a kvercetin-*O*-hexozid (89; 106), a kvercetin-*O*-pentozid (115), a miricetin-*O*-ramnozid (124), a luteolin-*O*-hexozid (128), a kvercetin-*O*-ramnozid (143) és az apigenin-*O*-hexozid (144).

5.1.3.4. *Katechinek és procianidinek*

A katechinek és a polimer procianidinek ((+)-katechin (45), (–)-epikatechin (72), gallokatechin (22), epigallokatechin (38) és a polimer procianidinek (procianidin B dimerek) (39; 43)) kisebb koncentrációban vannak jelen az extraktumokban, mint a fenolos savak és a flavonoid jellegű vegyületek. Ez összhangban van az 5.2.3.-ban ismertetett eredményekkel, miszerint a közönséges gyertyán augusztusi levél-extraktumában a polifenolos vegyületek nagy része nem flavan-3-ol szerkezetű (pl. katechinek, procianidinek).

5.1.3.5. *Ismeretlen vegyületek*

Számos ismeretlen vegyület fragmensionjait is leírtam (**VI. Melléklet**). Ezek közül több *O*-hexozid (1; 20; 36; 37; 67; 68; 71; 96; 102), és két *C*-hexozid (70; 109). Ezeknél csupán a cukorrész jelenlétét, típusát és kapcsolódási módját sikerült meghatározni.

Összefoglalás. *A közönséges gyertyán augusztusi levél-extraktumából összesen 171 vegyület leírását végeztem el MS/MS spektrumok alapján. Ezek között gallotanninok, ellagitanninok, flavonoid-glikozidok, fenolos savak és származékaik, flavan-3-olok és számos adott molekulaionnal rendelkező ismeretlen vegyület található. A legjobb DPPH- és ABTS antioxidáns kapacitással rendelkező augusztusi extraktumban a HPLC-PDA-MS/MS analízis alapján legnagyobb mennyiségben előforduló vegyületek a klorogénsav, ellagsav, ellagitanninok, miricetin-, luteolin-, kvercetin- és apigenin-glikozidok voltak. Feltehetően ezek a vegyületek (vagy ezen vegyületek közül néhány) tehetők felelőssé a kiváló antioxidáns tulajdonságokért.*

A nagyszámú polifenolos vegyület, a jelentős antioxidáns kapacitás alapján kijelenthető, hogy a közönséges gyertyán levelei egy ígéretes, megújuló forrást jelentenek az antioxidáns hatású extraktanyagok kinyerésére, amelyek a jövőben potenciálisan hasznosítható alapanyagok lehetnek. Az azonosított és az MS/MS spektrummal jellemzett vegyületek listája a további kutatásokhoz is alapot szolgáltat.

5.2. Kéregvizsgálatok

5.2.1. A minta-előkészítés optimalizálása

5.2.1.1. A mikrohullámú kezelés hatása

Ebben a mérési sorozatban az *akác*, a *fehér nyár*, a *kocsánytalan tölgy* héjkéregéből és háncsából, valamint a *bükk* háncsából készült extraktumokat vizsgáltam. Mindegyik fafajnál a kéreg és a háncs esetében is készítettem extraktumokat a mikrohullámmal kezelt és nem kezelt mintákból a 4.2.3; a 4.2.4. és a 4.5.4. alapján ultrahangos extrakcióval. Meghatároztam az összes polifenol-tartalmat és az antioxidáns kapacitást DPPH-, FRAP-, és ABTS-módszerrel. Ezek az eredmények a **24. és 25. táblázatban** láthatók.

Az összes polifenol-tartalom eredményei alapján megállapítható, hogy a héjkéreg esetében, az akácnál és a kocsánytalan tölgyenél szignifikánsan nagyobb értékeket mértem a mikrohullámmal nem kezelt minták esetében, a fehér nyárnál azonban nem volt szignifikáns különbség az értékek között. A háncsból készült minták esetében ugyanez mondható el, kivéve a bükk esetében, ahol a mikrohullámú előkezelés hatására enyhén megnőtt a kivonat összes polifenol-tartalma.

Héjkéreg				
Fafaj	Összes polifenol (mg Q/g sz.a.)	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	FRAP (mg AS/ g sz.a.)	ABTS (mg T/g sz.a.)
Akác, M	18,5 ± 1,25 ^a	7,24 ± 0,32 ^c	16,3 ± 1,16 ^a	70,1 ± 1,93 ^a
Akác	29,4 ± 3,13 ^b	5,11 ± 0,46 ^b	19,5 ± 0,86 ^b	103 ± 5,85 ^c
Kocsánytalan tölgy, M	36,9 ± 3,15 ^b	3,81 ± 0,08 ^a	31,8 ± 0,48 ^c	122 ± 8,25 ^d
Kocsánytalan tölgy	71,6 ± 1,20 ^d	3,96 ± 0,10 ^a	29,3 ± 0,76 ^c	86,5 ± 9,19 ^b
Fehér nyár, M	54,8 ± 4,89 ^c	7,06 ± 0,31 ^c	36,6 ± 1,86 ^d	179 ± 2,33 ^f
Fehér nyár	49,2 ± 1,35 ^c	6,88 ± 0,60 ^c	37,2 ± 2,01 ^d	154 ± 2,53 ^e

24. táblázat A héjkéregből készült extraktumok összes polifenol-tartalma és antioxidáns kapacitása mikrohullámmal kezelt (M) és nem kezelt minták esetében. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. A felső indexben lévő eltérő betűk egy adott módszeren belül szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten.

Háncs				
Fafaj	Összes polifenol (mg Q/g sz.a.)	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	FRAP (mg AS/ g sz.a.)	ABTS (mg T/g sz.a.)
Akác, M	3,22 ± 0,14 ^a	155 ± 3,43 ^f	2,01 ± 0,14 ^a	11,3 ± 0,50 ^a
Akác	9,90 ± 0,05 ^c	13,3 ± 1,88 ^c	13,6 ± 0,12 ^c	65,7 ± 0,00 ^c
Kocsánytalan tölgy, M	20,1 ± 0,00 ^d	6,86 ± 0,92 ^{ab}	21,1 ± 0,12 ^d	70,2 ± 2,05 ^c
Kocsánytalan tölgy	46,2 ± 1,39 ^f	4,56 ± 0,13 ^a	44,5 ± 0,12 ^h	133 ± 0,00 ^d
Fehér nyár, M	4,75 ± 0,48 ^b	59,9 ± 1,80 ^e	8,11 ± 0,27 ^b	27,0 ± 0,42 ^b
Fehér nyár	44,1 ± 1,71 ^f	8,83 ± 0,27 ^{abc}	34,6 ± 0,40 ^f	143 ± 4,31 ^e
Bükk, M	42,7 ± 3,00 ^f	11,1 ± 0,90 ^{bc}	36,4 ± 0,67 ^g	147 ± 2,48 ^c
Bükk	28,0 ± 2,15 ^e	18,4 ± 2,00 ^d	23,9 ± 0,60 ^e	n/a

25. táblázat A háncsból készült extraktumok összes polifenol-tartalma és antioxidáns kapacitása mikrohullámmal kezelt (M) és nem kezelt minták esetében. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. A felső indexben lévő eltérő betűk egy adott módszeren belül szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten. Rövidítés: n/a: nem meghatározott.

A **DPPH-értékeinél** a héjkéreg esetében az akácnál a kezelés hatására nő az IC_{50} -érték, vagyis csökken az antioxidáns kapacitás, a kocsánytalan tölgy kezelt és nem kezelt mintájának antioxidáns kapacitása között pedig nincs különbség, ami azért érdekes, mert a nem kezelt minta összes polifenol-tartalma mintegy kétszerese a mikrohullámmal kezeltének. A fehér nyár esetében sincs jelentős hatása az előkezelésnek a minta DPPH antioxidáns aktivitására. A háncsnál azt állapítottam meg, hogy a tölgy esetében nem észlelhető különbség, a bükk esetében a kezelés hatására kismértékben csökken az IC_{50} -érték, azaz nő az antioxidáns kapacitás, míg a többi fafajnál szignifikáns antioxidáns hatás csökkenés tapasztalható az előkezelés hatására.

A **FRAP** antioxidáns meghatározás eredményeit nézve az látható, hogy a héjkéreg esetében az akácnál a mikrohullámú kezelés hatására jelentős antioxidáns kapacitás csökkenés történt, míg a többi fafajnál nincs hatása az előkezelésnek. A háncsnál egyértelmű a mikrohullámú kezelés negatív hatása: a bükk kivételével minden faj esetében a kezelt minták kisebb antioxidáns kapacitást mutatnak.

Az **ABTS** mérés eredményei alapján a héjkéreg esetében a kocsánytalan tölgy és a fehér nyár esetében a kezelt minták nagyobb antioxidáns kapacitást mutatnak. A háncs esetében minden fafajnál nagyobb értékeket mértem kezelés nélkül.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a héjkéregből készült extraktumok antioxidáns kapacitása minden esetben nagyobb, mint a háncs esetében, ami azzal magyarázható, hogy a kéreg a fatörzs első védelmi vonala, és itt van szükség arra, hogy a növény védekezzen a külső káros biotikus és abiotikus hatásokkal szemben (környezeti hatás, rovarjárást stb.) (Lev-Yadun, 2001). Ez a védekezés a nagyobb mennyiségű antioxidáns hatású vegyülettel valósulhat meg.

A héjkéreg és a háncs minták között is a legnagyobb polifenol-tartalommal a kocsánytalan tölgy rendelkezik. A DPPH esetében minden törzsrésznél a tölgy mutatta a legjobb antioxidáns kapacitást, ez így volt a háncsok között a FRAP esetében is, míg a kéreg FRAP-értékei közül a legnagyobbat a fehér nyár esetében mértem. Az ABTS-mérés eredményeinél a legjobb értéket a nyár mutatta minden esetben.

A mikrohullámú enzim inaktiválás ilyen jellegű változatos, sokszor éppen negatív hatása több okkal is magyarázható: az alapul vett módszer esetében (Makk et al., 2013) a teljes enzim inaktiválás mellett a kinyerni kívánt vegyület, a (+)-katechin, nem szenvedett szignifikáns bomlást. Jelen vizsgálatban azonban több vegyület együttes hatását mértem az antioxidáns kapacitások által, és elképzelhető, hogy egyes vegyületek mégis degradálódtak, aminek következtében az antioxidáns kapacitás is csökkent. Emellett a héjkéreg/háncs közti különbségek valamint a különböző fajok kéreg-összetételbeli különbségei is magyarázhatják, hogy miért viselkedett szinte minden minta „egyedi” módon a mikrohullámú inaktiválás során.

A bükk kéreg esetében a mikrohullámú kezelés pozitív hatását alátámasztja a kezelt és nem kezelt háncsból készült extraktumok folyadékkromatográfiás elválasztása során kapott kromatogram is, ami a **VII. Mellékletben** látható. A két kromatogram között

elenyésző a különbség, a mikrohullámmal inaktivált minta esetében a csúcsok magassága kis mértékben magasabb (pl. a kezelt háncs extraktumban a jelintenzitás maximuma 9406 mAU, míg a kezeletlenben 8383 mAU). Ennek alapján az előkezelésnek pozitív hatása van a bükk háncs esetében a benne lévő polifenolok megőrzésére.

Összefoglalás. *Az eredmények alapján a mikrohullámú előkezelés hatására vagy nincs szignifikáns különbség a kezelt és nem kezelt kéregminták polifenol-tartalma és antioxidáns kapacitása között, vagy a kezelés hatására jelentősen csökkentek ezek az értékek. A fajok között kivételnek számít a bükk háncsa, ahol minden esetben kismértékű pozitív, polifenol-tartalmat és antioxidáns kapacitást növelő hatása volt az előkezelésnek. Az ABTS értékeknél is pozitív hatás mutatható ki a kéregnél a tölgy esetében, itt a kezelés hatására megnőtt az antioxidáns kapacitás értéke, de a háncsnál már az előbb leírt csökkenés tapasztalható.*

Ebből a mérési sorozatból azt állapítottam meg, hogy a kéreg esetében ez az előkezelés erősen fajfüggő. Egyes fajoknál nem okoz szignifikáns változást a mért paraméterekben, más fajoknál csökkenti az antioxidáns hatású anyagok mennyiségét. Az utóbbi esetben ezzel a módszerrel valószínűleg nem lehetséges és nem is szükséges a polifenolokat oxidáló enzimeket inaktiválni, sőt a túlzott mikrohullámú kezelés hatására az antioxidáns tulajdonságokért felelős vegyületek is károsodnak, így már nem járulnak hozzá a szövet antioxidáns hatásához. Ezen ismeretek alapján a továbbiakban (a bükk kivételével) nem alkalmaztam mikrohullámú kezelést a kéregminták előkészítésénél.

5.2.1.2. *Extrakciós módszer és oldószer optimalizálása*

Az extrakciós módszer és oldószer optimalizálását a bükk kéreg esetében végeztem el. A mintavétel 2014. januárjában történt **(9. táblázat)**. Azért erre a fajra esett a választásom, mert ez a faj Magyarországon jelentős területet foglal el, körülbelül 111.300 hektárt, valamint Európában a leggyakrabban előforduló kemény lombos fafaj (Zell et al., 2004). Ezenkívül széles körben elterjedt alapanyag a bútoriparban, ahol furnérlemezt, forgácslemezt, bútorokat gyártanak belőle, ezen kívül impregnált vasúti talpfák készítéséhez is felhasználják (Vek et al., 2013). A gyártási folyamatok során jelentős mennyiségű kéreghulladék keletkezik, emiatt szinte korlátlan mennyiségben rendelkezésre áll. A bükk kéreg kémiai összetételét, illetve hasznosítási lehetőségét tekintve a szakirodalom felettébb hiányos, ezért végeztem erre a mintára külön is részletes vizsgálatokat.

Kísérleteim során a háncs mintákat mikrohullámú kezelésnek vettem alá az 5.2.1.1. fejezet eredményei alapján. Az extrakciókhoz háromféle oldószert alkalmaztam, és később ezek közül választottam ki az optimális összetételűt olyan módon, hogy mindegyik oldószerezrel készült kivonat esetében összehasonlítottam az antioxidáns kapacitás értékeket. A háromféle oldószer metanol:víz 80:20 v/v%, etanol:víz 80:20 v/v% és víz volt. Azért ezekre esett a választásom, mert a metanol és etanol

alkalmassága bizonyított növényi kivonatok készítésénél, a tiszta víz pedig környezetvédelmi és gazdaságossági megfontolások miatt tűnt alkalmasnak.

A kivonatok előállítása során három különböző módszert (ultrahangos extrakció, mágneses kevertetés, mikrohullámú extrakció) alkalmaztam különböző hőmérséklet és időbeállítások mellett (**26. táblázat**). A kivonatokból meghatároztam a polifenol-tartalmat, és az antioxidáns-kapacitásokat (DPPH-, FRAP-, ABTS-módszerrel).

	Mágneses kevertetés	Mikrohullámú extrakció	Ultrahangos extrakció
Idő	2; 5 és 24 óra	10 és 20 perc	10; 20 és 30 perc
Oldószer	metanol:víz 80:20 v/v% / etanol:víz 80:20 v/v% / víz		
Hőfok	Szobahőmérséklet	60; 80; 100 és 120 °C	Szobahőmérséklet

26. táblázat Extrakciós módszerek optimalás a bükk kéreg esetében.

A **27. táblázatban** a különböző módon elkészített kivonatok **összes polifenol-tartalma** látható. A legjobb eredményeket mágneses kevertetésnél az 5 órás, etanol:víz 80:20 v/v% oldószerrel készült extraktumoknál kaptam. Ezen oldószer esetében nincs szükség a 24 órás kevertetésre, mivel statisztikailag nincs szignifikáns különbség az 5 órás és a 24 órás extrakció között. Hosszabb extrakciós idő alkalmazása azért sem javasolt, mert ez a polifenol-tartalom csökkenéséhez vezethet (ld. vizes extrakció 5 óra → 24 óra), ami feltételezhetően a fenolos vegyületek bomlásával magyarázható (Hofmann et al., 2015a). Az ultrahangos extrakció esetében is a leghatékonyabb oldószer az etanol:víz 80:20 v/v% volt, ennél a módszernél az optimális extrakciós időtartam 20 perc, hosszabb idő alatt itt is az előbbieken leírt csökkenés tapasztalható.

A mikrohullámú extrakció esetében az extrakció időtartamának és hőmérsékletének növelésével szignifikánsan nő a kivonatok polifenol tartalma. Az etanol:víz 80:20 v/v% elegy némileg hatékonyabb oldószernek bizonyult ugyanannyi idő alatt, mint a metanolos. Ennél az extrakciós technikánál a víz is nagyon hatásosnak mutatkozott, különösképpen 120 °C-on, ahol az elkészült kivonat polifenol tartalma kismértékben, de meghaladta a szerves elegyét, kivéve 20 perc esetén. A nagy nyomáson és hőmérsékleten alkalmazott vízről már korábban bebizonyosodott, hogy képes olyan hatékonysággal kivonni a polifenolokat a növényi szövetekből, mint az alkoholos oldószerek (Co et al., 2012). Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy magas hőmérsékleten a víz polaritása csökken, és így „szerves oldószerként” fog viselkedni, vagyis a polifenolok sokkal jobban fognak benne oldódni. Továbbá a magas hőmérséklet hatására az extraktanyagok jobban ki tudnak jutni a növényi szövetekből, ezzel az összes polifenol-tartalom is ugyanúgy megnő, mint az alkoholt tartalmazó oldószereknél. Azonban a túl magas hőmérséklet, és a túl hosszú extrakciós időtartam a kinyert komponensek bomlását okozhatja (Hofmann et al., 2015b), ezért fontos megtalálni az ideális paramétereket a leghatékonyabb kinyerés érdekében.

Az összes polifenol-tartalom mérések során, szobahőmérsékleten az etanolos oldószer volt a leghatékonyabb a polifenolok kivonása. A módszerek közül a

mikrohullámú extrakció bizonyult a leghatásosabbnak, ezt követte az ultrahangos és mágneses kevertetés módszere.

<i>Mágneses kevertetés</i>				
<i>t (h)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>	
2	35,8 ± 3,36 ^{bc}	36,8 ± 2,27 ^c	32,0 ± 0,93 ^{ab}	
5	36,4 ± 2,12 ^{bc}	48,3 ± 1,19^e	34,2 ± 1,17 ^{bc}	
24	43,00 ± 1,99 ^d	46,4 ± 2,46 ^{de}	29,3 ± 2,44 ^a	
<i>Ultrahangos extrakció</i>				
<i>t (perc)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>	
10	39,9 ± 3,17 ^{bc}	49,9 ± 1,12^d	35,1 ± 0,32 ^{ab}	
20	42,7 ± 3,00 ^{bcd}	48,9 ± 1,70^d	39,4 ± 0,72 ^{bc}	
30	30,9 ± 1,03 ^a	44,5 ± 2,30 ^{cd}	37,2 ± 0,22 ^{abc}	
<i>Mikrohullámú extrakció</i>				
<i>t (perc)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>
10	60	40,5 ± 0,75 ^{abc}	43,0 ± 0,98 ^{bcd}	38,7 ± 1,26 ^{ab}
20		42,5 ± 2,70 ^{bc}	45,4 ± 1,85 ^{bcd}	47,0 ± 0,33 ^{cdef}
10	80	46,0 ± 0,99 ^{bcd}	46,4 ± 0,92 ^{bcd}	39,9 ± 0,38 ^{abc}
20		47,5 ± 1,61 ^{cdef}	53,6 ± 2,92 ^{efg}	34,0 ± 0,67 ^a
10	100	43,9 ± 0,93 ^{bcd}	47,3 ± 1,71 ^{cdef}	44,1 ± 0,59 ^{bcd}
20		44,6 ± 0,67 ^{bcd}	45,6 ± 1,55 ^{bcd}	50,9 ± 1,12 ^{defg}
10	120	55,1 ± 2,07 ^{fg}	57,3 ± 4,09^{gh}	57,1 ± 0,38^{gh}
20		58,1 ± 0,37^{gh}	65,2 ± 5,57^h	57,7 ± 0,40^{gh}

27. táblázat A különböző extrakciós módszerekkel kapott bükk kéreg kivonatok összes polifenol-tartalma (mg kvercetin/g szárazanyag). Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. A módszereken belül a felső indexben lévő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,001$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek egy extrakciós módszer esetében a legnagyobb értékeket jelölik.

A polifenol mérési eredmények önmagukban nem elegendőek a kivonatok antioxidáns képességének leírásához, hiszen az egyes polifenolok más-más antioxidáns hatással rendelkeznek, amit tovább modulálnak az egyes vegyületek közti szinergista hatások is (Pietarinen et al., 2006). Ezért szükséges az antioxidáns kapacitás értékeket több egymást kiegészítő módszerrel meghatározni.

A **28. táblázatban** láthatók a **DPPH-értékek** a különböző extrakciós módszerek esetében. Mágneses kevertetés esetében a legjobb antioxidáns képességet mutató extraktum 24 óra alatt a metanol:víz 80:20 v/v% eleggyel készült, ezt követi az 5 órás vizes kivonat. A két eredmény között szinte elhanyagolható a különbség, ez alapján az 5 órás extrakció is elegendő a gyökfogó vegyületek kioldásához, sőt vizes extrakció esetében ennél hosszabb idő nem is javasolt az IC₅₀-érték növekedése miatt, ami feltételezhetőleg a polifenolok bomlásával magyarázható. Az ultrahangos extrakciónál a 10 percnél hosszabb extrakciós idő már az antioxidáns-képesség csökkenését (az IC₅₀-érték növekedését) idézte elő a szerves oldószert tartalmazó extrahálószeres esetében. Ennél a módszernél a szerves oldószert tartalmú elegyek bizonyultak a

leghatékonyabbnak (10 perc), míg a vízzel történt extrakció csak 20 perc után eredményezett ugyanolyan antioxidáns kapacitású extraktumot.

<i>Mágneses kevertetés</i>				
<i>t (h)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>	
2	14,4 ± 2,35 ^{ab}	15,7 ± 1,76 ^b	15,5 ± 2,61 ^b	
5	11,8 ± 1,55^a	12,9 ± 1,34 ^{ab}	11,5 ± 1,43^a	
24	11,6 ± 0,88^a	14,0 ± 1,45 ^{ab}	33,6 ± 2,98 ^c	
<i>Ultrahangos extrakció</i>				
<i>t (min)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>	
10	8,16 ± 0,59 ^{ab}	7,45 ± 0,07^b	12,7 ± 0,50 ^d	
20	11,1 ± 0,90 ^{cd}	9,62 ± 0,11 ^{ac}	9,69 ± 1,10 ^{ac}	
30	15,3 ± 0,59 ^e	8,44 ± 0,10 ^{ab}	9,05 ± 0,47 ^{ab}	
<i>Mikrohullámú extrakció</i>				
<i>t (min)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>
10	60	18,3 ± 1,82 ^{de}	18,7 ± 0,29 ^{def}	22,2 ± 2,15 ^f
20		21,2 ± 1,16 ^{ef}	18,1 ± 2,00 ^{de}	13,5 ± 0,44 ^{abc}
10	80	14,1 ± 0,83 ^{abc}	16,2 ± 0,36 ^{cd}	13,2 ± 0,99 ^{abc}
20		15,4 ± 1,19 ^{bcd}	13,0 ± 1,72 ^{abc}	13,5 ± 0,98 ^{abc}
10	100	12,3 ± 0,85 ^{ab}	12,2 ± 0,54 ^{ab}	12,8 ± 1,09 ^{abc}
20		13,6 ± 0,46 ^{abc}	12,6 ± 0,57 ^{abc}	13,6 ± 0,19 ^{abc}
10	120	11,3 ± 1,00^a	11,8 ± 0,70 ^{ab}	11,2 ± 0,98^a
20		13,5 ± 1,43 ^{abc}	13,0 ± 0,51 ^{abc}	13,2 ± 1,38 ^{abc}

28. táblázat A különböző extrakciós módszerekkel kapott bükk kéreg kivonatok DPPH antioxidáns kapacitás értékei (átlag ± szórás, IC₅₀, µg/ml). A módszereken belül a felső indexben lévő különböző kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,02$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek egy extrakciós módszer esetében a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják.

A mikrohullámú extrakció esetében nincs szignifikáns különbség az időtartamok között egy adott oldószer és hőmérséklet esetében (kivéve a víz, 60 °C, 10 perc és 20 perc között). A hőmérséklet emelésével egyértelműen növekszik az extraktumok gyökfogó képessége. Ennél a módszernél mindhárom oldószer hasonló hatékonyságúnak bizonyult.

A DPPH-módszerrel meghatározott IC₅₀ antioxidáns kapacitás értékek alacsonyabbak annál, amit Fazli et al. (2013) mértek az acetón:víz 50:50 v/v% arányú elegyével készült bükk kéreg extraktum esetében (92,19 µg/ml). Az általam mért DPPH-értékek összevethetők más fajok kérgében mérhető DPPH IC₅₀ értékeivel: a *Calocedrus formosana* ((Florin) Florin) esetében 23,0 µg/ml-t, a *Quercus* spp. mintából 33,7 µg/ml-t mértek a kutatók, a *Juniperus oxicedrus* (L.) metanolos extraktumából 1,1 µg/ml-t, a vizes extraktumból pedig 10,3 µg/ml-t határoztak meg a kutatók (Wang et al., 2004; Fazli et al., 2013; Chaouche et al., 2015).

A **29. táblázat** foglalja össze a **FRAP-mérés** eredményeit a különböző extrakciós módszerek esetében. A mágneses kevertetéssel meglepően magas értékeket kaptam, főleg az etanolos oldószer esetében: alig 5 óra elegendő volt, hogy a legtöbb antioxidáns hatású anyag kioldódjon, míg a metanolos oldószerrel 24 órára volt szükség

ugyanekhez. A tiszta víz volt a legkevésbé hatékony: az 5 óránál tovább tartó kevertetés nem növelte szignifikánsan az extraktum antioxidáns kapacitását.

Az ultrahangos extrakciónál a legjobb FRAP értékeket a 10 perc (alkohol tartalmú kivonatok) illetve a 20 perc (vizes kivonat) extrakciós idők mellett kaptam, azonban ezek az értékek nem haladták meg a kevertetéssel kapott kivonatok FRAP antioxidáns kapacitását. A DPPH- és FRAP-módszer esetében a kevertetés és az ultrahangos extrakció eltérő hatékonyságúnak bizonyult. Ez feltételezhetőleg a kivonatokban található antioxidáns hatású molekulákra. Ahogy majd a továbbiakban is leírásra kerül (ld. 5.2.2.2 fejezet), az ultrahangos módszerrel készült kivonatok (10 és 20 perces, etanol:víz 80:20 v/v%) gazdagabbak (–)-epikatechinben és procianidinekben, míg a kevertetéssel kapott kivonatban (5 óra, etanol:víz 80:20 v/v%) kevesebb található meg ezekből a vegyületekből, de több taxifolin-*O*-glikozid és számos egyéb vegyület van benne. Az eredmények szintén igazolják azt a tapasztalatot, mely szerint egy komplex növényi kivonat antioxidáns tulajdonságainak jellemzésére többféle, egymást kiegészítő módszert szükséges alkalmazni.

<i>Mágneses kevertetés</i>				
<i>t (h)</i>		<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>
2		35,6 ± 2,97 ^d	33,5 ± 2,43 ^{cd}	28,0 ± 1,50 ^a
5		30,8 ± 2,42 ^{abc}	48,0 ± 3,18^f	31,7 ± 2,03 ^{bc}
24		42,9 ± 2,20^e	43,4 ± 2,39^e	28,7 ± 1,49 ^{ab}
<i>Ultrahangos extrakció</i>				
<i>t (perc)</i>		<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>
10		35,4 ± 3,03^b	36,9 ± 2,34^b	27,7 ± 3,50 ^a
20		36,4 ± 0,67 ^b	38,3 ± 1,42^b	37,3 ± 0,94^b
30		27,2 ± 2,17 ^a	35,3 ± 0,84 ^b	34,9 ± 1,15 ^b
<i>Mikrohullámú extrakció</i>				
<i>t (perc)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>
10	60	37,4 ± 3,00 ^{abcde}	35,0 ± 1,99 ^{abc}	34,9 ± 2,66 ^{ab}
20		41,2 ± 2,70 ^{bcdef}	48,6 ± 3,68^{ghi}	46,0 ± 1,71^{fghi}
10	80	44,3 ± 2,35 ^{efghi}	43,9 ± 3,74 ^{defghi}	35,5 ± 0,94 ^{abc}
20		49,0 ± 4,20^{hi}	44,3 ± 0,51 ^{efghi}	31,2 ± 0,90 ^a
10	100	42,0 ± 2,11 ^{bcdefgh}	41,8 ± 3,23 ^{bcdefg}	35,8 ± 0,62 ^{abc}
20		49,7 ± 3,44ⁱ	42,1 ± 1,87 ^{cdefgh}	38,2 ± 1,11 ^{abcde}
10	120	36,7 ± 1,36 ^{abcd}	39,1 ± 2,54 ^{bcdef}	45,9 ± 0,91^{fghi}
20		41,1 ± 2,83 ^{bcdef}	40,3 ± 2,81 ^{bcdef}	45,4 ± 2,73^{fghi}

29. táblázat A különböző extrakciós módszerekkel kapott bükk kéreg kivonatok FRAP antioxidáns kapacitás értékei (átlag ± szórás, mg aszkorbinsav/ g szárazanyag). A módszereken belül a felső indexben lévő különböző kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,02$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek egy extrakciós módszer esetében a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják.

A FRAP-módszer esetében a kevertetés mellett a mikrohullámú extrakció is nagyon hatékonynak bizonyult. Adott oldószernél különböző időtartam szükséges a legjobb antioxidáns kapacitás eléréséhez. A metanolos extraktumok a legjobb értékeket 80 és

100 °C-on 20 perc mellett mutatták, míg az etanolos oldószer esetében 60 és 100 °C-on, 20 perc extrakciós idő alatt volt elérhető a legnagyobb antioxidáns kapacitás. Tiszta vízzel is közel hasonló eredmények érhetők el 120 °C-on, 20 perc alatt. Ennél az extrakciós módszernél is megfigyelhető, hogy a hosszabb időtartam és a megemelt hőmérséklet nem növeli egy bizonyos ponton túl a kivonatok antioxidáns kapacitását, inkább a csökkenés jellemző.

Az irodalomban található eredményekkel összehasonlítva a bükk kéregre kapott eredményeim magasabb értékűeknek bizonyulnak az *Eucalyptus globulus* esetében mért 4,7–11,9 mmol aszkorbinsav/100 g száraz kéregnél, ami átszámolva 8,2–20,9 mg aszkorbinsav/g száraz kéreggel egyenértékű (Vázquez et al., 2012).

A **30. táblázat** foglalja össze az **ABTS-mérés** eredményeit a különböző extrakciós módszerek esetében. A mágneses kevertetéssel kapott extraktumok ABTS-eredményei a FRAP-mérés eredményeihez hasonlóak: a metanolos és etanolos kivonat esetében a legnagyobb antioxidáns kapacitást rendre 24 és 5 órás extrakcióval értem el. A víz sem a mágneses kevertetés, sem az ultrahangos extrakció esetében nem volt olyan hatékony, mint a szerves oldószerek.

<i>Mágneses kevertetés</i>				
<i>t (h)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>	
2	120 ± 9,13 ^a	121 ± 4,42 ^a	105 ± 5,92 ^b	
5	119 ± 8,64 ^a	165 ± 8,39^d	113 ± 7,27 ^{ab}	
24	158 ± 5,62^{cd}	149 ± 2,94 ^c	110 ± 3,39 ^{ab}	
<i>Ultrahangos extrakció</i>				
<i>t (perc)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>	
10	136 ± 2,38 ^{bc}	120 ± 6,45 ^{ab}	119 ± 7,60 ^a	
20	147 ± 2,48 ^c	150 ± 2,84^c	128 ± 3,63 ^{ab}	
30	113 ± 5,09 ^a	147 ± 5,38^c	127 ± 7,19 ^{ab}	
<i>Mikrohullámú extrakció</i>				
<i>t (perc)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>metanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>etanol:víz 80:20 v/v%</i>	<i>víz</i>
10	60	146 ± 4,26 ^{cd}	148 ± 0,99 ^{cdef}	116 ± 2,36 ^a
20		153 ± 1,68 ^{defg}	153 ± 4,10 ^{defg}	164 ± 3,96^{efg}
10	80	144 ± 4,04 ^{cd}	139 ± 3,50 ^{bcd}	136 ± 10,31 ^{bcd}
20		146 ± 0,96 ^{cde}	143 ± 4,01 ^{cd}	138 ± 4,73 ^{bcd}
10	100	137 ± 6,37 ^{bcd}	151 ± 6,64 ^{cdefg}	134 ± 7,82 ^{bc}
20		151 ± 4,71 ^{cdefg}	142 ± 1,73 ^{cd}	121 ± 8,17 ^{ab}
10	120	147 ± 3,45 ^{cde}	143 ± 7,02 ^{cd}	164 ± 4,50 ^{efg}
20		166 ± 2,45^g	139 ± 7,61 ^{cd}	166 ± 4,69^{fg}

30. táblázat A különböző extrakciós módszerekkel kapott bükk kéreg kivonatok ABTS antioxidáns kapacitás értékei (átlag ± szórás, mg trolox/ g szárazanyag). A módszereken belül a felső indexben lévő különböző kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,02$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek egy extrakciós módszer esetében a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják.

Az ultrahangos módszernél a legjobb értékeket 10 és 20 perc alatt kaptam, rendre a metanol- illetve az etanol-tartalmú extrahálószerrel.

A FRAP-mérésnél kapott eredményekhez hasonlóan a kevertetéssel és a mikrohullámú extrakcióval kapott kivonatok mutatták a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket. Az utóbbi módszer esetében a hőmérséklet emelkedésével a metanolos kivonatoknál enyhe antioxidáns kapacitás növekedés figyelhető meg, míg az etanolos kivonatoknál nincs szignifikáns különbség a különböző hőmérsékleten nyert kivonatok ABTS értéke között. A vizes kivonatok antioxidáns kapacitása a hőmérséklettel és az extrakció időtartamával arányosan növekedett.

Az irodalomban található más tartós faanyagot szolgáltató fajok adataival összehasonlítva megállapítható, hogy a bükk kéreg magas ABTS antioxidáns kapacitással rendelkezik. Pl. *Quercus* spp. faanyaga esetében 0,21-0,64 $\mu\text{mol T/mg}$ értéket mértek, ami 52,5-160 mg T/g szárazanyagnak felel meg, valamint a *Castanea* spp. faanyaga esetében 0,60 $\mu\text{mol T/mg}$ -ot kaptak, ami 150 mg T/g szárazanyagnak felel meg, és a *Prunus* spp. faanyaga esetében 0,07 $\mu\text{mol T/mg}$ volt az ABTS antioxidáns kapacitás értéke, ami 17,5 mg T/g szárazanyagnak felel meg (Alañón et al., 2015).

Összefoglalás. *Megállapítható, hogy szobahőmérsékleten az etanolos oldószerrel készült kivonatok gazdagabbak voltak antioxidáns vegyületekben, mint az ugyanolyan körülmények között készült metanolos kivonatok. Megnövekedett nyomás és hőmérséklet paraméterek mellett a víz is képes olyan hatékony kivonószerként viselkedni, mint az alkoholos elegyek. Ezáltal a jövőben lehetővé válhat olyan környezetbarát extrakciós technológia alkalmazása, amelynek segítségével a bükk, vagy más fafajok kérgéből és egyéb szöveteiből az antioxidáns jellegű vegyületek kinyerhetők.*

A mérési eredmények azt bizonyítják, hogy erdei fák kérgéből készített kivonat esetében nem elegendő egyféle módszert alkalmazni az antioxidáns paraméterek jellemzésére: minden módszer specifikus valamilyen vegyületcsoportra, vagy éppen valamilyen vegyületcsoport meghatározása gátolt az adott módszerrel. Ezért nagyon fontos, hogy több módszert alkalmazzunk, és ezzel pontosabb képet kapjunk a növényi kivonatok valódi antioxidáns tulajdonságairól. Az eredmények alapján a DPPH-féle antioxidáns kapacitásért felelős vegyületek az ultrahangos módszerrel nyerhetők ki a leghatékonyabban, míg a FRAP-módszer esetében a mikrohullámú extrakció, az ABTS esetében pedig a kevertetés és szintén a mikrohullámú extrakció volt a leghatásosabb extrakciós módszer.

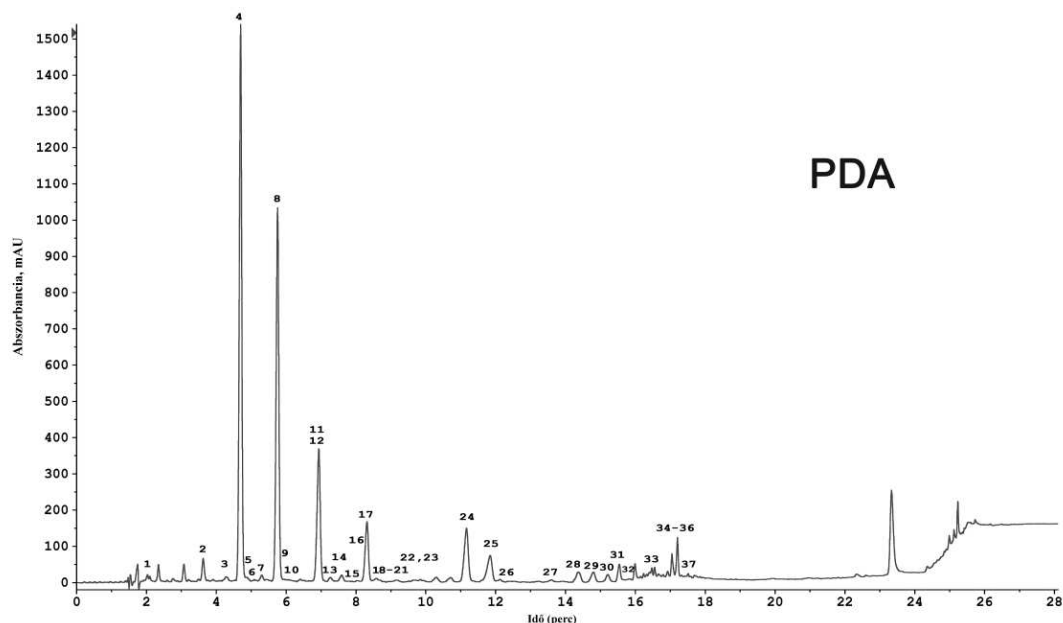
5.2.2. Bükk kéreg polifenoljainak HPLC-PDA-MS/MS elválasztása, azonosítása és relatív mennyiségi meghatározása

5.2.2.1. Polifenolok azonosítása

Ahogy az előző fejezetben ismertettem, szobahőmérsékleten a bükk kéreg etanolos oldószerrel készült extraktuma tartalmazott legnagyobb mennyiségben polifenolos vegyületeket. A metanol extrakciós oldószerként való alkalmazása mellett gazdaságossági szempontok szólnak, a vízzel pedig szintén nagy extrakciós hatásfok érhető el, ha az extrakció folyamán magas hőmérsékletet és túlnyomást alkalmazunk.

A bükk kéreg polifenoljainak HPLC-PDA-MS/MS elválasztását és azonosítását a mikrohullámú extrakcióval, 120 °C-on és 20 perc időtartam alatt, etanolos oldószerrel készült kivonatból végeztem. A tömegspektrométer hármas kvadрупól/lineáris ioncsapda funkcióját kihasználva, a polifenolok azonosítása az IDA analízis segítségével történt, ami időbeni programozást és a tömegspektrométer ioncsapdáját használja fel az automata on-line MS/MS detektáláshoz. A tömegspektrométer beállításait a 4.6.4.2.-es fejezetben írtam le. A komponensek megfelelő elválasztása és a vegyületek retenciós ideje a diódasoros detektor által szolgáltatott jel alapján került meghatározásra, ahol a diódasoros detektálás 250 és 380 nm közötti tartományban történt (**29. ábra**). Az azonosított komponenseket a **31. táblázat tartalmazza**.

A bükk kéregben található polifenolok szerkezetéről az irodalomban található adat, hiszen Dübeler et al. (1997) preparatív oszlop kromatográfiával, HPLC-PDA analízissel és NMR (mágneses magrezonancia) spektroszkópiával jellemezte a bükk kéregben előforduló legfontosabb polifenolokat. Összesen 8 vegyületet azonosítottak: (+)-katechint, a taxifolint, a *cisz*-koniferint, a *cisz*-izokoniferint, a *cisz*-sziringint, a (2R,3R)-(+)-taxifolin-3-glükopiranozidot, a (2S,3S)-(-)-taxifolin-3-glükopiranozidot és a 3-O-(β -D-xilopiranozil)-taxifolint.



29. ábra A bükk kéreg polifenoljainak elválasztása és azonosítása során kapott HPLC-kromatogram (PDA (250-380 nm)).

Az amerikai bükk (*Fagus grandifolia* Ehrh.) kérgéből Yamamoto et al. (1990) szintén izoláltak *cisz*-koniferint, és rámutattak arra is, hogy ezek a típusú növényi szövetek képesek nagy mennyiségben *cisz*-monolignolokat, és ezek glikolizált formáit felhalmozni, ugyanakkor ezen vegyületek *transz*-változatai nem fordulnak elő.

Ezek közül több vegyület a bükk szíjácsában is előfordul, ahogy azt több kutató is leírta. Pl. (+)-katechin (Zule és Može 2003; Hofmann et al. 2004; Mounguengui et al. 2007), taxifolin-*O*-hexozidok és taxifolin-*O*-pentozidok (Kubel et al. 1988; Mammela, 2001).

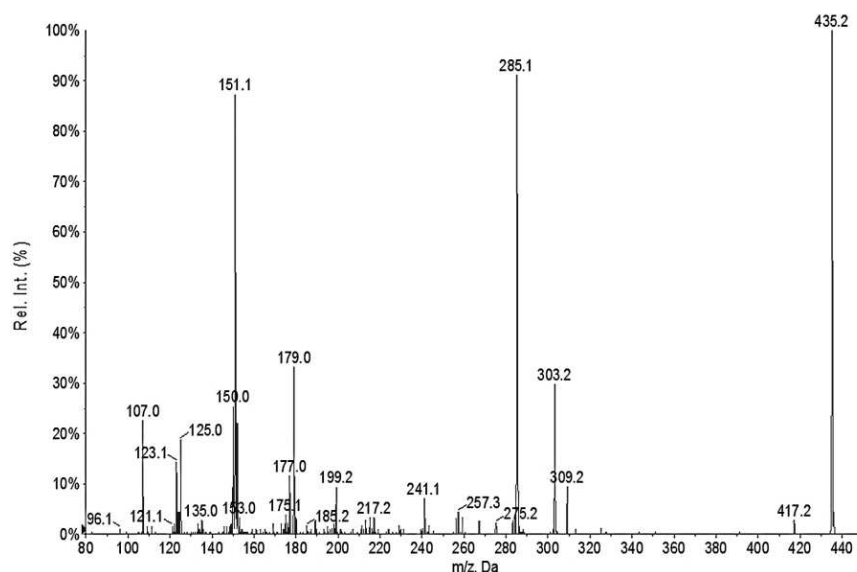
A korábbi elvégzett vizsgálatok azonosították és szerkezetileg leírták az európai bükk (*Fagus sylvatica* L.) kéreg legfőbb polifenolos komponensét, de a tartalmazott összes polifenol szisztematikus vizsgálata nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával és csatolt tandem tömegspektrometriás módszerekkel nem történt meg. Az elválasztási és detektálási körülmények alkalmas megválasztásával nem csak az azonosított vegyületek száma növelhető jelentősen, hanem lehetőség nyílik az izomerek hatékony elválasztására és azonosítására is.

Csúcs	t _R (min)	Vegyület neve	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	MRM (Q1/Q3)
1	2,03	Procianidin C trimer 1	865	739, 695, 577, 407, 289, 125	865,1/125,1
2	3,66	Procianidin B dimer 2	577	451, 425, 407, 289, 245, 125	577,1/125,1
3	4,34	Procianidin B dimer 2	577	451, 425, 407, 289, 245, 125	577,1/125,1
4	4,7	(+)-Katechin	289	245, 221, 203, 109	288,8/108,9
5	4,72	Koniferin izomer 1*	387	341, 207, 179, 164, 161, 146	386,9/178,9
6	4,92	Procianidin C trimer 2	865	739, 695, 577, 407, 289, 125	865,1/125,1
7	5,47	Procianidin C trimer 3	865	739, 695, 577, 407, 289, 125	865,1/125,1
8	5,81	Sziringin*	417	371, 209, 179, 161	416,9/209,0
9	6,14	Procianidin B dimer 3	577	451, 425, 407, 289, 245, 125	577,1/125,1
10	6,14	Procianidin C trimer 4	865	739, 695, 577, 407, 289, 125	865,1/125,1
11	6,95	Koniferin izomer 2*	387	341, 207, 179, 164, 161, 146	386,9/178,9
12	6,96	(-)-Epikatechin	289	245, 221, 203, 109	288,8/108,9
13	7,31	Procianidin B dimer 4	577	451, 425, 407, 289, 245, 125	577,1/125,1
14	7,46	Procianidin B dimer 5	577	451, 425, 407, 289, 245, 125	577,1/125,1
15	8,09	Ismeretlen (+)-katechin származék 1	631	327, 289, 245, 203	631,1/289,0
16	8,28	Ismeretlen (+)-katechin származék 2	631	327, 289, 245, 203	631,1/289,0
17	8,38	Kumarinsav-di-O-hexozid	487	325, 235, 163, 145, 143, 119, 101	487,1/58,9
18	8,64	Procianidin C trimer 5	865	739, 695, 577, 407, 289, 125	865,1/125,1
19	8,68	Taxifolin-O-hexozid 1	465	339, 303, 285, 257, 151	465,0/151,0
20	8,81	Ismeretlen (+)-katechin származék 3	631	327, 289, 245, 203	431,1/289,0
21	8,96	Procianidin C trimer 6	865	739, 695, 577, 407, 289, 125	865,1/125,1
22	9,71	Taxifolin-O-hexozid 2	465	339, 303, 285, 257, 151	465,0/151,0
23	9,93	Procianidin B dimer 6	577	451, 425, 407, 289, 245, 125	577,1/125,1
24	11,16	Taxifolin-O-pentozid 1	435	303, 285, 179, 151, 107	434,9/151,0
25	11,86	Taxifolin-O-pentozid 2	435	303, 285, 179, 151, 107	434,9/151,0
26	12,14	Taxifolin-O-hexozid 2	465	339, 303, 285, 257, 151	465,0/151,0
27	13,62	Ismeretlen 1	441	397, 330, 205, 133	440,9/59,1
28	14,38	Taxifolin-O-pentozid 3	435	303, 285, 179, 151, 107	434,9/151,0
29	14,81	Ismeretlen 2	551	419, 404, 401, 373, 371, 359	551,2/58,7
30	15,22	Ismeretlen 3	551	419, 404, 401, 373, 371, 359	551,2/58,7
31	15,54	Taxifolin-O-pentozid 4	435	303, 285, 179, 151, 107	434,9/151,0
32	15,67	Kvercetin-O-hexozid	463	301, 300, 271, 255	462,9/299,8
33	16,49	Ismeretlen 4	553	421, 406, 391, 373	553,1/59,0
34	17,06	Sziringsav-di-O-hexozid 1	521	359, 341, 299, 239, 197, 182	521,0/340,9
35	17,17	Ismeretlen 5	553	421, 406, 391, 373	553,1/59,0
36	17,22	Koniferil-alkohol-O-hexozid-O-pentozid	491	311, 296, 179, 164, 161, 146, 108	491,0/107,9
37	17,68	Sziringsav-di-O-hexozid 2	521	359, 341, 299, 239, 197, 182	521,0/340,9

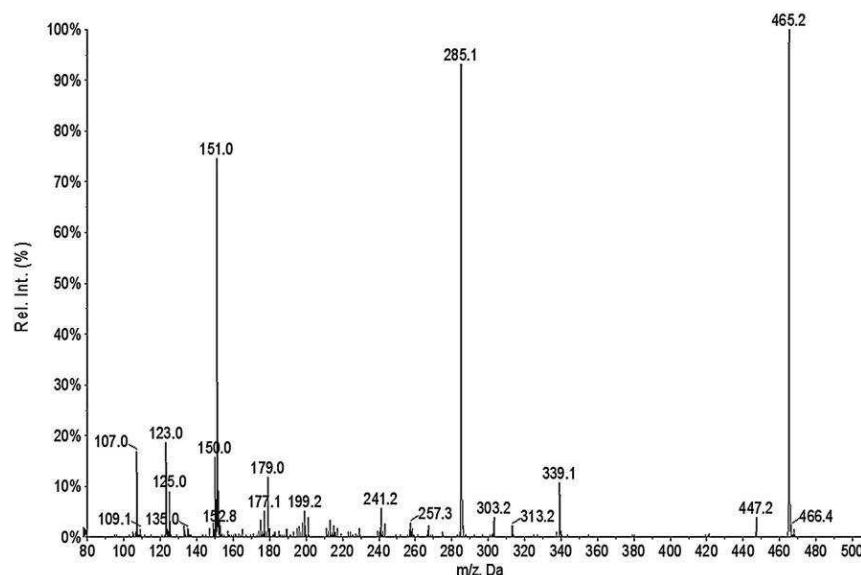
31. táblázat A bükk kéreg kivonatából azonosított vegyületek. A *-gal jelölt vegyületek [M-H+HCOOH]⁻ addukt formájában kerültek meghatározásra. Rövidítések: t_R: retenciós idő, MRM (Q1/Q3): a mennyiségi analízishez felhasznált anyaion/leányion átmenetek.

A bükk kéreg etanolos kivonatából a HPLC elválasztás és a tömegspektrometriás azonosítás alapján összesen 37 vegyület azonosítását, illetve tömegspektrum (MS/MS) alapján történő leírását végeztem el: (+)-katechin, (-)-epikatechin, kvercetin-O-hexozid,

taxifolin-*O*-hexozidok (3), taxifolin-*O*-pentozidok (4), B-dimer (6) és C-trimer (6) procianidinek. Néhány ismeretlen vegyületet is elválasztottam, amelyek meghatározott anyaiionnal rendelkeznek, az MS/MS tömegspektrumuk felvételre került, azonban ez ideig szerkezetük megfejtése nem járt sikerrel. A (–)-epikatechint az első alkalommal sikerült a bükk kéregben azonosítani (a szíjácsban már korábban leírták jelenlétét (Hofmann et al., 2004)). Összesen 4 taxifolin-*O*-pentozidot és 3 taxifolin-*O*-hexozid izomert mutattam ki. Az izomer vegyületek számát az MS/MS spektrumuk igazolja (30; 31. ábra).



30. ábra A 435 m/z -vel rendelkező molekulaion (taxifolin-*O*-pentozid) MS/MS spektruma.



31. ábra A 465 m/z -vel rendelkező molekulaion (taxifolin-*O*-hexozid) MS/MS spektruma.

A pentóz cukorrész letöredezésére jellemző a 126, 132 és 150 m/z -s veszteség (309, 303 és 285 m/z -s ionok jönnek létre a 435 m/z -s molekulaionból), míg a hexóz rész elvesztésére a 162 és 180 m/z -s veszteség jellemző (így 303 és 285 m/z -s ionok alakulnak ki a 465 m/z -vel rendelkező molekulaionból).

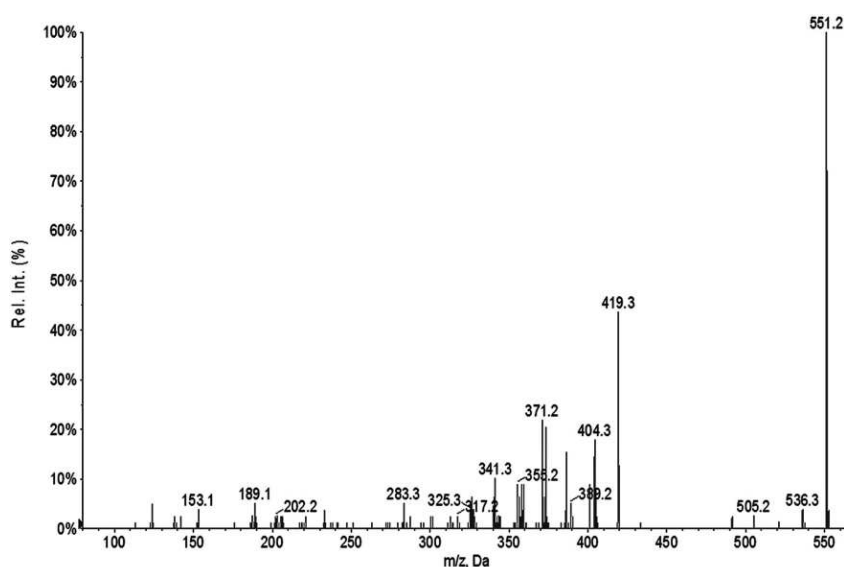
A pentozidoknál a 132 m/z -s, és a hexozidoknál a 162 m/z -s vesztes segítségével is azonosítható és igazolható az aglikon minősége (taxifolin, $[M-H]^-$: 303 m/z), melynek tényét az MS/MS spektrumban jelenlévő további, a vegyületekre jellemző fragmensek (151, 179, 241, 257 m/z) segítségével a RIKEN spektrumkönyvtár (Sawada et al., 2012) alapján bizonyítottam. Az eredményeket korábbi kutatások (Dübeler et al., 1997) is igazolják. Mämmelä (2001) HPLC-ESI-MS segítségével csak egy taxifolin-*O*-hexozidot és egy taxifolin-*O*-pentozidot azonosított bükk fűrészporból, míg Dübeler et al. (1997) 2 taxifolin-*O*-hexozid izomert és egy taxifolin-*O*-pentozid izomert detektált.

A bükk kéreg nagy mennyiségben tartalmaz még dimer és trimer procianidineket is, amelyeket korábban még nem mutattak ki ebből a növényi szövetből. Ezeket a komponenseket szintén az MS/MS fragmentációs mintájuk alapján sikerült azonosítani (Jaiswal et al., 2012).

A sziringin és a két koniferin izomer (valószínűleg *cisz*-koniferin és *cisz*-izokoniferin) jelenléte szintén bizonyított (Dübeler et al., 1997). Mindhárom komponens hangyasavval képzett adduktja $[M-H+HCOOH]^-$ került molekulaionként meghatározásra, amit a 46 m/z -s, a hangyasav molekulatömegének megfelelő tömegvesztés igazolt. A sziringin esetében jellegzetes tömegvesztések a hexozil-egységből (-162 m/z), és a két metil-csoportból (-30 m/z) származnak.

A 15-ös, 16-os és 20-as csúcsok (+)-katechin-származékként kerültek leírásra, a (+)-katechin jellemző tömegvesztései (289, 245 és 203 m/z) alapján. A 342 m/z -s tömegvesztés ($631 \rightarrow 289$ m/z) valószínűleg egy diszacharid egység lehasadásából adódik.

Az 551 m/z -s molekulaionnal rendelkező komponenseknek (29-es és 30-as csúcs) jellegzetes MS/MS spektrumuk van (32. ábra), azonban azonosítani nem sikerült őket. Valószínűleg glikozidos vegyületek, hiszen a 132 m/z -nek megfelelő vesztes ($551 \rightarrow 419$ m/z) a pentóz cukorrészre jellemző.



32. ábra Az 551 m/z -vel rendelkező molekulaion MS/MS spektruma.

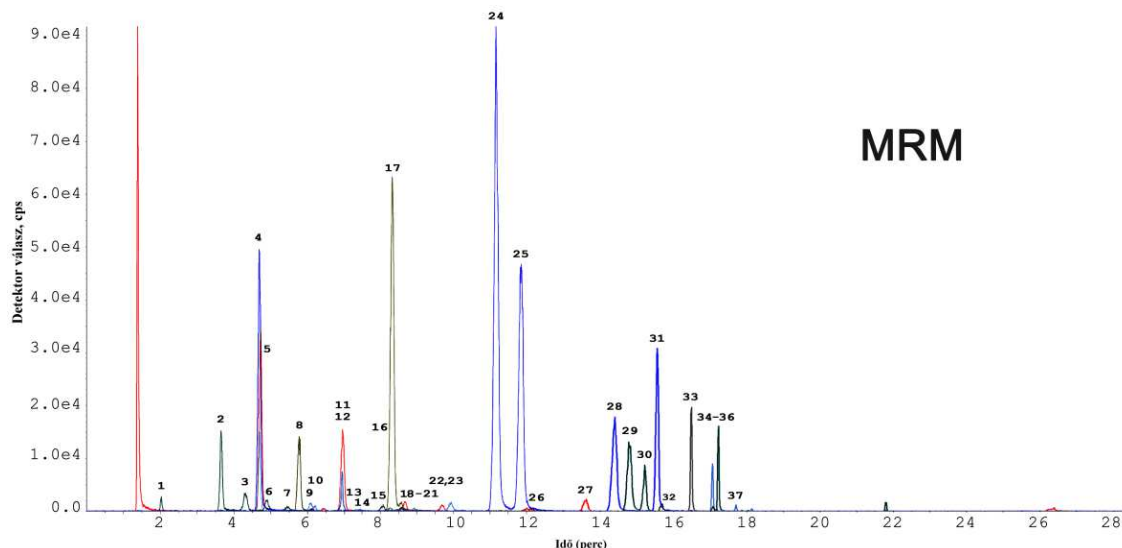
A 34-es és 37-es csúcsokat sziringsav-di-*O*-hexozidként azonosítottam, amire a két egymás utáni 162 m/z -s tömegvesztés utal ($521 \rightarrow 359$ és $359 \rightarrow 197$ m/z). A maradék aglikon (197 m/z) és a metil-csoport lehasadása ($197 \rightarrow 182$ m/z) erősíti meg azt, hogy ez az aglikon sziringsav.

A 36-os csúcsot koniferil-alkohol-*O*-hexozid-*O*-pentozidként írtam le, mivel a két egymás utáni 180-as ($491 \rightarrow 311$ m/z) és 132-es ($311 \rightarrow 179$ m/z) vesztes hexózra és pentózra jellemző. A maradék aglikon pedig ahogy az 5-ös és 11-es csúcsnál is leírásra került, a koniferil-alkoholnak megfelelően fragmentálódik.

5.2.2.2. *Polifenolok relatív mennyiségi meghatározása*

Azokból az extraktumokból, amelyek a legmagasabb polifenol-tartalmat mutatták, az azonosított vegyületek relatív mennyiségi meghatározását is elvégeztem MRM átmenetek segítségével a legjobb antioxidáns paraméterekkel jellemezhető extraktumokból. Célom volt megállapítani, hogy az alkalmazott extrakciós módszerek és oldószerek hogyan hatnak az egyes kioldott vegyületek mennyiségére.

A mennyiségi kiértékelés a relatív mennyiségi meghatározás elvén történt MRM csúcsterületek felhasználásával, figyelembe véve az alsó kimutatási határt (LOQ, **19. ábra**). A kvantitatív analízist azért végeztem ezzel a módszerrel, mert a (+)-katechin és (–)-epikatechin kivételével nem álltak rendelkezésemre standard vegyületek, továbbá az UV-kromatogramon több komponens is azonos retenciós idővel jelent meg, így a csúcs alatti területek nem szolgáltatottak egyértelmű mennyiségi információt. Az MRM analízis során kapott csúcs alatti területek segítségével a különböző módszerekkel kapott extraktumok összetételét tudtam meghatározni és összehasonlítani, anélkül, hogy az egyes vegyületek egzakt koncentrációját meg kellene határoznom. A jellegzetes MRM átmenetek meghatározása úgy történt, hogy az extraktumokat közvetlenül az MS detektorba juttattam fecskendő infúzió segítségével, majd az adott m/z értékre végeztem el az MRM optimálást. A mennyiségi meghatározáshoz használt MRM átmeneteket a **31. táblázatban** tüntettem fel. A **VIII. Melléklet** a tömegspektrométer vegyületfüggő beállításait tartalmazza, melyeket az MRM optimálás során kaptam és melyeket alkalmaztam a relatív mennyiségi meghatározás során. Egy tipikus MRM kromatogram látható a **33. ábrán**.



33. ábra A bükk kéreg polifenoljainak mennyiségi meghatározási alapját képező MRM kromatogram. A különböző színek különböző MRM csatornákat jelentenek. A csúcsok számai a 31. táblázatban jelzett számokkal egyeznek meg.

A **IX. Melléklet** táblázatában foglaltam össze az egyes komponensek esetében mért csúcs alatti területeket. A táblázatban három mérés átlageredményeit tüntettem fel. Konfidencia intervallumokat, és szórás értékeket nem adtam meg az adathalmaz nagysága miatt és a könnyebb átláthatóság érdekében. Annyi azonban megállapításra került, hogy a párhuzamos mérések relatív szórása az MRM meghatározásra jellemző jellemző $\pm 10\text{-}20\%$ tartományba estek.

A vegyületek mennyiségi kiértékelését a könnyebb áttekinthetőség érdekében csoportonként tárgyalom (katechin és epikatechin, procianidinek, taxifolin-glikozidok, egyéb vegyületek). A **IX. Mellékletben** is ennek megfelelően tüntettem fel az eredményeket.

▪ **(+)-katechin és (-)-epikatechin**

A legnagyobb mennyiségű (+)-katechin és (-)-epikatechin a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, mikrohullámmal segített extrakcióval készült vizes, metanolos és etanolos kivonatokban (M120W10, M120M20, M120E20) volt mérhető. Srinivas et al. (2010) már korábban leírta, hogy a (+)-katechin, és az egyéb polifenolok oldhatósága is jelentősen megnövekedik túlnyomású vizet alkalmazva, és a hőmérsékletet $298,7\text{ K}$ -ről $415,8\text{ K}$ -re ($25,6 \rightarrow 142,7\text{ }^{\circ}\text{C}$) megemelve, így ezek az extrakciós körülmények tehetők felelőssé a magas (+)-katechin-tartalomért a tiszta vízzel készült kivonataimban is. Az adatok alapján látható, hogy az ultrahangos extrakció esetében is jó eredmények érhetők el az etanolos oldószerrel 10, illetve 20 perc alatt (U10E, U20E). A mágneses kevertetés esetében szintén az etanolos elegy (2 és 5 óra alatt) bizonyult a leghatékonyabb kivonószernek. Ebben az esetben meglepő módon az (-)-epikatechin mennyisége rendkívül alacsony volt a (+)-katechinéhez viszonyítva mindhárom oldószer esetében. Cuevas-Valenzuela et al. (2014) részletesen vizsgálta a (+)-katechin oldhatóságát, és azt

figyelték meg, hogy ez a vegyület sokkal jobban oldódik a víz-etanol elegyekben, mint a tiszta vízben 4 és 58 °C közötti hőmérsékleten. Ezt a megállapítást az én eredményeim is alátámasztják. Ha összehasonlítjuk a csúcs alatti területeket mindkét vegyület esetében a vizes elegyekben, az figyelhető meg, hogy az extrakciós időtartam növekedésével (2 óra → 24 óra) e két komponens koncentrációja csökken, ami megmagyarázza az összes polifenol-tartalomban fellépő változásokat is (**15. táblázat**). Összességében elmondható, hogy a katechinek jelentős bomlásra mennek keresztül a túl hosszú extrakciós időtartamok alatt vizes környezetben, ugyanakkor ez nem jellemző a szerves oldószert tartalmazó kivonatokra.

▪ **Procianidinek**

A procianidinek kinyerésére az ultrahangos módszer és az etanolos oldószer bizonyult a leghatékonyabbnak. A 20 percnél tovább tartó extrakció esetében az alkoholos elegyeknél a procianidinek mennyiségében csökkenés következett be. A mágneses kevertetés valamivel kevésbé hatékonynak mutatkozott e vegyületcsoport kinyerése szempontjából. A legnagyobb procianidin-tartalommal az 5 órás etanolos kivonat (S5E) rendelkezett. A katechinekhez hasonlóan itt is megfigyelhető, hogy a vizes kivonatokban az időtartam növelésével a procianidinek mennyisége szignifikánsan csökken, és ez szintén hozzájárul a polifenol-tartalom korábban leírt csökkenéséhez. A procianidinek szempontjából a legkevésbé hatékony extrakciós módszernek a mikrohullámmal segített extrakció bizonyult, itt ugyanis a magas hőmérséklet és nyomás a vegyületek bomlását segíti elő, ahogy azt Liu et al. (2012) is megfogalmazta. Ha ezek az extrakció célkomponensei, akkor mindenképpen alacsonyabb hőmérsékletet, valamint szerves oldószert célszerű alkalmazni, hiszen a víz egy módszer esetében sem bizonyult hatékonynak.

▪ **Taxifolin-glikozidok**

A procianidinekkel ellentétben a mikrohullámú extrakció bizonyult a legeredményesebb technikának a taxifolin-glikozidok extrakciójára. Az alkoholt tartalmazó elegyek esetében a hőmérséklet és az időtartam növelésével az MRM csúcs alatti területek is jelentősen növekedtek. A legtöbb taxifolin-glikozidot a 10 perc alatt készült vizes extraktum tartalmazta (M120W10). A kevertetés esetében a taxifolin-glikozidok mennyiségének enyhe csökkenése tapasztalható az időtartam növekedésével.

▪ **Egyéb komponensek**

A többi komponensre vonatkozóan az állapítható meg, hogy a mikrohullámmal segített extrakció és a tiszta víz (M120W10) bizonyult a leghatásosabb extrakciós oldószernak. Ezzel a módszerrel az alkoholok is nagyon eredményes kivonószerek a kevertetéshez és az ultrahangos extrakcióhoz képest. Az összes egyéb vegyület esetében az ultrahangos módszer volt a legkevésbé effektív, ugyanakkor a 2-es koniferin izomer esetében épp ellenkező a helyzet, ennél a komponensnél a leghatékonyabb módszer az ultrahangos volt.

Összefoglalás. *A bükk kéreg polifenolok nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás és tandem tömegspektrometriás vizsgálatában összesen 37 komponenst azonosítottam, köztük vannak katechinek, procianidinek, taxifolin-glikozidok és egyéb csoportba tartozó vegyületek. A bükk kéreg polifenoljainak ilyen részletességű vizsgálata ezidáig nem történt meg. A bükk kéreg nagy mennyiségben előforduló faipari melléktermék, így megfelelő minta-előkészítést és extrakciót alkalmazva a kéregben megtalálható polifenolos vegyületek a jövőben gyakorlati célokra is felhasználhatók (pl. szerves faanyagvédő szerként, élelmiszerekben antioxidánsként, étrend-kiegészítőkként és egészségügyi termékekben).*

Az extrakciós módszer, az extrakciós körülmények, és az oldószerek alkalmas megválasztásával a különböző vegyületcsoportba tartozó komponensek célzottan vonhatók ki a bükk kérgéből. A mikrohullámmal segített extrakció segítségével érhető el a legnagyobb kinyert polifenol-tartalom. A procianidinek számára nem ez az ideális módszer, ugyanis ezek a molekulák a magas hőmérséklet és a túl hosszú extrakciós időtartam hatására elbomlanak. A procianidinek esetében sokkal kedvezőbb a szobahőmérsékleten megvalósítható ultrahangos extrakció és az etanol: víz 80:20 v/v% oldószerkelet.

A vízzel meglepően kiváló eredmények érhetők el a mikrohullámmal segített extrakció esetében, így a bükk kéregben lévő polifenolok extrakciójára a túlnyomáson és magas hőmérsékleten alkalmazott víz új, környezetbarát technológia kifejlesztését teszi lehetővé.

További vizsgálatokat igényel, hogy mely vegyületek felelősek leginkább a kivonatok antioxidáns hatásáért, mely anyagoknak a legnagyobb az antioxidáns „hatékonysága”. A vizsgálat jövőbeli kivitelezése az antioxidáns kapacitás eredmények, valamint az MRM csúcs alatti területek alapján válik lehetővé.

5.2.3. Antioxidáns paraméterek a vizsgált erdei fafajok kéregszövetében

A minta-előkészítés optimalizálása során kapott eredmények alapján a mikrohullámú előkezelés után vagy nincs szignifikáns különbség a kezelt és nem kezelt minták polifenol-tartalma és antioxidáns kapacitása között, vagy a kezelés hatására jelentősen csökkennek ezek az értékek, ezért az ebben a fejezetben ismertetett eredményeket a mikrohullámmal nem kezelt kéregmintákból, metanol:víz 80:20 v/v% oldószerrel, ultrahangos módszerrel készített extraktumokból mértem. Ebben a mérési sorozatban azt vizsgáltam, hogy a fontosabb magyarországi fajok kérge (hancs és héjkéreg) milyen antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik.

5.2.3.1. Antioxidáns kapacitás meghatározása

A kéregre vonatkozó antioxidáns paraméterek jellemzése 7 fajra terjedt ki, ezek közül kettő örökzöld faj volt. A **4.** és **5. táblázat** alapján látható, hogy a gyertyán, a nyár és az erdeifenyő azért kiemelkedő fontosságú, mert Magyarországon jelentős területet elfoglaló erdőalkotó fafajok és a belőlük megvalósuló fakitermelés is számottevő.

Ennek megfelelően e fajok kérgeghulladéka potenciálisan hasznosítható, nagy mennyiségű nyersanyagot jelent, a többi fajra kapott eredmények pedig az irodalomban található adatok kiegészítésére szolgálhatnak.

A gyertyán kivételével minden faj esetében a héjkéregből és a háncsból is elvégeztem az extrakciót, hogy össze tudjam hasonlítani a két kéregrészt antioxidáns tulajdonságait. A közönséges gyertyán esetében, mivel nem tudtam különválasztani a két kéregrészt, az abból mért értékeket a héjkéregre és háncsra vonatkozó táblázatban is feltüntettem. A vizsgált fajok és a héjkéreg vizsgálatából származó eredmények a **32. táblázatban**, míg a háncsra vonatkozó adatok a **33. táblázatban** láthatók.

Héjkéreg			
Fajok	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	FRAP (mg AS/ g sz.a.)	ABTS (mg T/g sz.a.)
Gyertyán	6,19 ± 0,26 ^b	30,1 ± 1,0 ^d	86,1 ± 0,81 ^a
Fekete cseresznye	12,0 ± 0,32 ^c	35,9 ± 0,9 ^c	208 ± 7,71 ^c
Szelídgesztenye	2,80 ± 0,11^a	82,8 ± 0,7^g	320 ± 5,73 ^d
Fekete nyár	30,2 ± 2,89 ^d	18,3 ± 0,6 ^b	155 ± 10,8 ^b
Közönséges nyír	13,8 ± 1,67 ^c	23,4 ± 0,3 ^c	205 ± 17,1 ^c
Vörösfenyő	5,84 ± 0,16 ^b	51,4 ± 2,1 ^f	372 ± 18,5^e
Erdeifenyő	11,2 ± 0,61 ^c	10,9 ± 0,6 ^a	61,7 ± 4,37 ^a

32. táblázat A héjkéregből készült extraktumok antioxidáns kapacitása. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. Adott oszlopon belül a felső indexben lévő eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják.

Ha megvizsgáljuk a **héjkéreg** esetében a **DPPH-módszerrel** kapott eredményeket, azt láthatjuk, hogy a legjobb antioxidáns kapacitást (legkisebb IC₅₀-értéket) a szelídgesztenye, a vörösfenyő és a gyertyán mutatja, a leggyengébb gyökfogó képességgel a nyár, a többi faj pedig közepes antioxidáns kapacitással rendelkezik. A legnagyobb **FRAP** antioxidáns kapacitás értékeket a szelídgesztenye, a vörösfenyő és a cseresznye mutatja, a legkisebb értékeket pedig a nyár és a nyír. Az **ABTS** módszer alapján szintén a vörösfenyő és a szelídgesztenye rendelkezik a leghatékonyabb antioxidáns hatású vegyületekkel, ezeket követi a cseresznye és a nyír, s a leggyengébb ABTS antioxidáns képességű a gyertyán és az erdeifenyő kivonata.

A **háncs** esetében a legjobb **DPPH** antioxidáns kapacitást a cseresznye és a szelídgesztenye mutatta, közepes értékekkel a nyír, a vörösfenyő és az erdeifenyő rendelkezett, míg a leggyengébb gyökfogó képességet a nyár mutatta. A szintén háncsrészből meghatározott **FRAP**-értékek esetében a legjobbak a cseresznye, a szelídgesztenye és a vörösfenyő kivonataiból mért értékek voltak, ugyanúgy, mint a héjkéreg esetében. Leggyengébb érték itt is a nyár háncsából készült kivonat esetében volt mérhető. Az **ABTS** esetében a cseresznye kiemelkedő antioxidáns kapacitást mutatott, ami dupla akkora, mint a szelídgesztenye esetében. A fekete cseresznyén kívül még kiváló gyökfogó képességű a vörösfenyő, a közönséges nyír és gyengébb a gyertyán valamint a fekete nyár.

Háncs			
Fafajok	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	FRAP (mg AS/ g sz.a.)	ABTS (mg T/g sz.a.)
Gyertyán	6,19 ± 0,26 ^b	30,1 ± 1,01 ^b	86,1 ± 0,81 ^a
Fekete cseresznye	4,70 ± 0,05^a	80,1 ± 3,98^f	533 ± 11,2^f
Szelídgesztenye	4,81 ± 0,17 ^a	70,9 ± 3,47 ^c	265 ± 13,9 ^c
Fekete nyár	44,0 ± 2,41 ^f	17,6 ± 0,27 ^a	94,7 ± 4,48 ^a
Közönséges nyír	6,61 ± 0,22 ^{bc}	32,9 ± 2,23 ^b	300 ± 10,5 ^d
Vörösfenyő	6,68 ± 0,04 ^c	62,3 ± 3,58 ^d	346 ± 9,28 ^e
Erdeifenyő	7,23 ± 0,09 ^d	42,4 ± 2,66 ^c	219 ± 14,0 ^b

33. táblázat A háncsból készült extraktumok antioxidáns kapacitása. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. Adott oszlopon belül a felső indexben lévő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják. Rövidítés: n/a: nincs adat.

Ha minden vizsgált faj esetében a héjkéreg és a háncs eredményeit összevetjük, a fekete cseresznye, a közönséges nyír és az erdeifenyő esetében a háncs erősebb antioxidáns hatással rendelkezik, míg a szelídgesztenye, a fekete nyár és a vörösfenyő esetében a héjkéregben található meg nagyobb mennyiségű gyökfogó vegyület, és ez mindhárom antioxidáns kapacitást mérő módszer esetében így van. A kérgekből mért antioxidáns kapacitások vizsgálatáról az mondható el, hogy a legnagyobb értékekkel a szelídgesztenye, a fekete cseresznye és a vörösfenyő rendelkezik, míg a leggyengébben a fekete nyár és a gyertyán teljesített.

Az irodalomban kevés eredményt találhatunk a kérgek antioxidáns kapacitására, s ha elő is fordul, akkor sem jellemző, hogy a héjkéreg és a háncs vizsgálatára külön is sor került. Gao et al. (2007) az oregoni hamisciprus (*Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murr.) Parl.) esetében mindkét kéregrészt vizsgálták. Ők a háncsból és héjkéregből mért DPPH-féle antioxidáns kapacitás értékekre rendre 10,31 és 19,87 µg/ml-t kaptak. Az én eredményeim ennél jobb antioxidáns kapacitást mutatnak, de nemcsak az oregoni hamisciprus és *Maclura tinctoria* kérgéhez viszonyítva, hanem Noriega et al. (2015) eredményeihez képest is. Ők a vörös kína (Cinchona pubescens (Vahl)) etanolos kéreg-extraktumából meghatározták a DPPH-féle antioxidáns kapacitást, és ennek eredményeképpen 42,00 µg/ml értéket kaptak. Ez az érték csaknem megegyezik a fekete nyár háncskivonatából mért értékkel, a többi általam vizsgált faj azonban ennél sokkal jobb antioxidáns kapacitást mutatott minden esetben. Továbbá Apetrei et al. (2011) a *Pinus cembra* L. kérgének vizsgálata során is az előbb ismertetett eredményeknél kisebb DPPH-féle antioxidáns kapacitást (71,1 µg/ml-t) határoztak meg. Ezen kívül a *Casuarina equisetifolia* kérgének esetében 101,69 µg/ml-t mértek a kutatók, és ez az én kivonataimnál szintén kisebb antioxidáns kapacitást jelent (Zhang et al., 2010).

5.2.3.2. Összes fenolos vegyület mennyiségi meghatározása

Mivel az antioxidáns hatáshoz számos vegyületcsoport, köztük a fenolos vegyületek is jelentős mértékben hozzájárulnak, ezért megvizsgáltam a héjkéreg és háncs kivonatok

összes polifenol-, összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalmát is, hogy megtudjam, ezek a vegyületsoportok milyen mennyiségben vannak jelen, és milyen mértékben felelősek az antioxidáns tulajdonságokért. A héjkéregre kapott eredmények a **34. táblázatban**, a háncsra kapott eredmények pedig a **35. táblázatban** találhatók.

Az összes polifenol-tartalom mérések alapján a vizsgált fajok kéreg-extraktuma közül a vörösfenyő, a szelídgesztenye, és a fekete cseresznye tartalmazta a legtöbb polifenolos vegyületet, míg a legkevesebbet az erdeifenyő, a közönséges gyertyán, a fekete nyár és a nyír.

Fajok	Héjkéreg		
	Összes polifenol (mg Q/g sz.a.)	Összes flavonoid (mg Q/g sz.a.)	Összes flavan-3-ol (mg C/g sz.a.)
Gyertyán	25,2 ± 0,63 ^A	1,48 ± 0,12 ^B	0,39 ± 0,02 ^A
Fekete cseresznye	70,0 ± 2,43 ^C	2,49 ± 0,03 ^D	19,5 ± 0,04 ^F
Szelídgesztenye	89,0 ± 3,90 ^D	4,81 ± 0,14^E	0,77 ± 0,01 ^B
Fekete nyár	52,8 ± 2,83 ^B	1,92 ± 0,03 ^C	1,42 ± 0,04 ^C
Közönséges nyír	57,3 ± 6,21 ^B	n. k.	8,88 ± 0,15 ^E
Vörösfenyő	121 ± 4,11^E	n. k.	20,0 ± 0,06^G
Erdeifenyő	16,4 ± 3,32 ^A	0,42 ± 0,03 ^A	3,05 ± 0,09 ^D

34. táblázat A héjkéregből készült extraktumokban lévő fenolos vegyületek mennyisége. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. Adott oszlopon belül a felső indexben lévő különböző nagybetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten. A félkövérrel kiemelt értékek a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják. Rövidítés: n. k.:nem kimutatható.

A háncs esetében szintén a fekete cseresznye és a vörösfenyő tartalmazta a legtöbb polifenolt, míg a legkevesebbet a gyertyán, a fekete nyár és a szelídgesztenye esetében mértem.

Az összes flavonoid-tartalom csak négy faj esetében volt kimutatható mind a két kéregrész esetében. A többi fajnál kimutatási határ alatti volt a flavonoid-tartalom. A héjkéreg esetében a szelídgesztenyénél mértem a legtöbb flavonoidot, míg a háncs esetében a fekete cseresznye tartalmazta a legtöbb ilyen típusú vegyületet.

Az összes flavan-3-ol-tartalomra kapott eredmények a héjkéreg esetében 0,39 – 19,97 mg C/g sz.a. között változnak. Legalacsonyabb értékekkel a gyertyán, a szelídgesztenye és a nyár rendelkezik, legnagyobbakkal a fekete cseresznye és a vörösfenyő, míg a közönséges nyír közepes flavan-3-ol-tartalmat mutat. A háncs esetében a héjkéreghez képest mintegy háromszoros értékeket mértem. A fajok közti tendencia itt is hasonló, legjobb a fekete cseresznye és a vörösfenyő, legkevesebb flavan-3-ol-típusú vegyülettel pedig a szelídgesztenye rendelkezik.

Lamounier et al. (2012) a *Maclura tinctoria* ((L.) D. Don ex Steud.) kérgének flavan-3-ol-tartalmát határozták meg, és ennek eredményeként 3,9 mg C/g sz.a.-ot kaptak. Ez a héjkéreg esetében az erdeifenyőhöz, a háncs esetében pedig a szelídgesztenyéhez hasonlít nagyságrendileg.

Fafajok	Háncs		
	Összes polifenol (mg Q/g sz.a.)	Összes flavonoid (mg Q/g sz.a.)	Összes flavan-3-ol (mg C/g sz.a.)
Gyertyán	25,2 ± 0,63 ^A	1,48 ± 0,12 ^B	0,39 ± 0,02 ^A
Fekete cseresznye	139 ± 4,00 ^G	3,71 ± 0,02 ^C	61,8 ± 2,33 ^G
Szelídgesztenye	61,4 ± 1,73 ^D	1,30 ± 0,07 ^B	2,48 ± 0,05 ^C
Fekete nyár	36,3 ± 0,51 ^B	0,74 ± 0,01 ^A	1,60 ± 0,01 ^B
Közönséges nyír	76,6 ± 0,54 ^E	n. k.	14,7 ± 1,02 ^D
Vörösfenyő	107 ± 0,70 ^F	n. k.	32,0 ± 1,45 ^F
Erdeifenyő	76,2 ± 3,15 ^E	n. k.	21,6 ± 0,35 ^E

35. táblázat A háncsból készült extraktumokban lévő fenolos vegyületek mennyisége. Az eredmények feltüntetése átlagérték ± szórás formában történt. Adott oszlopon belül a felső indexben lévő különböző nagybetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten. A félkövérral kiemelt értékek a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatják. Rövidítés: n. k.:nem kimutatható.

Túlevelű fajok kérgére is található a szakirodalomban adat: Maimoona et al. (2011) a *Pinus roxburghii* (Sarg.) és a *Pinus wallichiana* (A. B. Jacks.) kérgének polifenol- és flavonoid-tartalmát vizsgálták. Átszámolva az ő eredményeiket, a *Pinus roxburghii* etil-acetátos kéreg-extraktumának polifenol-tartalma 158 mg Q/g sz.a. flavonoid-tartalma pedig 33,4 mg Q/g sz.a., míg a *Pinus wallichiana* esetében a polifenol- 224 mg Q/g sz.a., a flavonoid-tartalom pedig 52,2 mg Q/g sz.a.-nak felel meg. Ezek az értékek jóval nagyobbak, mint az általam vizsgált fajoké.

A fenolos vegyületek kéreg- és háncsszövet közti megoszlására jellemző, hogy az összes polifenol-tartalom a szelídgesztenye, a fekete nyár és a vörösfenyő esetében a kéregben volt nagyobb, míg a többi fajnál a háncsban volt több polifenol-tartalom mérhető. A flavonoid-tartalomnál (ahol mérhető volt) is ugyanez a tendencia jellemző, míg a flavan-3-ol-tartalomnál figyelhető meg eltérés, ugyanis ebben az esetben a nyár kivételével minden fafaj esetében a háncsban volt jellemző a nagyobb flavan-3-ol-tartalom.

5.2.3.3. Összegzett antioxidáns kapacitás értékek meghatározása

Az elvégzett, 2014. februári (24. és 25. táblázatok) és 2014. decemberi (32. és 33. táblázatok) mintavételből származó összes fafaj mintáira (külön a háncsra és külön a héjkéregre) vonatkozó antioxidáns kapacitás vizsgálatok összegzését egy saját magam által felállított pontrendszer segítségével valósítottam meg, felhasználva a DPPH, FRAP és ABTS antioxidáns kapacitás meghatározás eredményeit, hasonlóképpen, minta levélminták esetében (az 5.1.2.1. fejezetben ismertett módon). A kiértékeléshez a 2014. februári mintavétel eredményeiből a mikrohullámmal nem kezelt minták FRAP, ABTS és DPPH antioxidáns kapacitásait használtam fel, a bükk esetében (mivel ennél a mintánál a mikrohullámú inaktiválásnak pozitív hatása volt) a mikrohullámmal kezelt minta adatait használtam fel. Az eredmények a 36. táblázatban vannak feltüntetve. Ez alapján az összes faj háncsa közül a fekete cseresznye, a szelídgesztenye és a vörösfenyő, a héjkéregből készült extraktumok közül pedig a szelídgesztenye és a vörösfenyő mutatta a legjobb antioxidáns tulajdonságokat.

Fafaj	Háncs	Héjkéreg
Akác	0,79	1,15
Kocsánytalan tölgy	1,57	1,28
Erdeifenyő	1,66	0,80
Fehér nyár	1,36	1,46
Bükk	1,33	n. m.
Gyertyán	1,24	1,24
Fekete cseresznye	2,92	1,43
Szelídgesztenye	2,22	2,55
Fekete nyár	0,16	0,63
Közönséges nyír	1,72	1,21
Vörösfenyő	2,22	2,15

36. táblázat Az antioxidáns kapacitások (DPPH, FRAP és ABTS) pontrendszer alapján történt kiértékelésének és összesítésének eredménye. Maximum pontszám: 3. n.m.: nem meghatározott.

Összefoglalás. *A vizsgált fajoknál nem minden esetben volt bizonyítható az a korábbi állítás, miszerint a héjkéreg a fatörzs első védelmi vonala, ezért ebben található meg minden esetben a több antioxidáns hatású vegyület (Lev-Yadun, 2001).*

Az összegzett antioxidáns kapacitások értékeit figyelembe véve (amely tartalmazta a 2014. februári és 2014. decemberi mintavételből származó kéregmintákat is) a belső kérgék közül a fekete cseresznye, a héjkéregből készült extraktumok közül pedig a szelídgesztenye mutatta a legjobb antioxidáns kapacitás értékeket. Ezeken kívül még a vörösfenyő is kiváló DPPH-, FRAP- és ABTS-féle antioxidáns kapacitással rendelkezik, így e fajok háncsa vagy héjkérge ígéretes lehet a jövőben valamilyen gyakorlati felhasználásra.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK (TÉZISEK)

1) *Elsőként végeztem el a Magyarországon előforduló 12 erdei fafaj (közönséges bükk, közönséges gyertyán, molyhos tölgy, nyár, fehér akác, korai juhar, csertölgy, szelídgesztenye, kocsányos tölgy, kocsánytalan tölgy, erdeifenyő, feketefenyő) leveleire kiterjedő összehasonlító vizsgálatot az antioxidáns paraméterek (DPPH, ABTS, FRAP) és a főbb polifenol csoportok (összes polifenol, összes flavonoid, összes flavan-3-ol) mennyiségének tekintetében. Megállapítottam, hogy a vizsgált erdei fajok levélmintáinál több módszerre van szükség az antioxidáns tulajdonságok komplex felméréséhez. A DPPH, ABTS és FRAP antioxidáns kapacitások szezonális változásainak adatait felhasználva egy adott antioxidáns kapacitást mérő módszeren belül az eredményeket [0-1] tartományra normalizáltam. 0 pontot kapott az a minta, amelyik egy mérési paraméter esetében a legkisebb antioxidáns kapacitást, és 1-et az, amelyik a legnagyobb értéket mutatta. A DPPH esetében fordított számozást alkalmaztam. Végül a különböző antioxidáns kapacitások normalizált értékeit mintánként összegeztem. Megállapítottam, hogy a vizsgált fajok közül a legnagyobb összegzett antioxidáns kapacitással a gyertyán, a szelídgesztenye, a csertölgy és a molyhos tölgy rendelkezik. A legtöbb vizsgált faj esetében az augusztusi/szeptemberi minták rendelkeznek a legmagasabb összegzett antioxidáns kapacitással.*

2) *Elsőként írtam le és jellemeztem nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás és csatolt tandem tömegspektrometriás módszerekkel a közönséges gyertyán levelében előforduló polifenolos vegyületeket. Összesen 171 vegyületet választottam el, melyek közül 92 komponenst azonosítottam, köztük fenolos savakat és származékaikat, gallotanninokat és ellagitanninokat, katechineket, flavonoid-glikozidokat és az eukaglobulint. Ezen kívül meghatározott molekulaionnal és MS/MS fragmentációval rendelkező, mindeztáig azonosítatlan szerkezetű és nevű vegyületeket is leírtam. A vegyületek listája alapján képezheti a gyertyán levélextraktum bioaktív komponenseinek további kutatásához.*

3) *Elsőként végeztem el a Magyarországon előforduló 11 erdei fafaj (közönséges gyertyán, fekete cseresznye, szelídgesztenye, fekete nyár, közönséges nyír, vörösfenyő, erdeifenyő, közönséges bükk, fehér akác, kocsánytalan tölgy, fehér nyár) kérgére az antioxidáns kapacitások (FRAP, ABTS, DPPH) és a főbb polifenol csoportok (összes polifenol, összes flavonoid, összes flavan-3-ol) mennyiségének összehasonlító vizsgálatát. Megállapítottam, hogy a vizsgált erdei fajok kéregmintáinál több módszerre van szükség az antioxidáns tulajdonságok komplex felméréséhez. Antioxidáns kapacitást mérő módszerként a különböző típusú minták (külön a hancs és a héjkéreg) eredményeit [0-1] tartományra normalizáltam. 0 pontot kapott az a minta, amelyik egy mérési paraméter esetében a legkisebb antioxidáns kapacitást, és 1-et az, amelyik a legnagyobb értéket mutatta. A DPPH esetében fordított számozást alkalmaztam. Végül*

a különböző antioxidáns kapacitások normalizált értékeit mintánként összegeztem. *A kiértékelés alapján megállapítottam, hogy a vizsgált fajok hancsa közül a fekete cseresznye, a szelídgesztenye és a vörösfenyő, a héjkéregből készült extraktumok közül pedig a szelídgesztenye és a vörösfenyő mutatta a legjobb összegzett antioxidáns képességet.*

4) *Elsőként írtam le és jellemeztem nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás és csatolt tandem tömegspektrometriás módszerekkel a közönséges bükk hancs legfontosabb polifenoljait. Összesen 37 komponenst választottam el, ezekből azonosítottam a következő vegyületeket: (+)-katechin, (–)-epikatechin, a procianidinek közül 6 procianidin B dimer-, és 6 procianidin C trimer izomert, a taxifolin-glikozidok közül 4 taxifolin-*O*-pentozidot és 3 taxifolin-*O*-hexozidot, kvercetin-*O*-hexozidot, koniferil-alkohol-*O*-hexozid-*O*-pentozidot, 2 sziringsav-di-*O*-hexozidot, kumarinsav-*O*-dihexozidot és 2 koniferin izomert. Ezen kívül meghatározott molekulaionnal és MS/MS fragmentációval rendelkező, mindezidáig azonosítatlan szerkezetű és nevű vegyületeket is leírtam.*

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Növényi szövetek antioxidáns tulajdonságairól rengeteg információ áll rendelkezésünkre, azonban erdei fák szövetei esetében már lényegesen kevesebb adatot találunk. Így kutatásom hiánypótló célzattal készült, de az is fontos szempont volt, hogy olyan mintát válasszak, amelynek még nincs felhasználása, ipari mellékterméknek számít, és ennek a kéreg és a levél megfelelt. Magyarországon az erdőborítottság ma már meghaladja az 1,93 millió hektárt, és ezzel párhuzamosan a fakitermelés is jelentős mértékű, aminek következtében hatalmas mennyiségű kéreg- és levélhulladék keletkezik. Nyersanyagból tehát nincs hiány.

Kutatásom elsődleges célja a Magyarországon előforduló legfontosabb erdei fafajok leveléből és kérgéből készült kivonatok antioxidáns tulajdonságainak összehasonlító vizsgálata, valamint az antioxidáns hatásért felelős polifenolok minőségi és mennyiségi meghatározása volt. Munkám során a kivonatok antioxidáns kapacitásának jellemzésére három hasonló elven működő, de eltérő szabad gyököt alkalmazó spektrofotometriás módszert választottam, a FRAP-, DPPH- és ABTS-módszert. A polifenolos vegyületek jellemzésére a Folin-Ciocalteu-féle összes polifenol-tartalom vizsgálatát alkalmaztam, ezen kívül pedig még meghatároztam az összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalmat is. Az antioxidáns hatásért felelős polifenolos vegyületek azonosításához illetve mennyiségi meghatározásához HPLC-PDA-MS/MS-technikát alkalmaztam kiválasztott szövetek esetében.

A kutatás első fázisában a minta-előkészítés optimalizálása során a mikrohullámú kezelés hatását vizsgáltam mindkét szövet esetében a polifenolokat oxidáló enzimek inaktiválása céljából. A falevelek esetében összehasonlítottam a mikrohullámmal kezelt és utána szárított, valamint a csak szárított levelek antioxidáns tulajdonságait. Mivel a legtöbb vizsgált fafaj esetében a mikrohullámmal kezelt levelek magasabb polifenol-tartalmat és jobb antioxidáns kapacitást mutattak (illetve nem mutattak rosszabbat a kezelt levelek a nem kezelt leveleknél, egyes fajoknál, pl.: bükk, keleti gyertyán, korai juhar), egyértelmű a mikrohullámú enzim-inaktiválás kedvező hatása a vizsgált erdei fafajok levél antioxidánsainak hatékony megőrzésére. A kéregminták esetében a mikrohullámú kezelés hatása erősen fajfüggő volt. A további kéregvizsgálatoknál (a bükk kivételével) nem alkalmaztam mikrohullámú kezelést a kéregminták előkészítésénél.

A továbbiakban optimalizáltam a levél- és kéregminták esetében a mintavételi-, és extrakciós módszereket. Ennek során a csertölgy 2014. július 7.-i mintavétele esetében egy nap alatt 5 különböző időpontban a lombkorona azonos pontjairól vettem mintát, és megnéztem, hogy az egyes paraméterek hogy változnak a nap folyamán és a benapozottságtól függően. a különböző vizsgált levéltípusok tekintetében, egyedül az összes flavonoid- és flavan-3-ol-tartalom az, amely kimutatható eltérést jelent az egyes levéltípusok között, a többi antioxidáns paraméter illetve az összes polifenol-tartalom nem.

A levélminták esetében az extrakciós oldószer optimálása esetében a 2014. májusi levélmintákból háromféle oldószerrel (metanol:víz 80:20 v/v%, etanol:víz 80:20 v/v%, víz) készítettem kivonatokat, majd meghatároztam a fenolos vegyületek mennyiségét és az antioxidáns kapacitás értékeit. Az eredmények és gazdaságossági megfontolások alapján a levélminták extrahálására a legalakalmasabb oldószerkelet a metanol:víz 80:20 v/v% lett.

Az extrakciós módszer és oldószer optimálását a bükk kéreg esetében nagyszámú kísérletet végrehajtva végeztem el. Háromféle módszert (mágneses kevertetést, ultrahangos extrakciót és mikrohullámmal segített extrakciót) és háromféle oldószerrel (metanol:víz 80:20 v/v%, etanol:víz 80:20 v/v% és víz) alkalmaztam különböző hőmérséklet- és időbeállítások mellett. A vizsgálati eredmények alapján, szobahőmérsékleten az etanolos oldószerrel készült kivonatok gazdagabbak voltak antioxidáns vegyületekben, mint az ugyanolyan körülmények között készült metanolos kivonatok. Azonban megnövekedett nyomás és hőmérséklet paraméterek mellett a víz is képes olyan hatékony kivonószerré válni, mint az alkoholos elegyek. Ezen megállapítás segítségével a jövőben lehetővé válhat olyan környezetbarát extrakciós technológia megvalósítása, aminek segítségével a bükk kéregből az antioxidáns jellegű vegyületek kinyerhetők, így az erdőgazdálkodás melléktermékei is új felhasználást kaphatnak.

A levélminták esetében elvégeztem az antioxidáns paramétereik összehasonlító vizsgálatát a vegetációs időszak különböző pontjain (5 hónapban), hogy megállapítsam, hogy egy esetleges jövőbeli felhasználás, alkalmazás tekintetében a vegetációs időszak melyik részében található meg, illetve nyerhető ki a vizsgált fajok leveleiből a legtöbb (elsősorban polifenolos) antioxidáns. Növényélettani, növényfiziológiai vizsgálatokra, illetve ilyen jellegű következtetések levonására nem vállalkoztam. 12 Magyarországon elterjedt fafaj (köztük kettő tűlevelű) leveleiből készült metanolos kivonat összes polifenol-, összes flavonoid- és flavan-3-ol-tartalmát, antioxidáns kapacitását (DPPH, ABTS, FRAP) vizsgáltam a különböző hónapokban. Az eltérő módszerekkel mért antioxidáns kapacitás értékek összevethetősége érdekében létrehoztam egy pontrendszerrel, melyben a különböző antioxidáns kapacitás értékeket 0 (leggyengébb) és 1 (legjobb) között normalizáltam mérési módszerenként, majd összegeztem az értékeket. Ennek eredményeként a legnagyobb összegzett antioxidáns kapacitással a közönséges gyertyán, a szelídgesztenye és a csertölgy rendelkezett. A fenolos vegyületek mennyisége szintén a közönséges gyertyán, a szelídgesztenye, és a csertölgy esetében volt a legnagyobb.

Szintén összehasonlító vizsgálatot végeztem el 11 fafaj (amelyek erdészeti és faipari szempontból is jelentősek) **kérgére kiterjedően**, melynek során a fajok héjkérgéből és hancsából is elvégeztem az előbb említett vizsgálatokat. Az irodalomban talált néhány eredményhez képest az általam vizsgált fajok jobban teljesítettek. A kérges esetében is elvégeztem a különböző antioxidáns paramétereket jellemző eredmények összegzését egy pontrendszer segítségével, külön a hancs és külön a

héjkéreg mintákra. A kiértékelés alapján megállapítottam, hogy a vizsgált fajok hánca közül a fekete cseresznye, a szelídgesztenye és a vörösfenyő, a héjkéregből készült extraktumok közül pedig a szelídgesztenye és a vörösfenyő mutatta a legjobb összegzett antioxidáns képességet.

Az antioxidáns hatású polifenolos vegyületek elválasztása és azonosítása a közönséges gyertyán levél- és a bükk kéreg-extraktumából történt meg HPLC-PDA-MS/MS-módszerrel. A közönséges gyertyán levélkivonatának HPLC-PDA-MS/MS vizsgálata során összességében 171 vegyület elválasztására, és 92 azonosítására került sor, köztük fenolsavak, ellagitanninok, gallotanninok, flavonoidok, katechinek, procianidinek, azonban számos vegyület ismeretlen maradt. A legjobb DPPH- és ABTS antioxidáns kapacitással rendelkező augusztusi extraktumban a leggyakrabban előforduló vegyületek a klorogénsav, ellagsav, ellagitanninok, miricetin-, luteolin-, kvercetin- és apigenin-glikozidok voltak, és ezek a vegyületek tehetők a kiemelkedő antioxidáns tulajdonságokért is felelőssé. A nagyszámú polifenolos vegyület és a jelentős antioxidáns kapacitás alapján is azt mondhatom, hogy a közönséges gyertyán levelei egy ígéretes, megújuló forrást jelentenek az antioxidáns hatású extraktanyagok kinyerésére.

A bükk kéregben található vegyületekről az irodalomban található adat, hiszen Dübeler et al. (1997) már végzett ilyen irányú vizsgálatokat, de ilyen részletes és nagyfelbontású kísérletet még nem végeztek el. Összességében a bükk kéregből 37 komponenst választottam el, és 28-at azonosítottam, köztük katechineket, procianidineket, taxifolin-glikozidokat, sziringsav- és koniferil-alkohol származékokat. Azokból az (extrakciós módszer és oldószer optimálásából származó) extraktumokból, amelyek a legtöbb polifenol-tartalmat mutatták, az azonosított vegyületek relatív mennyiségi meghatározására is sor került MRM-átmenetek segítségével. Ebből a mérési sorozatból azt a következtetést vontam le, hogy az extrakciós módszer, az extrakciós körülmények, és az oldószerek alkalmas megválasztásával különböző vegyületcsoportba tartozó komponensek vonhatók ki a bükk kéregéből. A bükk kéreg nagy mennyiségben előforduló faipari melléktermék, így megfelelő minta-előkészítést és extrakciót alkalmazva a kéregben megtalálható polifenolos vegyületek a jövőben gyakorlati célokra is felhasználhatók lehetnek, mely további vizsgálatokat igényel.

8. SUMMARY

There is a lot of information about the antioxidant properties of plant tissues, but in the case of forest trees we have significantly less data. Thus my research was done with niche objectives, but it was also important to choose a sample that has not been used before, and that is an industrial by-product. The forest trees' bark and leaf were met this demands. Nowadays in Hungary the forest cover exceeds 1.93 million hectares, which would be further increased under the National Forest Program. At the same time, logging will also increase, resulting in huge amounts of bark and leaf spoilage. Therefore there is no scarcity of raw materials.

The primary aim of my work was to measure and compare the antioxidant properties of leaf and bark tissues of Hungarian forest tree species, moreover to determine the quality and quantity of the polyphenols responsible for the antioxidant effect. In the course of my work I have chosen three spectrophotometric methods which operate on similar principles, but apply different free radicals (FRAP, DPPH, and ABTS methodology), to characterize the antioxidant capacities of the extracts. For the determination of total phenol content I applied the Folin-Ciocalteu assay, in addition I measured the extracts' total flavonoid and total flavan-3-ol contents. The HPLC-PDA-MS/MS technique was used for the identification and relative qualitative assessment of polyphenolic antioxidants from selected tissues (beech bark, hornbeam leaf).

In the first period of the research in the course of the optimization of sample preparation, I investigated the effect of microwave treatment in both tissues in order to inactivate the polyphenol oxidizing enzymes. In the case of leaves I compared the antioxidant properties of microwaved and after-dried and just dried leaves. Since at most of the examined tree species, microwave treated leaves had higher polyphenol content and improved antioxidant capacity (or treated leaves weren't worse than untreated leaves for some species, eg. beech, Oriental hornbeam, Norway maple), the effect of microwave enzyme inactivation is clearly effective for the preservation of leaf antioxidants of the examined forest species. In the case of bark samples, the effect of microwave treatment was strongly dependent on species. For further bark tests (except beech), I did not use microwave treatment for preparing the bark samples.

In the following, I optimized sampling and extraction methods for leaf and bark samples. In this course I took sample from the same points of Turkey oak's foliage at 5 different times in one day in July 7, 2014, and I investigated the diurnal changes of the antioxidant parameters depending on the solar access. Among the measured parameters, the total flavonoid and total flavan-3-ol-content showed differences among the leaf types.

In the case of leaf samples, during the optimization of extraction solvent composition, I made extracts from the leaf samples of May 2014 with three kinds of solvents (methanol: water 80:20 v/v, ethanol: water 80:20 v/v and water) and

determined the amount of phenolic compounds and the antioxidant capacity values. Based on the results and economical considerations, the most remarkable solvent mixture was methanol:water 80:20 v/v, to extract the leaf samples.

The optimization of the extraction method and of the solvent system was performed in the case of beech bark. Different extraction methods (stirring, sonication, and microwave assisted extraction) with three type of solvents (methanol: water 80:20 v/v, ethanol: water 80:20 v/v and water) using different time/temperature schedules were compared. Based on the test results, the ethanolic extracts were richer in antioxidant compounds at room temperature than the same methanolic extracts. However, with increased pressure and temperature parameters, water can also be as effective extraction solvent as alcoholic mixtures. Using overpressured water, it will be possible in the future to implement an environmentally friendly extraction technology that can be used to gain antioxidants from the bark and other tissues of beech bark or other species, so the by-products of forestry can be reused.

In the case of leaf samples, I performed a comparison of their antioxidant parameters at different points of the vegetation period (5 months) to investigate in which part of the vegetation period the most amount of antioxidants (mainly polyphenol) can be obtained from leaves, respecting a possible future use and application. I did not undertake plant physiological studies or draw deductions of this kind from the results. The total phenol, the total flavonoid, the total flavan-3-ol-content and the antioxidant capacities (DPPH, ABTS, FRAP) were determined from the methanolic leaf extracts of 12 Hungarian species. In order to compare the antioxidant capacity values were measured by different methods, I created a score system, which normalized the antioxidant capacity values between 0 (weakest) and 1 (best) for each measurement method and then summarized the values for each sample. As a result, the European hornbeam, the sweet chestnut and the Turkey oak had the largest summed antioxidant capacity. The amount of phenolic compounds was also the largest in the case of European hornbeam, sweet chestnut and Turkey oak.

A comparative study was carried out on the bark of eleven species too, and in the course of this investigation I also performed the fore-mentioned assays from the inner and outer bark of the species. Compared to some results found in the literature, my examined species performed better results. In the case of bark samples I determined the overall antioxidant capacity of the samples, by the similar evaluation used for leaves. Based on the scoring system (as described above), among the outer bark extracts, the species with the highest overall antioxidant capacity was the sweet chestnut and European larch, and among inner bark extracts the black cherry, weet chestnut and European larch.

The separation and identification of antioxidant polyphenolic compounds was performed by the HPLC-PDA-MS/MS method from the leaf extracts of European hornbeam and from the bark extracts of beech. In the case of European hornbeam leaf

extracts altogether 171 compounds were described, and 92 were identified including phenolic acids, ellagitannins, gallotannins, flavonoids, catechins, procyanidins, and many other unknown compounds. The most abundant compounds in the best DPPH and FRAP antioxidant capacity August extracts were chlorogenic acid, ellagic acid, ellagitannins, myricetin-, luteolin-, quercetin- and apigenin glycosides, which are supposed to be mostly responsible for the excellent antioxidant properties. The large number of polyphenolic compounds and the significant antioxidant capacity that characterizes the leaf extract of European hornbeam, it can be said that the leaves of European hornbeam are a promising renewable source for the extraction of antioxidant compounds in the future.

In the literature we can find data about beech bark compounds, but the high-performance liquid chromatographic/multistage mass spectrometric investigation of beech bark polyphenols has not been done yet. Altogether 37 compounds have been tentatively identified and characterized and 28 were determined by name including catechins, procyanidins, taxifolin-glycosides, syringic acid- and coniferyl alcohol derivatives. From the extracts that showed the most total phenol content, the identified compounds' quantification was also performed via MRM transitions. From this sequence of measurements I concluded that with the adequate selection of the extraction method, conditions and solvent, different type of compounds can be extracted from beech bark. Beech bark is a wood by-product occurs in large quantities, so using appropriate sample preparation and extraction processes, the polyphenolic compounds occurs in bark may also be used for practical purposes in the future, which requires further investigations.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. habil Hofmann Tamásnak, aki segítette doktori munkám elvégzését, segítséget nyújtott az eredmények értelmezésében, megfogalmazásában és publikálásában. Sokszor új oldalról mutatta be az eredményeket, hogy végül aztán közös egyetértésben fogalmazzuk meg a következtetéseket. Nagyon szépen köszönöm, hogy mindig szánt rám időt, és türelmes volt hozzám.

Külön köszönet illeti a Soproni Egyetem Kémiai Intézetének vezetőjét, Dr. habil Rétfalvi Tamást, aki biztosította a kutatás tárgyi feltételeit, továbbá az Intézet minden munkatársát, akik doktori tanulmányaim során segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom Stefanovitsné Dr. Bányai Évának, aki rengeteg jó tanáccsal és gyakorlati tapasztalattal segítette méréseim elvégzését.

Köszönettel tartozom még Dr. Németh Lászlónak, a Matematikai Intézetből, aki sokat segített az eredmények statisztikai kiértékelésében.

Köszönöm férjemnek, Ákosnak, aki támogatta doktori tanulmányaim elvégzését, és mindig mellettem állt.

Köszönettel tartozom még családom többi tagjának is, akik mindig büszkén támogattak.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Alañón**, M.E., García-Ruiz, A., Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., Moreno-Arribas, M.V., 2015. Antimicrobial and antioxidant activity of pressurized liquid extracts from oenological woods. *Food Control* 50, 581–588. doi:10.1016/j.foodcont.2014.09.043
- Alfredsen**, G., Solheim, H., Slimestad, R., 2008. Antifungal effect of bark extracts from some European tree species. *Eur. J. For. Res.* 127, 387–393. doi:10.1007/s10342-008-0222-x
- Apak**, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12, 1496–1547. doi:10.3390/12071496
- Apak**, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7970–7981. doi:10.1021/jf048741x
- Apetrei**, C.L., Tuchilus, C., Aprotosae, A.C., Oprea, A., Malterud, K.E., Miron, A., 2011. Chemical, antioxidant and antimicrobial investigations of *Pinus cembra* L. bark and needles. *Molecules* 7773–7788. doi:10.3390/molecules16097773
- Arslan**, D., Özcan, M.M., Mengeş, H.O., 2010. Evaluation of drying methods with respect to drying parameters, some nutritional and colour characteristics of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Energy Convers. Manag.* 51, 2769–2775. doi:10.1016/j.enconman.2010.06.013
- Awika**, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6657–6662. doi:10.1021/jf034790i
- Ayan**, A.K., Yanar, O., Cirak, C., Bilgener, M., 2007. Morphogenetic and diurnal variation of total phenols in some *Hypericum* species from Turkey during their phenological cycles. *Bangladesh J. Bot.* 36, 39–46. doi:10.3329/bjb.v36i1.1547
- Balogh**, E., 2010. Antioxidáns kapacitás meghatározása és ennek kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata bogyós gyümölcsök esetében. Budapesti Corvinus Egyetem, PhD-értékezés.
- Benayad**, Z., Gómez-Cordovés, C., Es-Safi, N.E., 2014. Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC–DAD–ESI/MS analysis. *J. Food Compos. Anal.* 35, 21–29. doi:http://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.04.002
- Benzie**, I., Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bianchini**, J.P., Gaydou, E.M., 1983. Substituent effect of polymethoxylated flavones in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 259, 150–153. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87988-7
- Boudet**, A.-M., 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68, 2722–2735. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012
- Boulekbache-Makhlouf**, L., Meudec, E., Mazauric, J.-P., Madani, K., Cheynier, V., 2013. Qualitative and semi-quantitative analysis of phenolics in *Eucalyptus globulus* leaves by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 24, 162–

170. doi:10.1002/pca.2396
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E., 2015.** Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Ind. Crops Prod.* 77, 590–601. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.018
- Bravo, L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317–333.
- Burger, K., 2002.** Az analitikai kémia alapjai. Kémiai és műszeres elemzés, 6. kiadás. Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány, Budapest.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013.** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Castañeda-Arriaga, R., Vivier-Bunge, A., Raul Alvarez-Idaboy, J., 2016.** Primary antioxidant and metal-binding effects of tiopronin: A theoretical investigation of its action mechanism. *Comput. Theor. Chem.* 1077, 48–57. doi:10.1016/j.comptc.2015.10.012
- Ceni, G.C., Baldissera, E.M., dos Santos Primo, M., Antunes, O.A.C., Dariva, C., de Oliveira, J.V., de Oliveira, D., 2009.** Influence of application of microwave energy on quality parameters of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Food Technol. Biotechnol.* 47, 221–226.
- Chan, E., Lim, Y., Wong, S., 2011.** Antioxidant properties of ginger leaves: An overview. *Free Radicals Antioxidants* 1, 6–16. doi:10.5530/ax.2011.1.3
- Chan, E.W.C., Kong, Lei, Q., Yee, K.Y., Chua, W.Y., Loo, T.Y., 2012.** Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried *Labiatae* herbs. *Free Radicals Antioxidants* 2, 20–27. doi:10.5530/ax.2012.3.3
- Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Atik-Bekara, F., Ksouri, R., Azzi, R., Boucherit, Z., Tefiani, C., Larbat, R., 2015.** Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MSⁿ characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus*. *Ind. Crops Prod.* 64, 182–187. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.051
- Chávez-Reyes, Y., Dorantes-alvarez, L., Arrieta-Baez, D., Osorio-Esquivel, O., Ortiz-Moreno, A., 2013.** Polyphenol oxidase inactivation by microwave oven and its effect on phenolic profile of loquat (*Eriobotrya japonica*) fruit. *Food Nutr. Sci.* 4, 87–94.
- Cieckiewicz, E., Angenot, L., Gras, T., Kiss, R., Frédérick, M., 2012.** Potential anticancer activity of young *Carpinus betulus* leaves. *Phytomedicine* 19, 278–283. doi:10.1016/j.phymed.2011.09.072
- Çirak, C., Sağlam, B., Ayan, A.K., Kevseroğlu, K., 2006.** Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 1–13. doi:10.1016/j.bse.2005.06.004
- Co, M., Fagerlund, A., Engman, L., Sunnerheim, K., Sjöberg, P.J.R., Turner, C., 2012.** Extraction of antioxidants from spruce (*Picea abies*) bark using eco-friendly solvents. *Phytochem. Anal.* 23, 1–11. doi:10.1002/pca.1316
- Comandini, P., Lerma-García, M.J., Simó-Alfonso, E.F., Toschi, T.G., 2014.** Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC–DAD–MS. *Food Chem.* 157, 290–295. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.003
- Cornelli, U., 2009.** Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin. Dermatol.* 27, 175–194. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.01.010
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2015.** Reactive sulfur species (RSS): possible new players in the oxidative metabolism of plant peroxisomes. *Front. Plant Sci.* doi:10.3389/fpls.2015.00116

- Coskun, O.**, Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* 51, 117–123. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2004.06.002
- Cuevas-Valenzuela, J.**, González-Rojas, Á., Wisniak, J., Apelblat, A., Pérez-Correa, J.R., 2014. Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277.6–331.2K: Fundamental data to design polyphenol extraction processes. *Fluid Phase Equilib.* 382, 279–285. doi:10.1016/j.fluid.2014.09.013
- Ćujić, N.**, Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S., 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* 194, 135–142. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.008
- Cuyckens, F.**, Claeys, M., 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39, 1–15. doi:10.1002/jms.585
- Czirok, I.**, Dávid, J., Fecser, I., Hajdu, T., Király, P., Kolozs, L., Kovácsévics, P., Lapos, T., Madas, K., Pápai, G., Péti, M., Pluzsik, A., Solti, G., Szepesi, A., Szolnyik, C., Wisnowszky, K., 2014. Magyar Erdők. A magyar erdőgazdálkodás. Vidékfejlesztési Minisztérium és a NÉBIH Erdészeti Igazgatóság.
- Csapó, J.**, Csapóné Kiss, Z., 2003. Élelmiszer - kémia. Mezőgazda Kiadó.
- Dai, J.**, Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313–7352. doi:10.3390/molecules15107313
- De Oliveira, S.**, De Souza, G.A., Eckert, C.R., Silva, T.A., Sobral, E.S., Fávero, O.A., Ferreira, M.J.P., Romoff, P., Baader, W.J., 2014. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim. Nova* 37, 497–503. doi:10.5935/0100-4042.20140076
- Díaz Reinoso, B.**, Couto, D., Moure, A., Fernandes, E., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2012. Optimization of antioxidants - Extraction from *Castanea sativa* leaves. *Chem. Eng. J.* 203, 101–109. doi:10.1016/j.cej.2012.06.122
- Dilshad, E.**, Zafar, S., Ismail, H., Waheed, M.T., Cusido, R.M., Palazon, J., Mirza, B., 2016. Effect of rol genes on polyphenols biosynthesis in *Artemisia annua* and their effect on antioxidant and cytotoxic potential of the plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 179, 1456–1468. doi:10.1007/s12010-016-2077-9
- Diouf, P.N.**, Stevanovic, T., Cloutier, A., 2009. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chem.* 113, 897–902. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.016
- dos Santos, M.D.**, Almeida, M.C., Lopes, N.P., de Souza, G.E.P., 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2236–2240. doi:10.1248/bpb.29.2236
- Dübeler, A.**, Voltmer, G., Gora, V., Lunderstädt, J., Zeeck, A., 1997. Phenols from *Fagus sylvatica* and their role in defence against *Cryptococcus fagisuga*. *Phytochemistry* 45, 51–57. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00771-6
- Ewers, F.W.**, Schmid, R., 1981. Longevity of needle fascicles of *Pinus longaeva* (Bristlecone pine) and other North American pines. *Oecologia* 51, 107–115. doi:10.1007/BF00344660
- Fazli, R.**, Nazarnezhad, N., Ebrahimzadeh, M.A., Zabihzadeh, M., 2013. Evaluation of the antioxidant capacities and total phenolic contents of beech and oak barks. *Armaghan-e-Danesh* 18(2), 137–145.
- Fenn, J.B.**, Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray

- ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Feucht, W., Treutter, D., 1994.** Accumulation of flavanols in yellowing beech leaves from forest decline sites. *Tree Physiol.* 14, 403–412.
- Frédérich, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., Mégalizzi, V., Angenot, L., Kiss, R., 2009.** In vitro anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest. *Planta Med.* 75, 1634–1637. doi:10.1055/s-0029-1185867
- Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., Chen, F., 2015.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of Chinese tallow tree leaves. *Ind. Crops Prod.* 76, 374–377. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.030
- Gao, H., Shupe, T.F., Eberhardt, T.L., Hse, C.Y., 2007.** Antioxidant activity of extracts from the wood and bark of Port Orford cedar. *J. Wood Sci.* 53, 147–152. doi:10.1007/s10086-006-0850-z
- García-Pérez, M.E., Royer, M., Herbette, G., Desjardins, Y., Pouliot, R., Stevanovic, T., 2012.** *Picea mariana* bark: A new source of trans-resveratrol and other bioactive polyphenols. *Food Chem.* 135, 1173–1182. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.050
- Germanò, M.P., Cacciola, F., Donato, P., Dugo, P., Certo, G., D'Angelo, V., Mondello, L., Rapisarda, A., 2012.** *Betula pendula* leaves: Polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products. *Fitoterapia* 83, 877–882. doi:10.1016/j.fitote.2012.03.021
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C., 2000.** Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 1106–1114. doi:10.1016/S0891-5849(00)00394-4
- Ghobadi, M., Taherabadi, S., Ghobadi, M., 2013.** Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Ind. Crop. Prod.* 50, 29–38. doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.009
- Glynn, C., Herms, D.A., Egawa, M., Hansen, R., Mattson, W.J., 2003.** Effects of nutrient availability on biomass allocation as well as constitutive and rapid induced herbivore resistance in poplar. *OIKOS* 101, 385–397.
- Gracza, P., 2004.** Növényiszervezetan. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- Grysczyńska, A., Mielcarek, S., Buchwald, W., 2011.** The determination of flavan-3-ol content in the root of *Rhodiola Kirilowii*. *Herba Pol.* 57, 27–37.
- Hemingway, W.R., Laks, E.P. (Eds.), 1992.** Plant Polyphenols - synthesis, properties, significance. Springer - Science+Business Media, LLC.
- Hofmann, T., Albert, L., Rétfalvi, T., 2004.** Quantitative TLC analysis of (+)-catechin and (–)-epicatechin from *Fagus sylvatica* L. with and without red heartwood. *JPC - J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* 17, 350–354. doi:10.1556/JPC.17.2004.5.5
- Hofmann, T., Nebehaj, E., Albert, L., 2016.** Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometry. *Ind. Crops Prod.* 87, 340–349. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.037
- Hofmann, T., Nebehaj, E., Albert, L., 2015a.** The high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometric investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols. *J. Chromatogr. A* 1393. doi:10.1016/j.chroma.2015.03.030
- Hofmann, T., Nebehaj, E., Stefanovits-Bányai, É., Albert, L., 2015b.** Antioxidant capacity and total phenol content of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark extracts. *Ind. Crops Prod.* 77. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.008
- Huang, Y., Sheng, J., Yang, F., Hu, Q., 2007.** Effect of enzyme inactivation by

- microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *J. Food Eng.* 78, 687–692. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.007
- Iqbal, S., Bhanger, M.I., 2006.** Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *J. Food Compos. Anal.* 19, 544–551. doi:10.1016/j.jfca.2005.05.001
- Irfan, I., Pawelzik, E., Luecke, W., 1998.** The use of microwave to inactivate enzymes in rape seeds, in: *Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection*. Beijing, pp. 1667–1670.
- Jaiswal, R., Jayasinghe, L., Kuhnert, N., 2012.** Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (*Ericaceae*) by tandem LC–MS. *J. Mass Spectrom.* 47, 502–515. doi:10.1002/jms.2954
- Jovanović, A.A., Đorđević, V.B., Zdunić, G.M., Pljevljakušić, D.S., Šavikin, K.P., Godevac, D.M., Bugarski, B.M., 2017.** Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Sep. Purif. Technol.* 179, 369–380. doi:10.1016/j.seppur.2017.01.055
- Kalita, P., Barman, T.K., Pal, T.K., Kalita, R., 2013.** Estimation of total flavonoids content (TFC) and anti oxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *J. Drug Deliv. Ther.* 3, 33–37.
- Karioti, A., Bilia, A.R., Gabbiani, C., Messori, L., Skaltsa, H., 2009.** Proanthocyanidin glycosides from the leaves of *Quercus ilex* L. (*Fagaceae*). *Tetrahedron Lett.* 50, 1771–1776. doi:10.1016/j.tetlet.2009.01.158
- Kaushik, D., Roychoudhury, A., 2014.** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2, 53 (1-13). doi:10.3389/fenvs.2014.00053
- Kedare, S.B., Singh, R.P., 2011.** Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 48, 412–422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- Khokhar, S., Venema, D., Hollmann, P.C.H., Dekker, M., Jongen, W., 1997.** A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Lett.* 114, 171–172. doi:10.1016/S0304-3835(97)04653-3
- Kristóf, Z., Bóka, K., Vági, P., 2013.** Mikroszkópi segédanyag a növénysszervezetten és sejttan tárgyakhoz. *ELTE, Növénysszervezettani Tanszék jegyzete* 1–119.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007.** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 244–249. doi:10.1016/j.plaphy.2007.02.001
- Kubel, H., Weißmann, G., Lange, W., 1988.** Untersuchungen zur Cancerogenität von Holzstaub. *Holz als Roh- und Werkst.* 46, 215–220. doi:10.1007/BF02608116
- Kuiters, A.T., Sarink, H.M., 1986.** Leaching of phenolic compounds from leaf and needle litter of several deciduous and coniferous trees. *Soil Biol. Biochem.* 18, 475–480.
- Lahiri-Chatterjee, M., Katiyar, S.K., Mohan, R.R., Agarwal, R., 1999.** A flavonoid antioxidant, silymarin, affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model. *Cancer Res.* 59, 622–632.
- Lamounier, K.C., Cunha, L.C.S., De Moraes, S.A.L., De Aquino, F.J.T., Chang, R., Do Nascimento, E.A., De Souza, M.G.M., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., 2012.** Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2012. doi:10.1155/2012/451039

- Lesjak**, M.M., Beara, I.N., Orčić, D.Z., Anačkov, G.T., Balog, K.J., Francisković, M.M., Mimica-Dukić, N.M., 2011. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. As a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chem.* 124, 850–856. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.006
- Lev-Yadun**, S., 2001. Bark, in: eLS. John Wiley & Sons Ltd., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. doi:10.1002/9780470015902.a0002078.pub2
- Liang**, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G., Yang, L., 2012. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res. Int.* 46, 76–82. doi:10.1016/j.foodres.2011.11.024
- Lillo**, C., Lea, U.S., Ruoff, P., 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell Environ.* 31, 587–601. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01748.x
- Liu**, Y., Yang, L., Zu, Y., Zhao, C., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, Z., Wang, W., 2012. Development of an ionic liquid-based microwave-assisted method for simultaneous extraction and distillation for determination of proanthocyanidins and essential oil in *Cortex cinnamomi*. *Food Chem.* 135, 2514–2521. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.001
- Ludwiczuk**, A., Saha, A., Kuzuhara, T., Asakawa, Y., 2011. Bioactivity guided isolation of anticancer constituents from leaves of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae). *Phytomedicine* 18, 491–498. doi:10.1016/j.phymed.2010.10.005
- Maimoona**, A., Naeem, I., Saddiqe, Z., Ali, N., Ahmed, G., Shah, I., 2011. Analysis of total flavonoids and phenolics in different fractions of bark and needle extracts of *Pinus roxburghii* and *Pinus wallichiana*. *J. Med. Plant Res.* 5, 2724–2728.
- Makk**, Á.N., Hofmann, T., Rétfalvi, T., 2013. A (+)-catechin kinyerése tölgyek kérgéből. *Faipar* 16–26.
- Mämmelä**, P., 2002. Polyphenols of hardwood species. Monitoring of wood dust exposure. *Kuopio Univ. Publ. C. Nat. Environ. Sci.* 136, 1–77.
- Mämmelä**, P., 2001. Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Analyst* 126, 1535–1538.
- Marín**, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F., 2015. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res. Int.* 1–18.
- Meng**, C.K., Mann, M., Fenn, J.B., 1988. Of protons or proteins. *Zeitschrift für Phys. D Atoms, Mol. Clust.* 10, 361–368. doi:10.1007/BF01384871
- Miller**, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407 LP-412.
- Molnár**, S., 2004. Faanyagismeret. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- Mounguengui**, S., Dumarçay, S., Gérardin, P., 2007. Investigation on catechin as a beech wood decay biomarker. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60, 238–244. doi:10.1016/j.ibiod.2007.03.007
- Nemes**, A., 2009. A különböző teakészítési módok és az antioxidáns kapacitás közötti összefüggések. Budapesti Corvinus Egyetem, diplomamunka.
- Noriega**, P., Sola, M., Barukcic, A., Garcia, K., Osorio, E., 2015. Cosmetic antioxidant potential of extracts from species of the *Cinchona pubescens* (Vahl). *Int. J. Phytocosmetics Nat. Ingredients* 2:14. doi:10.15171/ijpni.2015.14.
- Ogunwusi**, A.A., 2013. Potentials of industrial utilization of bark. *J. Nat. Sci. Res.* 3, 106–115.

- Olchowik, E., Sciepuk, A., Mavlyanov, S., Abdullajanova, N., Zamaraeva, M., 2012.** Antioxidant capacities of polyphenols from Sumac (*Rhus typhina* L.) leaves in protection of erythrocytes against oxidative damage. *Biomed. Prev. Nutr.* 2, 99–105. doi:10.1016/j.bionut.2011.06.008
- Orphanides, A., Goulas, V., Gekas, V., 2013.** Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech J. Food Sci.* 31, 509–513.
- Ossipov, V., Lojonen, J., Ossipova, S., Haukioja, E., Pihlaja, K., 1997.** Gallotannins of birch (*Betula pubescens*) leaves: HPLC separation and quantification. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 493–504. doi:10.1016/S0305-1978(97)00032-X
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278. doi:10.4161/oxim.2.5.9498
- Papp, M., 2003.** A növények szövetei és a szervek szövettana. Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen.
- Pásztory, Z., Mohácsiné, I.R., Gorbacheva, G., Börcsök, Z., 2016.** The utilization of tree bark. *BioResources* 11, 7859–7888. doi:10.15376/biores.11.3.Pasztory
- Peltzer, D., Polle, A., 2001.** Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): Responses to light and temperature. *Physiol. Plant.* 111, 158–164. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110205.x
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008.** Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 89–96. doi:10.1073/pnas.0804252105
- Pietarinen, S.P., Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Holmbom, B.R., 2006.** Knotwood and bark extracts: Strong antioxidants from waste materials. *J. Wood Sci.* 52, 436–444. doi:10.1007/s10086-005-0780-1
- Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L., 2003.** Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 28, 257–312. doi:10.1016/S1572-5995(03)80143-6
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., 2006.** Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 579–590. doi:10.1016/j.tifs.2006.05.003
- Pirvu, L., Grigore, A., Bubueanu, C., Draghici, E., 2013.** Comparative analytical and antioxidant activity studies on a series of *Fagus sylvatica* L. leaves extracts. *JPC - J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* 26, 237–242. doi:10.1556/JPC.26.2013.3.6
- Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Yu, M.-J., Knepper, M.A., 2007.** Tandem mass spectrometry in physiology. *Physiology* 22, 390–400. doi:10.1152/physiol.00025.2007
- Pratt, D.E., Miller, E.E., 1984.** A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1064–1067. doi:10.1007/BF02636221
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Prusinowska, R., Smigielski, K., 2015.** Losses of essential oils and antioxidants during the drying of herbs and spices. A review. *Nauk. Inz. I Technol.* 2, 51–62. doi:10.15611/nit.2015.2.05
- Rao, S., Sireesha, K., Aparna, Y., Sadanandam, M., 2011.** Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free Radicals Antioxidants* 1, 2–7. doi:10.5530/ax.2011.4.2
- Raven, P., Evert, R., Eichorn, S., 1999.** Biology of plants. WH. Freeman and Company, Worth Publishers.
- Razali, N., Mat-Junit, S., Abdul-Muthalib, A.F., Subramaniam, S., Abdul-Aziz, A., 2012.** Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L. *Food Chem.* 131, 441–448.

- doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.001
- Rebey, I.B., Jabri-karoui, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B., 2012.** Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Ind. Crop. Prod.* 36, 238–245. doi:10.1016/j.indcrop.2011.09.013
- Robbins, R.J., 2003.** Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866–2887. doi:10.1021/jf026182t
- Ruiz, J.M., Romero, L., 2001.** Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 25, 651–681.
- Salminen, J.P., Ossipov, V., Loponen, J., Haukioja, E., Pihlaja, K., 1999.** Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 864, 283–291. doi:10.1016/S0021-9673(99)01036-5
- Sanchez-Rabaneda, F., Jauregui, O., Casals, I., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventos, R.M., 2003.** Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* 38, 35–42. doi:10.1002/jms.395
- Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M., 2002.** Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 162, 981–987. doi:10.1016/S0168-9452(02)00052-3
- Santos, S.A.O., Villaverde, J.J., Freire, C.S.R., Domingues, R.M.M., Neto, C.P., Silvestre, A.J.D., 2012.** Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. *Ind. Crops Prod.* 39, 120–127. doi:10.1016/j.indcrop.2012.02.003
- Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, Á.M., Fernández De Simón, B., Hernández, T., Estrella, I., 2010.** Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9631–9640. doi:10.1021/jf102718t
- Sathya, A., Siddhuraju, P., 2012.** Role of phenolics as antioxidants, biomolecule protectors and as anti-diabetic factors - Evaluation on bark and empty pods of *Acacia auriculiformis*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 757–765. doi:10.1016/S1995-7645(12)60139-4
- Sati, P., Pandey, A., Rawat, S., Rani, A., 2013.** Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system. *J. Pharm. Res.* 7, 804–809. doi:10.1016/j.jopr.2013.09.001
- Sawada, Y., Nakabayashi, R., Yamada, Y., Suzuki, M., Sato, M., Sakata, A., 2012.** Phytochemistry RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* 82, 38–45. doi:10.1016/j.phytochem.2012.07.007
- Scalbert, A., Monties, B., Favre, J., 1988.** Polyphenols of *Quercus robur*: adult tree and in vitro grown calli and shoots. *Phytochemistry* 27, 3483–3488.
- Schreiber, A., 2010.** Advantages of using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to quantify and identify the presence of pesticides in water and soil samples. *AB Sciex applikáció.*
- Sen, S., De, B., Devanna, N., Chakraborty, R., 2013.** Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chin. J. Nat. Med.* 11, 149–157. doi:10.1016/S1875-5364(13)60042-4
- Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009.** DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202–1205. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008

- Shui, G., Leong, L.P., 2004.** Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1022, 67–75. doi:10.1016/j.chroma.2003.09.055
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Srinivas, K., King, J.W., Howard, L.R., Monrad, J.K., 2010.** Solubility of gallic acid, catechin, and protocatechuic acid in subcritical water from (298.75 to 415.85) K. *J. Chem. Eng. Data* 55, 3101–3108. doi:10.1021/je901097n
- St-Pierre, F., Achim, A., Stevanovic, T., 2013.** Composition of ethanolic extracts of wood and bark from *Acer saccharum* and *Betula alleghaniensis* trees of different vigor classes. *Ind. Crops Prod.* 41, 179–187. doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.027
- Stratil, P., Klejdus, B., Kubáň, V., 2007.** Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* 71, 1741–1751. doi:10.1016/j.talanta.2006.08.012
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J., 2009.** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113, 1226–1233. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.013
- Taylor, G., 1964.** Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci.* 280, 383–397.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F., 2013.** Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res. Int.* 11.
- Tejeda, L., Alvarado, J.A., De, M., Alvarez, M.T., Chawade, A., Nilsson, L., 2014.** Relating genes in the biosynthesis of the polyphenol composition of Andean colored potato collection. *Food Sci. Nutr.* 2(1), 46–57. doi:10.1002/fsn3.69
- Teleszko, M., Wojdyło, A., 2015.** Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. *J. Funct. Foods* 14, 736–746. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., 2005.** Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of guava fruits. *Southeast Asian J. Trop. Med. public Heal.* 36 Suppl 4, 254–257. doi:10.1002/1521-3803.2002.09.01.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., 2006.** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19, 669–675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- Ting, S. V., Rouseff, R.L., Dougherty, M.H., Attaway, J.A., 1979.** Determination of some methoxylated flavones in citrus juices by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 44, 69–71. doi:10.1111/j.1365-2621.1979.tb10006.x
- Toivonen, P.M.A., Brummell, D.A., 2008.** Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 48, 1–14. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.09.004
- Torres, J.L., Lozano, C., Julià, L., Sánchez-Baeza, F.J., Anglada, J.M., Centelles, J.J., Cascante, M., 2002.** Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 2497–2509. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00127-X
- Treutter, D., 1989.** Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr. A* 467, 185–193. doi:10.1016/S0021-9673(01)93963-9
- Tsao, R., 2010.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. doi:10.3390/nu2121231
- Újszászy, K., Frigyes, D., 2003.** Tömegspektrometria. ELTE, Általános és Szervetlen

- Kémiai Tanszék jegyzete 1–61.
- Uysal, S., Zengin, G., Aktumsek, A., Karatas, S., 2016.** Chemical and biological approaches on nine fruit tree leaves collected from the Mediterranean region of Turkey. *J. Funct. Foods* 22, 518–532. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.006
- Vagiri, M., Conner, S., Stewart, D., Andersson, S.C., Verrall, S., Johansson, E., Rumpunen, K., 2015.** Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. *Food Chem.* 172, 135–142. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.041
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M.S., González-Álvarez, J., Antorrena, G., 2008.** Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Ind. Crops Prod.* 28, 279–285. doi:10.1016/j.indcrop.2008.03.003
- Vázquez, G., Santos, J., Freire, M.S., Antorrena, G., González-Álvarez, J., 2012.** Extraction of antioxidants from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark. *Wood Sci. Technol.* 46, 443–457. doi:10.1007/s00226-011-0418-y
- Vek, V., Oven, P., Humar, M., 2013.** Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 77, 91–97. doi:10.1016/j.ibiod.2012.10.013
- Vukics, V., Guttman, A., 2010.** Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 29, 1–16. doi:10.1002/mas.20212
- Wainhouse, D., Ashburner, R., Ward, E., Rose, J., 1998.** The effect of variation in light and nitrogen on growth and defence in young Sitka Spruce. *Funct. Ecol.* 12, 561–572. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00232.x
- Wang, J., Qin, Y., Kong, W., Wang, Z., Zeng, L., Fang, F., Jin, C., Zhao, Y., Xiao, X., 2011.** Identification of the antidiarrhoeal components in official rhubarb using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 129, 1737–1743. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.041
- Wang, S.-Y., Wu, J.-H., Cheng, S.-S., Lo, C.-P., Chang, H.-N., Shyur, L.-F., Chang, S.-T., 2004.** Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark, and heartwood. *J. Wood Sci.* 50, 422–426. doi:10.1007/s10086-003-0580-4
- Watson, R.R., 2014.** Polyphenols in Plants: isolation, purification and extract preparation. doi:10.1016/B978-0-12-397934-6.01001-9
- Wilm, M., 2011.** Principles of electrospray ionization. *Mol. Cell. Proteomics.* doi:10.1074/mcp.M111.009407
- Winkel-Shirley, B., 2002.** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 218–223. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X
- Yamamoto, E., Inciong, E.J., Davin, L.B., Lewis, N.G., 1990.** Formation of cisciniferin in cell-free extracts of *Fagus grandifolia* Ehrh bark. *Plant Physiol* 94, 209–213.
- Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., Gonzalez, D.O., Clough, S.J., Vodkin, L.O., 2006.** Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of Glycine max in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biol.* 6, 26. doi:10.1186/1471-2229-6-26
- Zell, J., Hanewinkel, M., Seeling, U., 2004.** Financial optimisation of target diameter harvest of European beech (*Fagus sylvatica*) considering the risk of decrease of timber quality due to red heartwood. *For. Policy Econ.* 6, 579–593. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1389-9341(03)00007-8
- Zhang, L., Yang, M., Gao, J., Jin, S., Wu, Z., Wu, L., Zhang, X., 2016.** Seasonal variation and gender pattern of phenolic and flavonoid contents in *Pistacia chinensis*

- Bunge inflorescences and leaves. J. Plant Physiol. 191, 36–44. doi:10.1016/j.jplph.2015.11.014
- Zhang, Q., Su, Y., Zhang, J., 2013.** Seasonal difference in antioxidant capacity and active compounds contents of *Eucommia ulmoides* Oliver leaf. Molecules 18, 1857–1868. doi:10.3390/molecules18021857
- Zhang, S.J., Lin, Y.M., Zhou, H.C., Wei, S.D., Lin, G.H., Ye, G.F., 2010.** Antioxidant tannins from stem bark and fine root of *Casuarina equisetifolia*. Molecules 5658–5670. doi:10.3390/molecules15085658
- Zule, J., Može, A., 2003.** GC analysis of extractive compounds in beech wood. J. Sep. Sci. 26, 1292–1294. doi:10.1002/jssc.200301416

URL HIVATKOZÁSOK

URL 1.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/gallicacid1701214991711?lang=hu®ion=HU>, 2017. 11. 07.

URL 2.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/ellagicacid3021947666411?lang=hu®ion=HU>, 2017. 11. 07.

URL 3.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5630?lang=hu®ion=HU>, 2017. 11. 07.

URL 4. http://www.chemsrc.com/en/cas/14051-53-7_1332312.html, 2017.05.14.

URL 5. <http://www.emk.nyme.hu/index.php?id=2788>, 2017. 11. 05.

URL 6. <https://www.emaze.com/@ATIWLRRFF/flowers>, 2017. 11.04.

URL 7. http://novszerv.elte.hu/oktatas/novszerv/201011/II/8_level2.pdf, 2017.11.05.

URL 8. <https://www.shutterstock.com/hu/image-photo/cross-section-pine-leaf-needle-showing-97790771?src=GqSi4MET43hQLHwP07IFRQ-1-0>, 2017.11.04.

URL 9. http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_ome002b.html, 2017.01.25.

URL 10. http://www.biomasszaeromuvek.hu/biomassza/erdeszeti_termekek, 2017.01.14.

URL 11. https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_ome003b.html, 2017.01.25.

URL 12. <https://www.kfki.hu/~cheminfo/hun/food/technol/zoldseg/zoldseg3.html>, 2017.07.23.

URL 13. <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/47/47intro.html>, 2017.02.13.

URL 14. <http://www.thetruthaboutforensicscience.com/mass-spectroscopy-for-lawyers-part-4-what-types-of-analysis-can-be-done/> 2017.04.18.

URL 15. https://sciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-cms_041969.pdf, 2017.09.02.

URL 16.

http://www.chem.elte.hu/system/files/201310_HPLC_ESI_MS_MS_leiras.pdf, 2017. 04.18.

URL 17. <https://sciex.com/applications/pharma-and-biopharma/biologics-characterization/biologics-peptide-mapping>, 2017. 04.19.

URL 18. <http://www.massbank.jp/>, 2017.07.23.

URL 19. http://www.teautja.hu/teazine/high-tea/a-tea-kemiaja/tea_szakdolgozat, 2017. 11. 07.

URL 20. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2010-0008_farma/3/3_2/321harom211.html, 2017.05.15.

Saját publikációk a doktori értekezés témájában

Referált folyóiratban megjelent szakcikk

1. **Tálos-Nebhaj E.**, Hofmann T., Albert L.
Seasonal changes of natural antioxidant content in the leaves of Hungarian forest trees
INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS **98**: pp. 53-59. (2017)
2. Hofmann T., **Nebhaj E.**, Albert L.
Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometry
INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS **87**: pp. 340-349. (2016)
3. Hofmann T., **Nebhaj E.**, Stefanovits-Bányai É., Albert L.
Antioxidant capacity and total phenol content of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark extracts
INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS **77**: pp. 375-381. (2015)
4. Hofmann Tamás, **Nebhaj Esztella**, Albert Levente
The high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometric investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A **1393**: pp. 96-105. (2015)

Konferencia összefoglaló

5. **Nebhaj Esztella**, Albert Levente, Hofmann Tamás
Magyarországi fafajok leveleinek antioxidáns tulajdonságai és ezek szezonális változása
In: Bidló A., Facskó F. (szerk.)
V. Kari Tudományos Konferencia - Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar: a konferencia előadásainak és posztereinek kivonatai. 42 p.
Konferencia helye, ideje: Sopron, Magyarország, 2015.10.21 Sopron: Nyugat-magyarországi Egyetem Kiadó, 2015. p. 38.
(ISBN:978-963-334-237-4)
6. Németh László, **Nebhaj Esztella**, Albert Levente, Hofmann Tamás
Bükk (*Fagus sylvatica* L.) kéreg antioxidáns vegyületeinek hatékonyság-vizsgálata különböző matematikai módszerekkel
In: Bidló A., Facskó F. (szerk.)
V. Kari Tudományos Konferencia - Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar: a konferencia előadásainak és posztereinek kivonatai. 42 p.
Konferencia helye, ideje: Sopron, Magyarország, 2015.10.21 Sopron: Nyugat-magyarországi Egyetem Kiadó, 2015. p. 38. (ISBN:978-963-334-237-4)

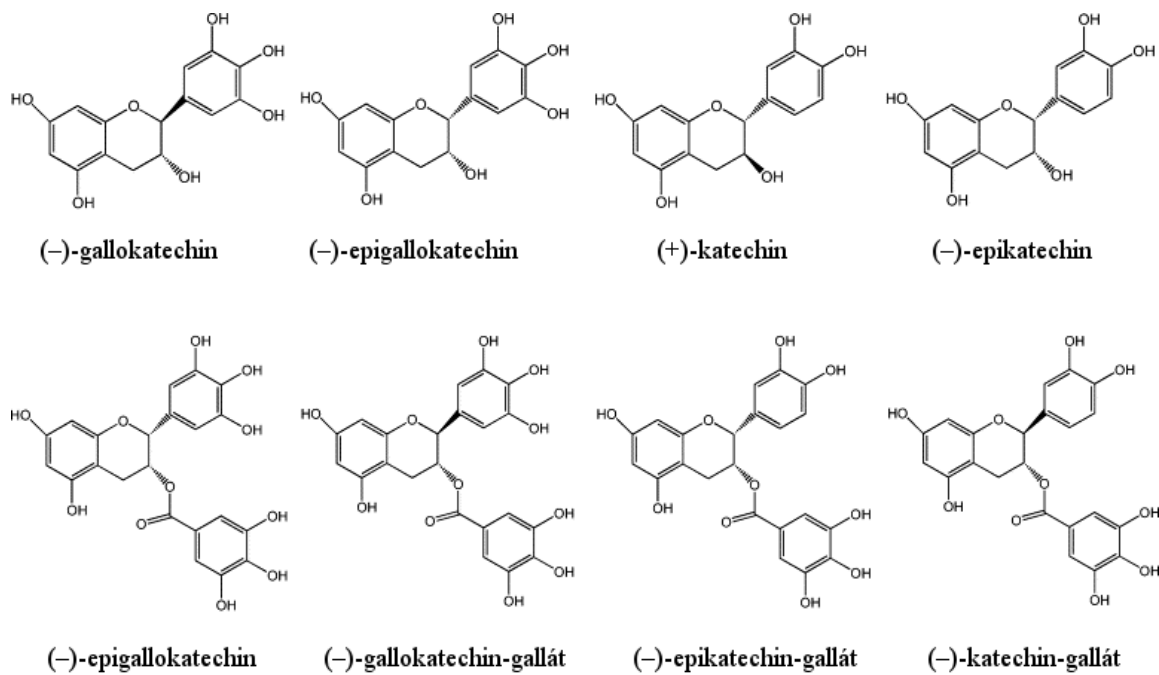
7. Hofmann T., **Nebehaj E.**, Eső I., Fehér S., Albert L., Stefanovits-Bányai É.
Comparative analysis of antioxidant extractives in the bark tissues of selected wood species In: Róbert Németh, Alfred Teischinger, Uwe Schmitt (szerk.)
Eco-efficient resource wood with special focus on hardwoods: IAWS PLENARY MEETING 2014 - SOPRON (HUNGARY) – VIENNA (AUSTRIA). 115 p.
Konferencia helye, ideje: Bécs, Ausztria, 2014.09.15-2014.09.18. Sopron: Nyugat-magyarországi Egyetem (NYME), 2014. p. 15.
(ISBN:978-963-334-191-9)
8. **Nebehaj E.**, Stefanovitsné Bányai É., Hofmann T.
Falevelek totálfenol tartalmának és antioxidáns értékének meghatározása különböző fajok esetében
In: Bidló András, Szabó Zília (szerk.) Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdőmérnöki Kar, Kari Tudományos Konferencia: A konferencia előadásainak és posztereinek kivonata. Konferencia helye, ideje: Sopron, Magyarország, 2013.12.10
Sopron: Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar, p. 45.

Konferencia előadás és poszter

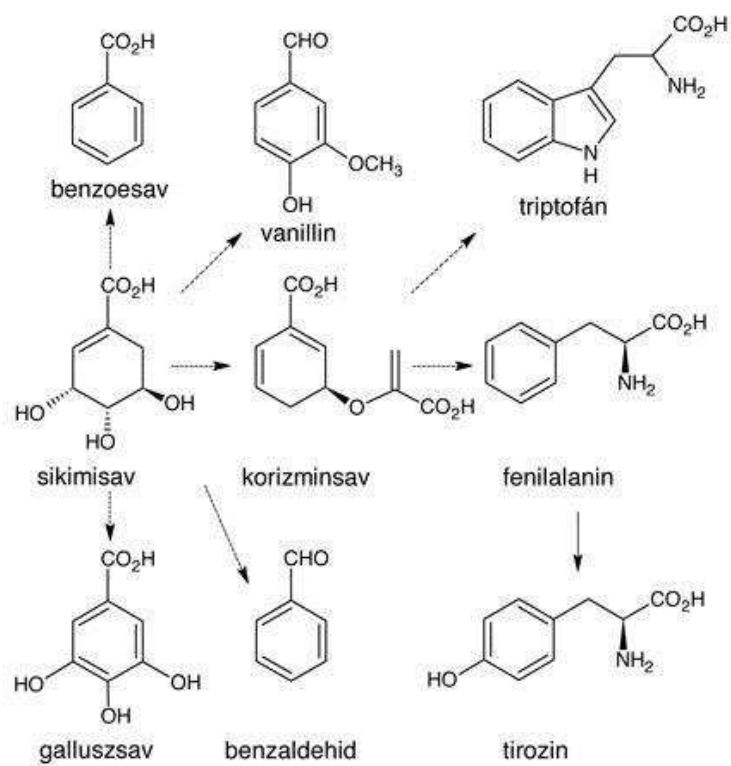
9. **Nebehaj Esztella**, Hofmann Tamás
The leaf polyphenols of forest trees: optimization of the extraction solvent, seasonal changes, and structural elucidation by HPLC-ESI-MSⁿ
In: HPLC 2015, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 1 p.
Konferencia helye, ideje: Genf, Svájc, 2015.06.21-2015.06.25. Geneva: [Hiányzó kiadó], Paper NE-HT. 1 p.
10. **Nebehaj E.**, Stefanovits-Bányai É., Hofmann T.
Antioxidáns vegyületek kinyerése bükk (*Fagus sylvatica* L.) kéregből
Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, 2014. március 21-23. (2014)
11. **Nebehaj E.**, Hofmann T.
HPLC-MS/MS investigation and extraction optimization of beech (*Fagus sylvatica* L.) bark polyphenols
ISC 2014, 30th International Symposium on Chromatography, 2014. September 14-18, Salzburg, Austria (2014)

MELLÉKLETEK

Melléklet I. A katechinek főbb típusai (URL 19.)

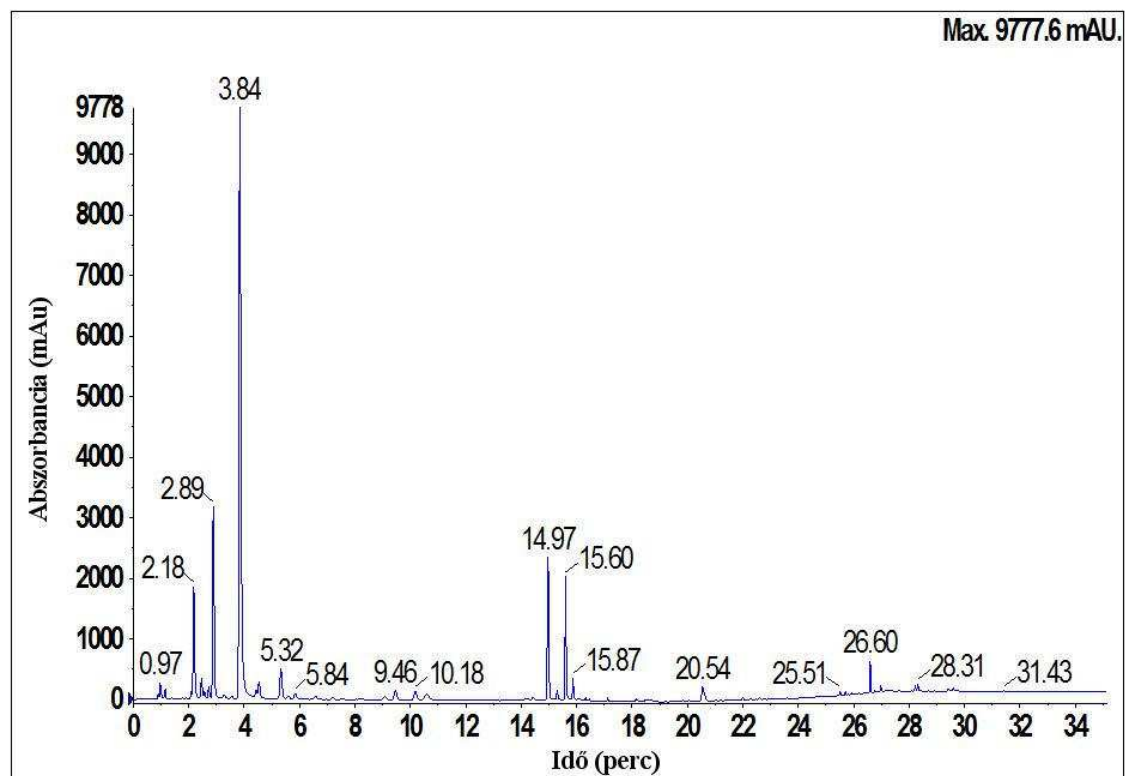
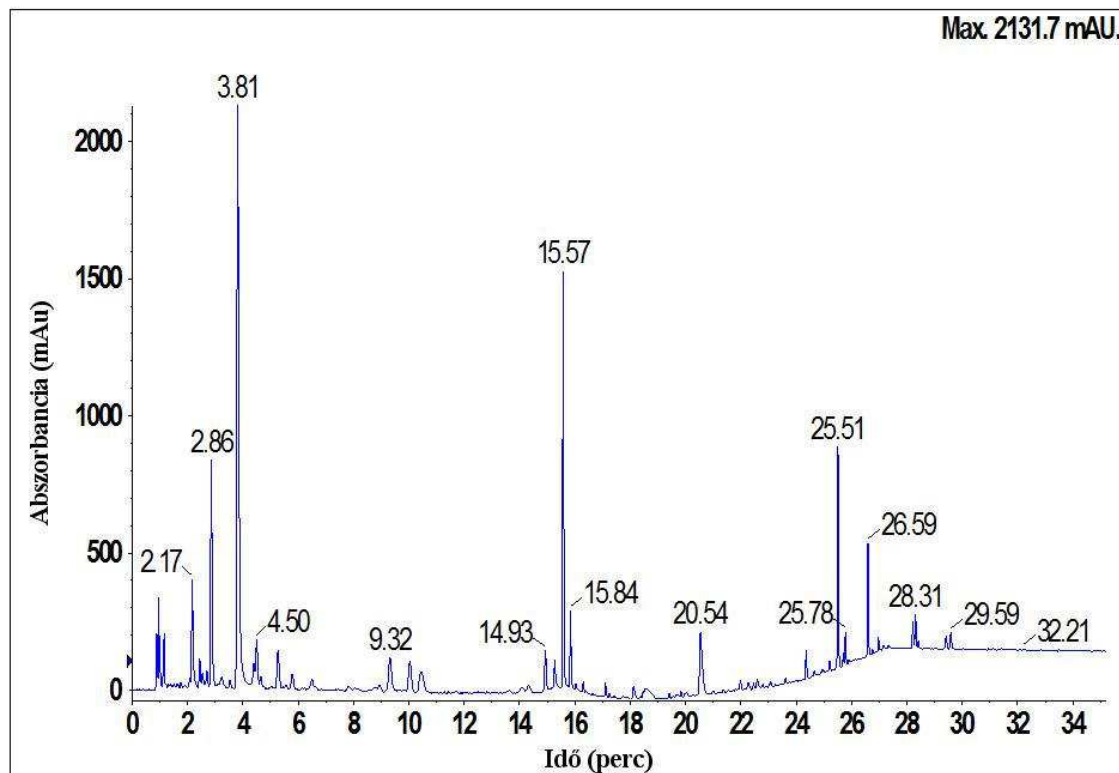


**Melléklet II. Sikimisavból levezethető aromás aminok és benzoész-származékok
(URL 20.)**



Melléklet IV.

A bükk levél polifenoljainak elválasztása során kapott HPLC-PDA (250-380 nm) kromatogram a kezeletlen, 5 napig levegőn, sötétben szárított (felső) és mikrohullámmal előkezelt (alsó) levél esetében.



Melléklet V. A csertölgylevélkivonat antioxidáns paramétereinek napon belüli változásának vizsgálatára kapott eredmények

Mintavétel ideje	Lombkorona benapozottsága	Összes polifenol (mg Q/g sz.a.)	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	FRAP (mg AS/g sz.a.)
7:00	napos	54,4 ± 1,33 ^{ab}	7,12 ± 0,24 ^a	72,5 ± 0,55 ^a
	félárnyékos	60,7 ± 3,26 ^{abc}	6,27 ± 0,31 ^a	79,3 ± 1,14 ^{bc}
	árnyékos	74,4 ± 6,94 ^c	6,54 ± 0,46 ^a	95,4 ± 1,41 ^{ef}
10:00	napos	68,3 ± 4,74 ^{bc}	7,17 ± 0,57 ^a	83,1 ± 1,36 ^c
	félárnyékos	69,2 ± 3,56 ^{bc}	7,33 ± 1,12 ^a	91,5 ± 0,83 ^{de}
	árnyékos	59,9 ± 1,34 ^{abc}	6,99 ± 0,30 ^a	79,7 ± 2,59 ^{bc}
12:00	napos	61,5 ± 5,59 ^{abc}	7,56 ± 0,59 ^a	77,4 ± 0,77 ^b
	félárnyékos	70,9 ± 6,64 ^c	6,57 ± 0,59 ^a	93,8 ± 2,61 ^{ef}
	árnyékos	53,0 ± 10,3 ^a	7,59 ± 0,34 ^a	69,9 ± 0,53 ^a
15:00	napos	68,8 ± 3,59 ^{bc}	6,71 ± 0,53 ^a	87,7 ± 2,13 ^d
	félárnyékos	60,5 ± 2,25 ^{abc}	6,55 ± 0,58 ^a	83,1 ± 2,11 ^c
	árnyékos	71,7 ± 4,03 ^c	6,62 ± 0,39 ^a	95,5 ± 1,00 ^{ef}
18:00	napos	67,1 ± 4,81 ^{abc}	6,88 ± 0,55 ^a	92,2 ± 1,07 ^c
	félárnyékos	70,5 ± 2,19 ^c	6,94 ± 0,28 ^a	97,0 ± 0,79 ^f
	árnyékos	67,1 ± 4,63 ^{abc}	6,91 ± 0,47 ^a	92,7 ± 2,45 ^{ef}

A csertölgylevelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért összes polifenoltartalom, DPPH- és FRAP antioxidáns kapacitás értékek (átlag ± szórás). A felső indexben lévő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten.

Mintavétel ideje	Lombkorona benapozottsága	ABTS (mg T/g sz.a.)	Összes flavonoid (mg Q/g sz.a.)	Összes flavan-3-ol (mg C/g sz.a.)
7:00	napos	120 ± 13,6 ^a	3,33 ± 0,21 ^{abcd}	7,10 ± 0,16 ^h
	félárnyékos	162 ± 13,9 ^{bc}	2,70 ± 0,25 ^{ab}	2,07 ± 0,02 ^c
	árnyékos	200 ± 7,77 ^{def}	3,26 ± 0,33 ^{abcd}	3,03 ± 0,06 ^d
10:00	napos	188 ± 4,72 ^{cdef}	3,83 ± 0,11 ^{cd}	5,77 ± 0,16 ^g
	félárnyékos	166 ± 4,49 ^{bcd}	3,35 ± 0,58 ^{abcd}	1,87 ± 0,03 ^{bc}
	árnyékos	169 ± 7,29 ^{bcde}	3,20 ± 0,23 ^{abcd}	2,07 ± 0,07 ^c
12:00	napos	164 ± 1,78 ^{ab}	4,12 ± 0,16 ^d	4,23 ± 0,11 ^e
	félárnyékos	199 ± 8,95 ^{cdef}	3,03 ± 0,20 ^{abc}	1,63 ± 0,09 ^b
	árnyékos	149 ± 1,1 ^{ab}	2,54 ± 0,07 ^a	1,58 ± 0,12 ^{ab}
15:00	napos	207 ± 3,12 ^f	4,05 ± 0,43 ^d	4,60 ± 0,29 ^f
	félárnyékos	198 ± 4,83 ^{cdef}	3,08 ± 0,16 ^{abc}	1,25 ± 0,04 ^a
	árnyékos	206 ± 2,62 ^{ef}	3,63 ± 0,60 ^{bcd}	1,85 ± 0,14 ^{bc}
18:00	napos	185 ± 0,00 ^{cdef}	4,05 ± 0,35 ^d	2,70 ± 0,07 ^d
	félárnyékos	260 ± 5,22 ^g	3,21 ± 0,05 ^{abcd}	1,60 ± 0,05 ^{ab}
	árnyékos	205 ± 13,3 ^{ef}	3,42 ± 0,42 ^{abcd}	2,16 ± 0,08 ^c

A csertölgylevelei napon belüli változásának vizsgálata, a levélkivonatokból mért ABTS- antioxidáns kapacitás, valamint az összes flavonoid- és összes flavan-3-ol-tartalom értékei (átlag ± szórás). A felső indexben lévő eltérő kisbetűk szignifikáns különbséget jeleznek $p < 0,05$ szinten.

Melléklet VI. A közönséges gyertyán levélkivonatából azonosított komponensek

Rövidítések: t_r: retenciós idő, [M-H]⁺: molekulaion

Csúcs	t _r (min)	Vegyület neve	[M-H] ⁺ m/z	MS/MS m/z
1	2,63	Ismeretlen-O-hexozid	355	235, 193, 179, 161, 143, 125, 113, 101
2	2,76	Ismeretlen	405	387, 191
3	2,90	Ismeretlen	209	191, 173, 159, 141, 129, 111
4	4,10	Ismeretlen	337	277, 174, 127
5	4,32	Monogalloil-glükóz	331	271, 211, 169, 151, 125
6	4,80	Ismeretlen	225	179, 115
7	5,27	Ismeretlen	517	499, 454, 411, 395, 355, 249, 223, 205, 190, 179
8	5,31	Monogalloil-glükóz	331	271, 211, 169, 151, 125
9	5,45	Kínasav-galluszsav észter izomer	343	191, 169, 125, 111, 107
10	5,79	Ismeretlen	355	337, 311, 274, 249, 205, 193, 179, 161, 133, 121,
11	6,41	Monogalloil-glükóz	331	271, 211, 169, 151, 125
12	7,9	Monogalloil-glükóz	331	271, 211, 169, 151, 125
13	8,68	Galluszsav	169	125
14	11,20	Kínasav-galluszsav észter izomer	343	211, 191, 173, 169, 137, 125, 93
15	11,30	Kínasav-hidroxi-dihidrokávésav észter	371	353, 341, 191, 179, 173, 161, 135, 111
16	12,20	Kínasav-hidroxi-dihidrokávésav észter	371	353, 341, 191, 179, 173, 161, 135, 111
17	12,60	Kínasav-galluszsav észter izomer	343	211, 191, 173, 169, 137, 125, 93
18	12,68	Kínasav-hidroxi-dihidrokávésav észter	371	353, 341, 191, 179, 173, 161, 135, 111
19	15,27	Ismeretlen galluszsav származék	345	183, 169, 125, 113
20	16,13	Ismeretlen-O-hexozid	345	331, 285, 225, 197, 183, 139, 107
21	16,69	Ismeretlen kínasav-kávésav észter származék	371	197, 191, 179, 173, 135, 111, 93
22	18,30	Gallokatechin	305	261, 219, 179, 167, 137, 125
23	18,60	(Izo)-vanillinsav	167	152, 123, 108
24	19,35	Ismeretlen kínasav-kávésav észter származék	371	197, 191, 179, 173, 135, 111, 93
25	19,70	Sikimisav-galluszsav észter izomer	325	281, 169, 155, 137, 125, 111
26	20,25	Metoxi-benzoészter-O-hexozid származék	345	183, 168, 139, 124
27	21,40	Metoxi-benzoészter-O-hexozid származék	345	183, 168, 139, 124
28	21,60	Sikimisav-galluszsav észter izomer	325	169, 155, 125, 111, 107, 93
29	25,82	Sziringsav-O-hexozid	359	197, 182, 167, 153, 138, 123, 95
30	27,25	Protokatechusav-O-pentozid	285	153, 152, 135, 109, 108
31	28,41	Monogalloil-glükóz	331	271, 211, 169, 151, 125
32	28,98	Sziringsav-O-hexozid	359	239, 203, 197, 182, 167, 153, 138
33	29,66	Sikimisav-galluszsav észter izomer	325	169, 137, 125, 111, 107
34	30,16	Metil-gallát	183	168, 139, 124
35	30,38	Sziringsav-O-hexozid	359	269, 239, 197, 182, 167, 153, 138
36	32,25	Ismeretlen-O-hexozid	389	343, 227, 212, 209
37	32,82	Ismeretlen-O-hexozid	389	343, 227, 212, 209, 179, 152, 137
38	33,08	Epigallokatechin	305	261, 219, 179, 167, 165, 137, 125
39	33,62	Procianidin B dimer	577	533, 425, 407, 289, 245, 125
40	33,76	Ismeretlen	337	277, 249, 237, 219, 205, 193, 177, 161, 149, 133
41	33,80	Klorogénsav izomer	353	191, 179, 135
42	34,60	Kávésav-O-hexozid	341	179, 135
43	34,78	Procianidin B dimer	577	533, 425, 407, 289, 245, 125
44	34,85	Ismeretlen	401	239, 221, 203, 177, 161, 149, 144, 121
45	35,00	(+)-Katechin	289	245, 221, 203, 125, 109
46	35,35	Ismeretlen	509	465, 273, 191
47	35,45	Ismeretlen	417	285, 241, 152, 108

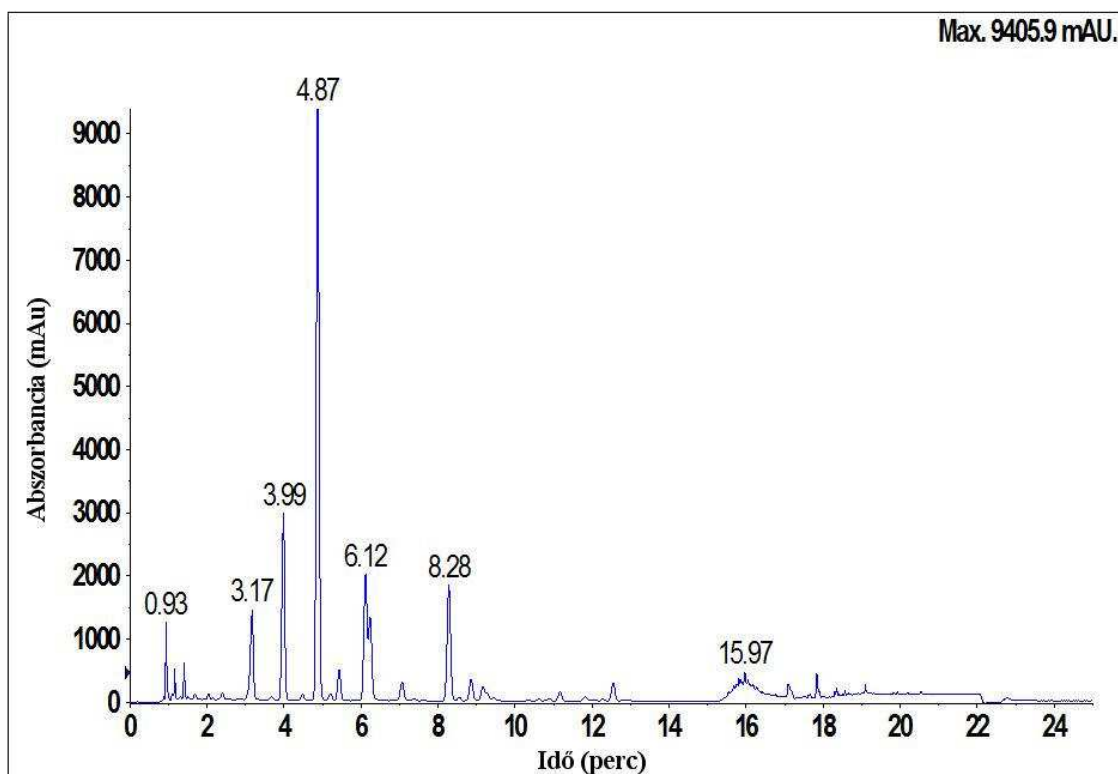
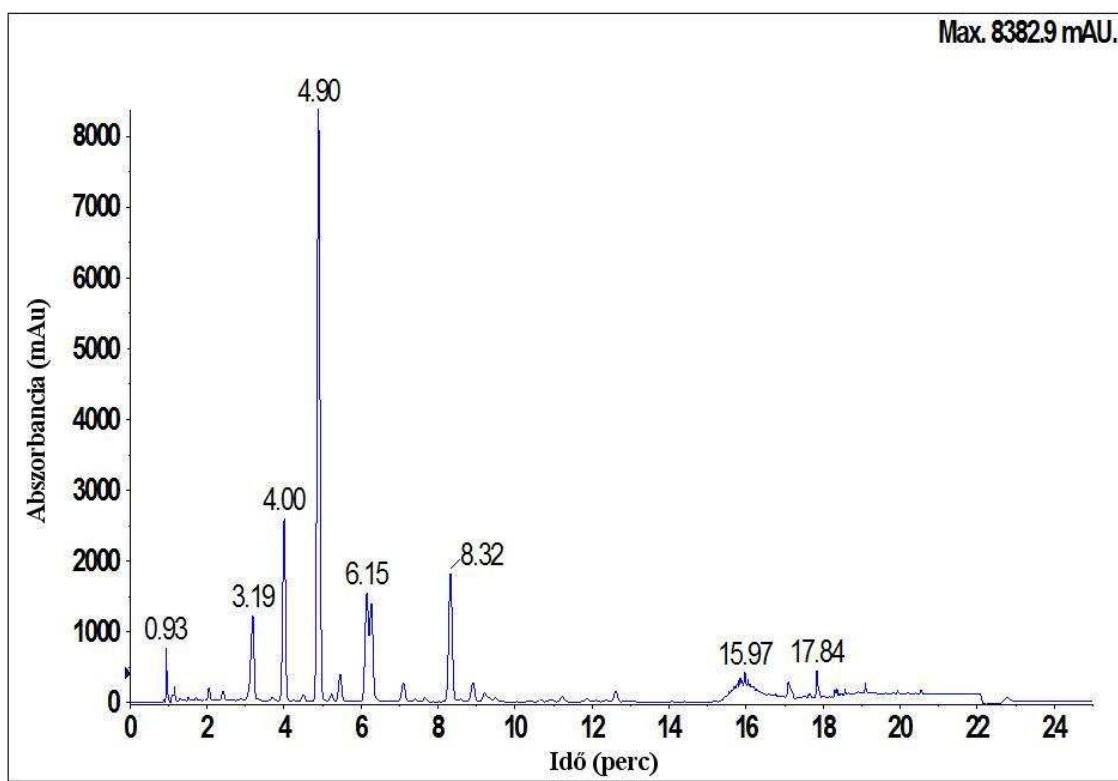
48	35,92 Digalloil-HHDP-glükóz	785	633, 615, 483, 419, 313, 301, 275, 249, 205, 169
49	36,17 Ismeretlen	417	285, 241, 152, 108
50	36,59 Ismeretlen	307	263, 219, 203, 174, 157
51	36,72 Ismeretlen	423	337, 293, 249, 205
52	36,8 Kínasav-digalluszsav észter	495	343, 337, 325, 191, 169, 125, 107
53	37,39 Klorogénsav izomer	353	191, 179, 135
54	37,53 Ismeretlen, molekulatömeg: 1084	1083	[M-2H] ²⁻ : 541
55	38,37 Ismeretlen	401	293, 269, 161, 101
56	38,40 Digalloil-glükóz	483	439, 331, 313, 287, 271, 169, 125
57	38,59 Ismeretlen	527	509, 479, 313, 169, 125
58	39,30 Szinapaldehid	207	192, 177, 163
59	39,63 Trigalloil-glükóz	635	483, 465, 313, 271, 211, 169, 125
60	39,74 Galloil-kvercetin	453	327, 313, 301, 300, 297, 285, 169, 125
61	39,93 Ismeretlen	291	247, 219, 191
62	40,06 Monogalloil-glükóz-kínasav észter	505	331, 313, 245, 177, 173, 169, 135, 125, 111
63	40,25 Ismeretlen	1127	
64	40,3 Galloil-kvercetin	453	327, 313, 301, 300, 297, 285, 169, 125
65	40,81 Ismeretlen galluszsav származék, molekulatömeg: 652	651	481, 453, 437, 409, 381, 355, 275, 231, 169, 125
66	41,4 Klorogénsav izomer	353	191, 179, 135
67	41,42 Ismeretlen-O-hexozid	437	317, 275, 274, 257, 218, 190
68	42,04 Ismeretlen-O-hexozid	431	385, 265, 223, 205, 161, 153, 138, 113, 101
69	42,56 Ismeretlen, molekulatömeg: 1084	1083	[M-2H] ²⁻ : 541
70	42,57 Ismeretlen-C-hexozid	361	343, 271, 241, 223, 199
71	42,60 Ismeretlen-O-hexozid	437	317, 275, 274, 257, 218, 190
72	42,93 (-)-Epikatechin	289	245, 221, 203, 125, 109
73	43,03 Galloil-HHDP-glükóz	633	463, 418, 331, 301, 275, 273, 241
74	43,53 Digalloil-HHDP glükóz	785	633, 615, 483, 419, 313, 301, 275, 249, 205, 169
75	43,8 Ismeretlen	431	385, 205, 179, 153
76	44,12 Ismeretlen galluszsav származék	477	325, 201, 169, 125
77	44,3 Trigalloil-glükóz	635	483, 465, 313, 271, 211, 169, 125
78	44,37 Ismeretlen galluszsav származék, molekulatömeg: 652	651	481, 453, 437, 419, 331, 313, 275, 169, 125
79	44,93 kínasav-p-kumársav észter izomer	337	191, 173, 163, 119
80	45,04 Ismeretlen	345	271, 241, 212
81	45,7 Apigenin-di-C-hexozid	593	557, 503, 473, 413, 383, 353, 325, 269
82	45,94 Ismeretlen	431	223, 205, 187, 179, 135
83	45,95 Trigalloil-glükóz	635	483, 465, 313, 271, 211, 169, 125
84	46,38 Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 1110	1109	1049, 973, 935, 765, 633, 615, 501, 463, 301, 275, 249, 205
85	46,39 Ismeretlen	337	249, 205, 190, 177, 163, 161, 133
86	46,60 Sikimisav-kávésav észter izomer	335	179, 161, 155, 135, 111, 93
87	46,60 Ismeretlen	1127	
88	47,18 Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 952	951	933, 915, 765, 615, 463, 343, 301, 273, 245
89	47,44 Kvercetin-O-hexozid	463	343, 301, 300, 272, 257, 215, 191
90	47,6 Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 936	935	[M-2H] ²⁻ : 467; 765, 301, 275, 247, 169
91	47,71 Trigalloil-glükóz	635	483, 465, 313, 271, 211, 169, 125
92	48,1 Digalloil-HHDP glükóz	785	633, 615, 483, 419, 313, 301, 275, 249, 205, 169
93	48,2 Kvercetin-O-hexozid	463	343, 301, 300, 272, 257, 215, 191
94	48,27 Ismeretlen	511	327, 183, 168, 124
95	48,40 Ismeretlen	275	257, 229, 219, 203, 201, 191
96	48,8 Ismeretlen-O-hexozid	437	275, 274, 257, 229, 218, 203, 190
97	48,88 Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 1110	1109	1049, 973, 935, 765, 633, 615, 501, 463, 301, 275, 249, 205
98	49,1 Miricetin-O-ramnozid származék	643	489, 463, 343, 317, 316, 287, 271, 179, 135
99	49,55 Sikimisav-kávésav észter izomer	335	179, 161, 155, 135
100	50,06 Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 1110	1109	1049, 973, 935, 765, 633, 615, 501, 463, 301, 275, 249, 205

101	50,34	Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 954	953	935, 765, 615, 463, 419, 301, 275, 247
102	50,52	Ismeretlen- <i>O</i> -hexozid	579	459, 417, 181, 166
103	50,78	Miricetin- <i>O</i> -hexozid	479	317, 316, 287, 271, 179, 151
104	50,8	Kumársav- <i>O</i> -galloil-glükóz	477	433, 331, 313, 295, 211, 169, 163, 125
105	50,86	Ismeretlen	343	284, 269, 239, 211
106	51,01	Kvercetin- <i>O</i> -hexozid	463	343, 301, 300, 272, 257, 215, 191
107	51,14	Kumársav- <i>O</i> -galloil-glükóz	477	433, 313, 241, 211, 169, 163, 125, 119
108	51,16	Miricetin- <i>O</i> -hexozid	479	317, 316, 287, 271, 179, 151
109	51,30	Ismeretlen- <i>C</i> -hexozid	359	341, 329, 323, 299, 269, 257, 239, 211, 197, 113
110	51,5	Miricetin- <i>O</i> -ramnóz származék	643	495, 489, 463, 452, 343, 317, 316, 287, 271, 135
111	51,50	Ismeretlen	1127	
112	51,96	Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 954	953	[M-2H] ²⁻ : 476; 935, 765, 633, 615, 463, 419, 301, 275, 247
113	51,96	Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 1106	1105	[M-CO ₂ -2H] ²⁻ : 530; 891, 767, 425, 392, 313, 301, 273, 169, 125
114	52,11	Trigalloil-HHDP-glükóz	937	[M-2H] ²⁻ : 468; 785, 767, 635, 465, 313, 301, 169
115	52,21	Kvercetin- <i>O</i> -pentozid	433	301, 300, 272, 257, 216
116	52,22	Ismeretlen ellagitannin, molekulatömeg: 1106	1105	[M-CO ₂ -2H] ²⁻ : 530; 891, 767, 425, 392, 313, 301, 273, 169, 125
117	52,28	Ismeretlen	985	
118	52,35	Tetragalloil-glükóz	787	635, 617, 465, 447, 313, 215, 169
119	53,00	Tetragalloil-glükóz	787	635, 617, 465, 447, 313, 215, 169
120	53,07	Izoramnetin- <i>O</i> -hexozid	477	315, 314, 300, 299, 271
121	53,13	Ismeretlen	413	369, 351, 311, 269, 161, 125, 99
122	53,5	Miricetin- <i>O</i> -pentozid	449	317, 316, 287, 271, 269, 259, 243, 209, 179
123	53,63	Tetragalloil-glükóz	787	635, 617, 465, 447, 313, 215, 169
124	53,78	Miricetin- <i>O</i> -ramnózid	463	359, 317, 316, 287, 271, 259, 242, 191, 179
125	53,90	Ellagsav	301	284, 257, 229, 185
126	54,10	Kvercetin- <i>O</i> -hexozid	463	343, 301, 300, 272, 257, 215, 191
127	54,22	Trigalloil-HHDP-glükóz	937	[M-2H] ²⁻ : 468; 785, 767, 635, 465, 313, 301, 169
128	54,50	Luteolin- <i>O</i> -hexozid	447	327, 285, 284, 217, 199, 175, 151, 133
129	54,76	Ismeretlen	509	473, 461, 367, 327, 313, 179, 163, 149, 119, 107
130	54,89	Ismeretlen	415	369, 179
131	55,00	Miricetin- <i>O</i> -hexozid-származék	657	547, 515, 479, 401, 369, 317, 316, 220, 179, 151
132	55,04	Izoramnetin- <i>O</i> -hexozid	477	315, 314, 300, 299, 271
133	55,38	Ismeretlen	331	287, 243, 177, 165, 133, 121, 109
134	55,49	Pentagalloil-glükóz	939	[M-2H] ²⁻ : 469; 769, 629, 617, 465, 313, 169, 125
135	55,64	Kvercetin- <i>O</i> -hexozid	463	343, 301, 300, 272, 257, 215, 191
136	55,67	Miricetin- <i>O</i> -hexozid-származék	657	547, 515, 479, 401, 369, 317, 316, 271, 179, 151
137	55,81	Digalloil-glükóz	483	439, 331, 313, 287, 271, 169, 125
138	56,04	Ismeretlen	579	459, 417, 402, 387, 181, 166
139	56,28	Digalloil-bisz-HHDP-glükóz	1087	[M-2H] ²⁻ : 543; 451, 425, 399, 313, 301, 169, 125
140	56,49	Pentagalloil-glükóz	939	[M-2H] ²⁻ : 469; 769, 629, 617, 465, 313, 169, 125
141	56,62	Kvercetin- <i>O</i> -pentozid	433	301, 300, 272, 257, 243, 229, 179, 151
142	56,65	Izoramnetin- <i>O</i> -pentozid	447	315, 314, 300, 299, 285, 271, 243
143	57,22	Kvercetin- <i>O</i> -ramnózid	447	343, 301, 300, 272, 255, 243, 179, 151
144	57,30	Apigenin- <i>O</i> -hexozid	431	431, 341, 311, 269, 268, 225, 201, 151, 149
145	57,5	Ismeretlen	477	315, 314, 297, 271
146	57,60	Ismeretlen	429	249, 205, 187, 161
147	57,8	Pentagalloil-glükóz	939	[M-2H] ²⁻ : 469; 769, 629, 617, 465, 313, 169, 125
148	57,88	Ismeretlen	1173	
149	58,06	Ismeretlen galluszsav származék	461	446, 313, 298, 283, 269, 255, 169, 125
150	58,43	Ismeretlen galluszsav származék	461	446, 328, 313, 298, 285, 270, 255, 169, 125
151	58,45	Ismeretlen	539	503, 397, 343, 328, 179, 164, 146, 134
152	58,9	Ismeretlen	463	301, 245
153	59,03	Ismeretlen galluszsav származék, molekulatömeg: 970	969	[M-2H] ²⁻ : 484; 799, 645, 408, 325, 169, 125
154	59,07	Eukaglobulin	497	482, 411, 327, 285, 183, 169, 125
155	59,94	Kempferol- <i>O</i> -ramnózid	431	327, 285, 284, 255, 229, 227, 211, 187

156	61,57 Ismeretlen	389	251, 227, 207, 183, 165
157	63,99 Ismeretlen	327	283, 254, 211, 196
158	64,07 Ismeretlen	585	509, 371, 359, 195, 165
159	66,42 Ismeretlen	853	785, 723, 365, 343, 217, 197
160	68,21 Ismeretlen	617	197, 182, 151, 137, 125
161	71,3 Ismeretlen	221	177, 149, 147, 135, 121
162	71,7 Kempferol-di- <i>O</i> -ramnozyd	577	431, 413, 285, 284, 255, 227, 145, 119
163	72,06 Ismeretlen	369	277, 241, 211
164	72,32 Kempferol-di- <i>O</i> -ramnozyd	577	431, 413, 285, 284, 255, 227, 145, 119
165	79,72 Ismeretlen	287	269, 241, 223, 155, 115
166	80,67 Ismeretlen	287	269, 241, 223, 155, 115
167	80,70 Ismeretlen	243	243, 175
168	86,90 Ismeretlen	345	277, 197, 134, 127
169	88,70 Ismeretlen	539	471
170	88,93 Ismeretlen	243	197
171	91,98 Ismeretlen	455	409, 391

Melléklet VII.

A bükk kéreg polifenoljainak elválasztása során kapott HPLC-PDA (250-380 nm) kromatogram a kezeletlen, 2 napig levegőn, sötétben szárított (felső) és mikrohullámmal előkezelt (alsó) kéreg esetében.



Melléklet VIII.

A bükk kéreg komponenseinek relatív mennyiségi meghatározásához felhasznált MRM átmenetek és a tömegspektrométer beállításai. **Rövidítések:** **DP:** declustering potential (klasztermentesítő feszültség), **EP:** entrance potential (belépési potenciál), **CEP:** collision cell entrance potential (ütközési cella belépő potenciálja), **CE:** collision energy (ütközési energia), **CXP:** collision cell exit potential (ütközési cella kilépő potenciálja). 1. periódus: 0-7.5 perc; 2. periódus: 7.5-12.5 perc; 3. periódus: 12.5-36 perc.

	Komponens	Kiválasztott átmenetek		Idő (msec)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
		Q1	Q3						
1. PERIÓDUS	Koniferin izomer 1	387	179	80	-40	-4,5	-26	-22	0
	Procianidin B dimer	577	125	80	-40	-6,5	-33	-54	-2
	(+)-katechin	289	109	80	-40	-4,5	-22	-38	0
	Procianidin C trimer	865	125	80	-40	-4,5	-44	-84	0
	Sziringin	417	209	80	-40	-5	-27	-16	-2
	Ismeretlen (+)-katechin-származék	631	289	80	-40	-3	-35	-26	-4
	Koniferin izomer 2	341	179	80	-40	-9	-24	-40	0
2. PERIÓDUS	Procianidin B dimer	577	125	80	-40	-6,5	-33	-54	-2
	Procianidin C trimer	865	125	80	-40	-4,5	-44	-84	0
	Ismeretlen (+)-katechin-származék	631	289	80	-40	-3	-35	-26	-4
	Kumarinsav-di-O-hexozid	487	59	80	-40	-4,5	-30	-68	0
	Taxifolin-O-hexozid	465	151	80	-40	-4	-29	-32	0
	Taxifolin-O-pentozid	435	151	80	-40	-3,5	-28	-30	0
3. PERIÓDUS	Taxifolin-O-pentozid	435	151	80	-40	-3,5	-28	-30	0
	Sziringsav-di-O-hexozid	521	341	80	-40	-5	-31	-24	-4
	Ismeretlen	441	59	80	-40	-4,5	-28	-62	0
	Koniferil-alkohol-O-hexozid-O-pentozid	491	107	80	-40	-9,5	-30	-80	0
	Ismeretlen	553	59	80	-40	-9	-40	-84	0
	Ismeretlen	551	59	80	-40	-9	-46	-78	0
	Kvercetin-O-hexozid	463	300	80	-40	-10	-29	-50	-2,2

Melléklet IX.

A kiválasztott bükk kéreg extraktumokban lévő komponensek relatív mennyiségi meghatározása az MRM csúcs alatti területek segítségével. A táblázatban az értékek a csúcs alatti terület/10³ értékekként vannak feltüntetve a jobb átláthatóság érdekében. Minden kivonatból 3 párhuzamos mérés lett végrehajtva. Rövidítések: LOQ: mennyiségi meghatározás alsó határa, *: a csúcs alatti terület kisebb, mint az LOQ, U: ultrahangos extrakció (10, 20, 30 perc). S: kevertetés (2, 5, 24h). M: mikrohullámmal segített extrakció (100; 120°C, 10; 20 perc). M: metanol:víz 80:20 v/v%, E: etanol: víz 80:20 v/v %, W: víz, c.a.:koniferil-alkohol, s.a.:sziringsav, *: [M-H+HCOOH]⁺: adduktként került meghatározásra. ui.: ismeretlen.

Csúcs	Vegyület neve	LOQ	U10W	U10M	U10E	U20W	U20M	U20E	U30W	U30M	U30E	S2W	S2M	S2E	S5W	S5M	S5E	S24W	S24M	S24E	M120 W10	M120 W20	M120 E10	M120 E20	M80 M20	M100 M20	M120 M10	M120 M20
4	(+)-katechin	0,5	113,7	220,0	234,0	109,0	208,3	239,7	100,5	191,7	215,0	121,0	233,3	214,0	89,1	212,0	308,7	72,3	253,3	235,3	225,7	206,7	255,3	260,3	256,7	262,0	239,3	265,7
12	(-)-epikatechin	0,3	23,2	69,0	78,3	44,0	56,0	62,0	37,8	8,2	74,3	4,3	8,8	8,4	3,8	6,8	14,6	3,7	12,1	13,9	104,2	96,9	52,0	57,3	12,9	23,1	53,5	58,4
	Σ katechinek	0	137,0	289,0	312,3	153,0	264,3	301,7	138,3	199,9	289,3	125,3	242,2	222,4	92,9	218,8	323,3	76,0	265,4	249,2	329,9	303,5	307,4	317,7	269,6	285,1	292,8	324,0
2	procianidin B dimer 1	2,5	29,5	79,4	94,8	37,2	71,6	88,0	35,8	46,4	70,9	17,7	60,4	63,5	7,8	49,1	85,8	7,1	67,5	67,3	27,1	12,0	30,8	25,5	64,5	48,7	27,4	33,5
3	procianidin B dimer 2	2,5	*	18,1	18,3	*	16,8	21,7	2,6	15,2	15,0	*	23,0	23,2	*	17,2	35,4	*	23,1	24,9	18,7	20,0	34,1	28,1	23,8	29,3	32,4	36,0
9	procianidin B dimer 3	2,5	6,4	35,1	40,4	18,0	25,7	26,8	16,5	*	24,8	*	*	2,7	*	5,9	*	3,6	4,3	*	*	2,7	*	3,1	2,9	*	2,6	
13	procianidin B dimer 4	2,5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
14	procianidin B dimer 5	2,5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,7	*	*	2,7	*	*	5,1	4,9	*	*	3,1	3,4
23	procianidin B dimer 6	2,5	*	10,7	13,0	*	8,8	14,2	*	6,8	8,6	*	9,9	11,3	*	6,4	15,2	*	11,5	12,6	*	*	10,1	8,3	8,6	8,4	7,2	7,4
1	procianidin C trimer 1	2,5	*	7,6	5,8	3,5	7,0	6,3	3,5	4,4	4,4	*	6,9	5,3	*	5,4	7,4	*	7,2	6,0	4,1	*	*	*	7,0	5,2	*	*
6	procianidin C trimer 2	2,5	4,2	19,8	23,5	7,2	16,8	21,7	8,8	10,6	16,7	*	13,7	13,7	*	9,6	22,1	*	15,1	16,6	*	*	3,9	2,6	14,2	10,2	3,9	3,2
7	procianidin C trimer 3	2,5	*	6,2	8,4	*	5,1	7,7	*	3,8	4,9	*	4,4	6,9	*	3,4	9,6	*	4,1	6,4	*	*	*	*	4,4	2,3	*	*
10	procianidin C trimer 4	2,5	*	2,6	4,3	*	*	2,9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
18	procianidin C trimer 5	2,5	*	5,6	6,5	*	4,2	7,3	*	2,6	4,8	*	5,1	6,1	*	2,9	8,5	*	5,7	7,3	*	*	*	*	4,5	4,1	*	*
21	procianidin C trimer 6	2,5	2,5	16,9	20,5	6,4	11,2	14,9	6,5	*	14,8	*	*	*	*	*	4,8	*	2,9	3,9	*	*	*	*	*	*	*	*
	Σ procianidinek		42,6	202,0	235,5	72,4	167,2	211,5	73,8	89,8	164,9	17,7	123,3	132,8	7,8	94,1	198,4	7,1	140,7	151,9	50,0	32,1	86,8	69,4	130,0	111,1	73,9	86,2
24	taxifolin- <i>O</i> -pentoizid 1	2,0	434,3	420,3	358,0	316,3	432,0	516,3	307,0	681,0	434,7	601,5	632,0	706,7	576,7	691,7	903,7	520,3	683,0	713,3	836,3	731,3	696,7	745,3	845,7	791,7	698,0	774,3
25	taxifolin- <i>O</i> -pentoizid 2	2,0	226,0	222,3	201,3	162,7	218,7	274,0	169,3	352,7	239,7	310,5	365,7	371,3	284,3	372,7	382,7	269,3	382,7	397,7	816,3	700,3	573,3	636,0	518,0	583,3	591,3	770,0
28	taxifolin- <i>O</i> -pentoizid 3	2,0	102,0	94,2	77,7	73,2	99,5	117,9	75,5	172,3	98,6	142,0	156,0	166,0	130,7	159,7	202,0	123,0	165,7	176,3	224,0	187,3	224,0	207,0	224,0	220,0	194,0	222,0
31	taxifolin- <i>O</i> -pentoizid 4	2,0	91,9	96,6	84,1	66,2	96,7	110,7	66,6	145,7	94,7	127,5	161,0	164,3	118,0	155,3	176,0	107,0	173,7	178,7	346,0	305,3	256,0	263,3	216,7	237,3	276,0	326,0
19	taxifolin- <i>O</i> -hexozid 1	2,0	7,8	6,5	5,0	4,5	6,5	7,6	4,7	11,4	6,4	9,8	11,3	12,4	9,6	11,3	15,9	9,0	11,1	11,4	15,8	13,5	12,3	12,9	14,7	13,2	12,1	13,5
22	taxifolin- <i>O</i> -hexozid 2	2,0	5,2	4,5	3,9	3,2	4,4	5,5	3,4	7,3	4,4	7,0	8,5	8,7	6,7	8,0	8,3	5,9	8,3	9,0	16,6	14,7	12,3	13,5	10,7	12,0	13,5	14,9
26	taxifolin- <i>O</i> -hexozid 3	2,0	2,6	2,2	*	*	2,1	2,3	*	4,8	2,6	4,3	5,0	5,1	3,1	4,8	4,0	2,5	3,0	3,2	8,0	6,9	6,6	6,9	6,4	6,9	7,0	8,2
	Σ taxifolin glikozidok		869,8	846,6	730,1	626,0	859,9	1034,4	626,5	1375,2	881,0	1202,7	1339,5	1434,5	1129,1	1403,4	1692,5	1037,1	1427,4	1489,5	2263,1	1959,5	1781,2	1884,9	1836,2	1864,4	1791,9	2129,0
27	ui. 1	3,5	22,3	21,3	22,0	22,9	15,5	18,4	19,6	19,5	21,1	19,8	17,3	19,2	20,1	17,6	22,6	22,6	23,5	24,2	40,1	39,7	27,1	26,5	26,6	26,8	27,3	29,9
32	quercetin- <i>O</i> -hexozid	2,1	2,9	3,5	3,0	*	3,5	3,8	*	3,7	3,3	5,0	7,2	7,1	2,7	5,5	4,2	*	6,7	5,7	6,4	5,8	5,6	5,6	5,2	6,9	5,8	
36	c,a- <i>O</i> -hexozid- <i>O</i> -pentoizid	2,5	25,2	27,1	26,7	23,3	28,1	33,3	26,3	43,8	32,6	30,9	43,8	33,3	44,6	42,3	29,9	37,4	53,8	52,3	52,6	50,9	42,5	39,4	38,5	38,9	39,3	45,3
34	s,a-di- <i>O</i> -hexozid 1	0,7	14,6	14,3	12,5	11,8	13,4	16,4	12,3	24,3	17,0	19,7	26,8	21,1	25,7	23,2	14,2	24,6	28,5	29,9	27,0	27,8	22,6	19,7	21,3	19,5	20,4	22,4
37	s,a-di- <i>O</i> -hexozid 2	0,7	1,2	1,0	*	*	1,1	1,2	0,8	2,3	1,1	3,3	3,4	3,8	2,1	3,2	2,2	2,1	3,3	3,1	4,0	3,9	3,3	3,0	3,4	3,0	3,2	3,6
29	ui. 2	1,7	53,4	44,3	31,3	31,6	42,4	53,2	37,5	101,5	43,8	100,1	108,0	100,5	85,8	109,7	111,0	73,5	78,3	85,8	157,0	159,3	114,9	108,7	111,8	109,0	108,3	127,7
30	ui. 3	1,7	24,3	21,8	15,9	17,8	19,9	23,6	20,4	46,1	23,3	40,8	49,5	42,0	41,0	50,6	50,9	36,4	39,3	40,8	67,7	68,6	47,8	45,9	46,9	44,2	44,4	53,8
33	ui. 4	1,0	25,0	19,2	11,4	10,8	24,3	26,7	14,0	54,0	18,2	55,0	61,2	58,7	42,2	62,8	56,1	32,6	41,0	42,6	88,4	87,2	65,4	64,1	63,5	62,0	63,4	74,9
35	ui. 5	1,0	1,6	1,7	1,5	1,8	1,9	2,1	2,2	2,9	2,1	1,6	2,0	1,6	2,3	2,3	3,5	1,3	1,4	1,6	4,3	3,5	2,4	3,0	2,8	2,7	2,3	3,1
15	ui. katechin származék 1	2,2	*	10,3	11,1	*	7,7	8,7	*	5,1	9,4	*	6,3	8,0	*	7,3	11,8	*	9,0	9,3	4,3	5,1	2,2	*	8,1	7,3	*	*
16	ui. katechin származék 2	2,2	2,4	5,2	6,0	4,4	4,7	3,9	2,7	*	5,5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	2,6	2,2	4,0	3,4	*	*	*	3,0
20	ui. katechin származék 3	2,2	2,3	4,5	5,1	4,2	3,1	2,7	3,0	*	4,7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	6,1	7,2	*	*	*	*	*	*
8	sziringin *	1,4	60,9	52,0	48,4	52,2	52,1	61,0	51,2	60,9	53,4	78,3	80,7	72,5	67,7	67,0	65,3	69,0	71,7	72,4	106,0	106,7	74,0	76,3	71,9	72,4	71,5	78,7
17	kumarinsav- <i>O</i> -dihexozid	1,6	252,0	218,3	174,3	166,3	162,3	184,4	134,7	208,4	152,7	417,0	389,7	457,0	348,3	247,5	614,0	428,7	469,0	513,0	795,3	748,3	533,0	524,0	555,0	562,0	529,3	594,0
5	koniferin izomer 1 *	2,6	106,1	70,0	56,0	57,6	86,1	98,2	66,7	124,0	72,0	229,0	170,7	215,3	145,7	159,0	162,3	200,0	199,0	186,0	281,0	263,7	213,7	205,3	198,7	196,0	201,3	202,7
11	koniferin izomer 2 *	2,6	158,0	173,0	186,0	171,3	160,3	198,3	172,3	128,7	199,3	51,5	94,1	71,8	106,5	85,6	214,3	96,5	102,3	106,0	173,3	167,7	123,0	138,7	126,0	115,2	122,6	122,8
	Σ egyéb vegyületek		752,3	687,6	611,3	576,0	626,5	735,8	563,8	825,2	659,4	1051,9	1060,6	1111,9	934,5	883,5	1362,3	1024,6	1126,9	1172,8	1816,0	1747,4	1281,5	1263,5	1280,0	1264,1	1240,2	1367,6
	Σ összesen		1801,6	2025,2	1889,2	1427,4	1917,9	2283,3	1402,5	2490,0	1994,7	2397,6	2765,6	2901,6	2164,4	2599,8	3576,5	2144,9	2960,4	3063,5	4459,0	4042,5	3456,8	3535,6	3515,8	3524,7	3398,8	3906,9