



A fehér akác (*Robinia pseudoacacia*) bioaktív komponensei

-

Bioactive components of black locust (*Robinia pseudoacacia*)

Olajos Judit

Biológia BSc III. évfolyam

Állatorvostudományi Egyetem

Biológia Intézet - Ökológia Tanszék

Témavezető: Dr. Móricz M. Ágnes

Tudományos főmunkatárs

MTA ATK NÖVI, Növényi Kórélettani Osztály

Belső konzulens: Dr. Szabó Péter

Egyetemi docens

Állatorvostudományi Egyetem, Biológia Intézet, Ökológia Tanszék

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. Rövidítések jegyzéke.....	2
2. Bevezetés.....	3
3. Irodalmi áttekintés.....	4
4. Célkitűzések	6
5. Anyag és Módszer.....	7
5.1. Mintagyűjtés, előkészítés és tárolás.....	7
5.2. Vékonyréteg kromatográfia (TLC).....	8
5.3. Direkt bioautográfia (DB).....	9
5.4. Antioxidáns aktivitás vizsgálatok (rétegen és mikrolemezen).....	11
5.5. Statisztika és video denzitometria.....	12
5.6. Karakterizálás (reagens vizsgálatok)	13
5.7. Izolálás	14
5.8. Nagyműszeres vizsgálatok.....	15
6. Eredmények.....	16
6.1. Vékonyréteg kromatográfia (TLC) eredményei	16
6.2. Direkt bioautográfia eredményei	17
6.3. Antioxidáns aktivitás vizsgálatok eredményei (rétegen és mikrolemez).....	22
6.4. Statisztika és video denzitometria.....	27
6.5. Reagensvizsgálatok eredményei	31
6.6. Izolálás eredményei	32
6.7. Nagyműszeres vizsgálatok eredményei	34
7. Következtetések	37
8. Összefoglaló	39
9. Summary	40
10. Irodalomjegyzék	41
11. Köszönetnyilvánítás	43
12. Függelék	44

1. Rövidítések jegyzéke

A% - Antioxidáns aktivitás

ACN - Acetonitril

DB - Direkt bioautográfia

DPPH - *2,2-difenil-1-pikril-hidrazil*, stabil szabadgyök vegyület

EtAc - Etil-acetát

ESI (Electrospray ionization) - Elektroporlasztásos ionizáció

EtOH - Etanol

GAE - Galluszsav ekvivalencia

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) - Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia

MeOH - Metanol

MS (Mass Spectrometry) - Tömegspektrometria

MTT - *3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid*, vitális festék

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroszkópia - Mágneses magrezonancia spektroszkópia, mely szerkezet meghatározására alkalmas

NP-PEG - Natural Product só (*difenilboriloxietilamin*) és poli-etilén-glikol reagens

OD (Optical density) - Optikai sűrűség

R_F - Retenciós faktor (az anyag elmozdulása a starttól)

TLC (Thin-Layer Chromatography) - Vékonyréteg kromatográfia

VIS - Látható fény tartománya, 400-700 nm hullámhosszig

2. Bevezetés

A fehér akác (*Robinia pseudoacacia*) Észak-Amerikában őshonos, rendkívül mutatós fa, mely kiválóan alkalmazkodik a gyengébb minőségű életterekhez. Vegetatívan jól szaporodik, magjai csírázókéességüket a talajban évtizedekig megőrzik. Szimbiózisban él *Rhizobium* baktériumokkal, ami ugyancsak hozzájárul ahhoz, hogy az akác világszerte hatalmas állományokkal rendelkezzen. A kezdetben díszfaként, majd kitermelés céljából ültetett növény mára globálisan invazív vá vált, melyhez allelopatikus (növekedésgátló) másodlagos anyagcseretermékei is hozzájárulnak. Mivel állománycsökkentése szükséges, különféle felhasználása, mely kiterjed a növény minden részére, gazdasági szempontból kiemelten fontos lehet.

Manapság egyre sürgetőbbé válik újfajta hatóanyagok és antibiotikum-készítmények piacra kerülése a növekvő antibiotikum rezisztencia és multirezisztencia miatt, így ez az invazív özönnövény a benne előforduló értékes anyagok miatt jelentős alapanyagforrást biztosíthatnak a gyógyszergyártáshoz.

Az antibiotikumok kérdésköre mellett fontos megemlíteni a kor népbetegségének tekinthető neurodegeneratív megbetegedéseket, melyek az idősödő emberek életminőségét jelentősen rontják. A tünetek kialakulása után a beteg állapotának visszafordítására nincs lehetőség, de szinten tartható, illetve megelőzhető. Ezt a szervezetbe juttatott antioxidánsokkal lehet elérni, melyek elsősorban az oxidatív stressz következtében keletkező O[•] szabadgyökök lekötéséért felelősek.

A fehér akácból már számos bioaktív anyag leírásra került, többségük mérgező volta miatt adott okot az azonosításra. Az akác virágának és mézének vizsgálata azonban igazolta, hogy érdemes átfogóan vizsgálni a növényt, hiszen jótékony hatású flavonoidok és izoflavonoidok is találhatóak bennük.

3. Irodalmi áttekintés

A fehér akác (*Robinia pseudoacacia*) a pillangósvirágúak (*Fabaceae*) családjába tartozó Észak-Amerikában és Mexikóban őshonos fafaj, melyet Magyarországon a XVIII. század elején kezdtek ültetni erdősítés céljából elsősorban az alföldi szikeseken, valamint a homokos területeken a futóhomok megkötésére. A száraz, homokos talajon élőhelyet biztosít a homoki szarvasgombának (*Mattiolomyces terfezioides*) is, mely csak Közép-Európa akácosaiban él (BABOS, 1981). Az első tömeges telepítés a XIX. század közepén kezdődött, majd az 1923-as alföldfásítási törvény hatására a második világháborúig több tízezer hektár akácot ültettek. Sokáig az erdősítések többségét e fajjal oldották meg, így 2012-re erdeink egynegyedét akácok alkották (KSH, 2010; 2012).

Ez a rendkívül mutatós parkfa a 20-30 méteres magasságot is elérheti, törzse barna, mélyen barázdált. Levelei páratlanul szárnyasan összetett, 7-19 levélkéjűek, elliptikusak, tompa, esetleg kicsípett csúcsúak. Az ágak pálhatüskéket viselnek, melyek alja ellaposodó, a vessző kopasz vagy elkopaszodó. Jellegzetes illatú, fehér pártájú virágai lecsüngő fürtökben nőnek az ötödik évtől. Május közepén rövid ideig virágzik, októberben érik be 6-11 centiméter hosszú kopasz hüvelytermése (KIRÁLY, 2009). Vese alakú magjai a talajban évtizedekig megőrzik csírázókéességüket. Vegetatívan is sikeresen szaporodik tő- és gyökérsarjakkal (CSISZÁR, 2012), így nagy területeket képes meghódítani. Azonosítottak több allelopatikus (növekedésgátló) hatású anyagot is a növény leveleiből, mint a robinetin, miricetin és kvercetin flavonoidok, melyek szintén szerepet játszhatnak invazivitásában (NASIR ÉS MTSAI, 2005).

A növény gazdasági jelentőségéhez hozzájárul, hogy kitűnő mézelő fa. Világos, cukrosodásra alig hajlamos méze különleges exportcikknek számít Európában és a hazai méztermelés nagy hányadát is akácok biztosítják. Faanyagát az építő-, illetve a bútoripar hasznosítja, s emellett jó minőségű tűzifa (KSH, 2013).

Gazdasági jelentősége mellett a fehér akác eddigi vizsgálatai során számos baktericid és fungicid anyagcsereterméket találtak, például a magban kis molekulásúlyú peptideket, melyek akár humán- és állategészségügyi vonatkozásban is jelentősek lehetnek (TALAS-OGRAS ÉS MTSAI, 2005).

A fehér akácból leírt flavonoidok, mint az akacetin (PERKIN, 1900), a szekundiflorol és az izomukronulatol, a flavonoidokra jellemző általános peszticid és antioxidáns tulajdonságok mellett (JOYEUX ÉS MTSAI 1995) citotoxicitást is mutattak humán rákos sejtvonalak esetében (TIAN ÉS McLAUGHLIN, 2000).

Az öregedő társadalmak komoly problémája a neurodegeneratív betegségek, mint az Alzheimer-kór, Parkinson-kór és a demencia. Ezeknek feltételezett kiváltó oka, egy sajátos szabadgyök reakciósor, melynek idegkárosító hatása van. Ezt a folyamatot antioxidáns hatású anyagokkal lehet semlegesíteni (EVANS, 1993; BOWLING ÉS BEAL, 1995), így az akácból leírt flavonoidok ezen kóros állapotokkal szemben is segítséget nyújthatnak. Számos kutatás során vizsgálták az akác virágát és mézének összetételét, nagy hangsúlyt fektetve a mézben található jótékony vegyületekre (KENJERIC ÉS MTSAI, 2007; TRUCHADO ÉS MTSAI, 2008). A növényből számos glikozidot mutattak ki, köztük a toxikus robinin vegyületet is (HATTORI, 1925; FREUDENBERG ÉS HARTMANN, 1954), illetve a hemagglutináló hatású lektineket, mely lovakban súlyos mérgezést okozhat (DUVERGER ÉS DELMOTTE, 1996; CAVADA ÉS MTSAI, 1998). Leveleiből apigenint, diozmetint, luteolint és kvercetin is leírtak (VEITCH ÉS MTSAI, 2000). A korábbi kutatásokban többek közt LC-MS(/MS) és NMR technikákat alkalmaztak a vegyületek meghatározására (TIAN ÉS MCLAUGHLIN, 2000; VEITCH ÉS MTSAI, 2000; NASIR ÉS MTSAI, 2005).

4. Célkitűzések

A fehér akác Európa-szerte elterjedt fafaj, melyben korábbi kutatások igazolták a bioaktív anyagok jelenlétét, így e nagy tömegben rendelkezésre álló növény könnyen hozzáférhető gyógyszeripari alapanyag lehet. Ennek tudatában kezdtük vizsgálni a különböző részek (kéreg, levél, virág, termés) kivonatait vékonyréteg kromatográfiához kapcsolt biológiai tesztekkel.

Célunk kidolgozni egy olyan minta előkészítési protokollt, mellyel egységesen tudjuk kezelni a mintákat, mely gyors és alkalmazható minden gyűjtött növényi részre, illetve stabil kivonatok előállítását teszi lehetővé.

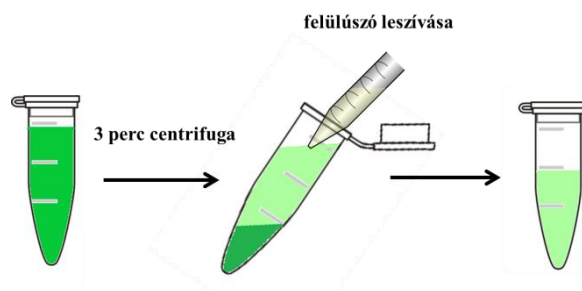
A kivonatokban lévő komponensek elválasztására vékonyréteg kromatográfiás módszereket fejlesztünk, ami által információt nyerünk a kromatográfiás tulajdonságaikról, illetve biztosítjuk az egyes elválasztott komponensek további vizsgálatát. Antioxidáns és antibakteriális anyagokat keresünk, melyeknek anyagcsoportját reagensekkel határozzuk meg, majd izolálásuk után nagyműszeres analitikai módszerekkel (HPLC-ESI-MS, illetve MS/MS) jellemezzük, lehetőség szerint azonosítjuk őket. Célunk az antioxidáns és antibakteriális komponensek időbeli, tavasztól őszi tartó változásának követése is.

A kivonatok teljes antioxidáns aktivitását galluszsav-ekvivalens (GAE) értékben adjuk meg, ami alapján összehasonlítást végzünk a különböző időben, különböző helyről gyűjtött minták között.

5. Anyag és Módszer

5.1. Mintagyűjtés, előkészítés és tárolás

A tavaszi és őszi akácmintákat az ország számos pontjáról gyűjtöttük, ezeket a **Függelék 1. és 2. táblázata** foglalja össze. A fehér akác rügyfakadása március közepén kezdődik és májusra a teljes lombzat kifejlődik, ebben az időszakban kezdődik a virágzás is. A lombhullás október-novemberben jellemző, a termés október közepére érik be (CSISZÁR, 2012). Ezen ismereteket felhasználva a tavaszi mintagyűjtési periódust május 15. és május 29. között jelöltük ki, hogy a lehető legtöbb egyed virágozzon a mintázáskor. Az őszi mintagyűjtés október 16. és október 23. között történt, amikor az akácok termése beérett. Egy fáról három mintavételezési pontról az adott időszaknak megfelelő minden növényi részt (levél, kéreg, virág, termés) tartalmazó vesszőt (egy éves hajtást) szedtünk. Kiválasztottunk egy egyedet Veszprémben (GPS-koordináták: 47.102411, 17.935618), melyről tavasztól őszig kéthetente mintavételeztünk kérget és levelet, hogy átfogó képet kaphassunk a növényi anyagösszetétel éven belüli változásáról. A gyűjtött mintákat a kidolgozott minta-előkészítési protokoll szerint kezeltük, további felhasználásig hűtve tároltuk. A friss mintákat a begyűjtést követően szétválogattuk, az esetleges szennyeződések eltávolítására. A vesszőkről leválasztottuk külön a virágokat, a termést és külön a leveleket, majd a külső kéreg-háncs-kambium réteget is lehántottuk (az egyszerűség kedvéért a továbbiakban „kéreg”-ként aposztrofálom), ezután szobahőmérsékleten, fénytől elzárt helyen szárítottuk. A kiszáradt mintákat kávédaráló segítségével porítottuk és megjelölt mintatartó üvegekben tároltuk 4 °C-on a további felhasználásig. Az elővizsgálatokhoz a mintákból 150 mg-nyi mennyiséget Eppendorf-csövekbe mértünk, ehhez különböző oldószereket (50%-os EtOH, MeOH, EtAc) adagoltunk 1 ml mennyiségben. A további lépéseket az **1. ábra** mutatja.

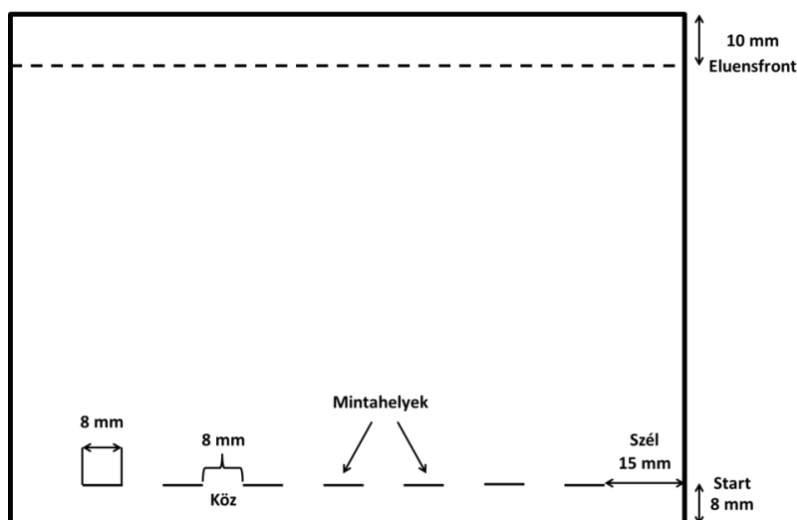


1. ábra – A kivonatkészítés lépései.

Az oldószer hozzáadása után 1 percig vortexeltük (Velp Scientifica ZX4), 3 percig ultrahangos vízfürdőben helyeztük (Tesla UC 005 AJ1), majd újabb 45 másodperc vortexelést követően centrifugáltuk a kivonatokat. A centrifugálást Dragonlab D1008 centrifuga segítségével, 5000 G-vel végeztük 1 percig, majd a felüliszót átpipettáztuk egy tiszta Eppendorf-csőbe. A csöveket egyedi jelöléssel láttuk el és 4 °C-on, hűtőben tároltuk a vizsgálatokig. A minták átlagos szárazanyag-tartalma 98 mg/ml.

5.2. Vékonyréteg kromatográfia (TLC)

Az akác kivonatok komponenseinek elválasztásához normál fázisú szilikagél 60, normál fázisú szilikagél 60 F₂₅₄, és RP-18-as rétegeket használtunk a Merck (Darmstadt, Németország) cégtől. A rétegekromatográfiában a mozgó fázishoz többféle oldószerkeletet (*n*-hexán, EtAc, EtOH, ecetsav) kipróbáltunk, melyet elővizsgálatok alkalmával fejlesztettünk ki a pontosabb elválasztás érdekében. A rétegre 2-10 µl-nyi kivonatot vittünk fel, melyet minden esetben egy 20 cm x 10 cm-es üveg ikerkádban (CAMAG, Muttenz, Svájc) fejlesztettünk ki. A réteglapon a minták elrendezése (**2. ábra**) a következő volt: *minta* – 8 mm, *köz* – 8 mm, *szél* – 15 mm, jelölési magasság (*start*) – 8 mm, kifejlesztési magasság (*eluens front*) – 90 mm-nél.



2. ábra – Mintafelvitel elrendezése vékonyrétegen.

A kifejlesztés után a rétegeket kivettük a kádból és az oldószert leszártítottuk róla. A megszártított kromatogramokat UV fény alatt (245 nm és 366 nm) dokumentáltuk, majd direkt bioautográfiás vizsgálatokra, antioxidáns aktivitás tesztre, karakterizálásra (reagens vizsgálatokra) vagy izolálásra használtuk.

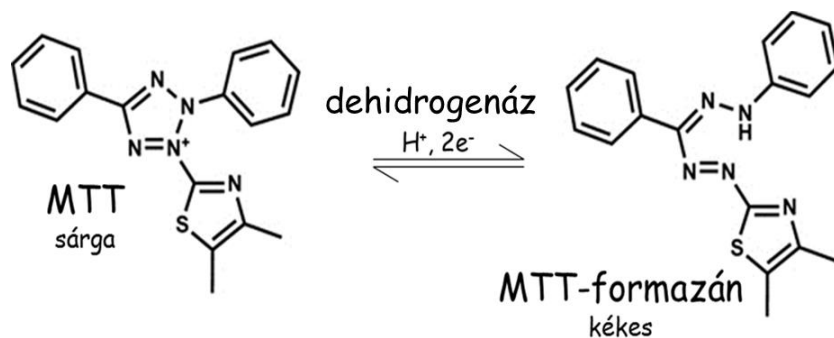
5.3. Direkt bioautográfia (DB)

A bioautográfia az összefoglaló neve a síkkromatográfiás elválasztási technikákhoz csatolt mikrobiális kimutatási módszereknek. A DB nagy előnye, hogy „*in situ*” a rétegen nagyszámú minta elválasztott komponenseit lehet tesztelni egy időben. A DB vizsgálatoknál az antibakteriális hatást kétféle módon vizualizáltuk: vitális festékekkel vagy biolumineszcens baktériumok alkalmazásával.

Jelen vizsgálatban négy baktériumtörzsszel dolgoztunk:

- *Bacillus subtilis* – talajbaktérium
- *Xanthomonas euvesicatoria* – paprika patogén
- *Aliivibrio fischeri* – mélytengeri lumineszkáló baktérium
- *Pseudomonas maculicola* – génmódosított lumineszkáló lúdfű patogén

A vizsgálat menete: a kifejlesztett réteget szárítás után belemártottuk baktérium sejtuszpenzióba. A szuszpenzióban 10 másodpercig tartottuk, majd kivettük, s hagytuk, hogy a felesleg lefolyjon. A matt baktériumos rétegeket (bioautogram) pára kamrába tettük és 2 órán keresztül 28 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően 1 mg/ml vizes MTT (Carl Roth, Karlsruhe, Németország) oldatba merítettük a rétegeket, majd 60 °C-on szárítottuk, és látható fényben fényképet készítettünk. A metabolikusan aktív, élő baktériumok által termelt mitokondriális dehidrogenáz enzim hatására a sárga MTT festék kék színű MTT-formazánná redukálódott. Az MTT molekulában bekövetkező változás okozta színreakció a vizualizáció alapja. A gátló anyagok, ahol nincs élő baktérium, világos foltokként jelentek meg a kék háttérrel szemben. A biokémiai folyamatot a **3. ábra** mutatja be.



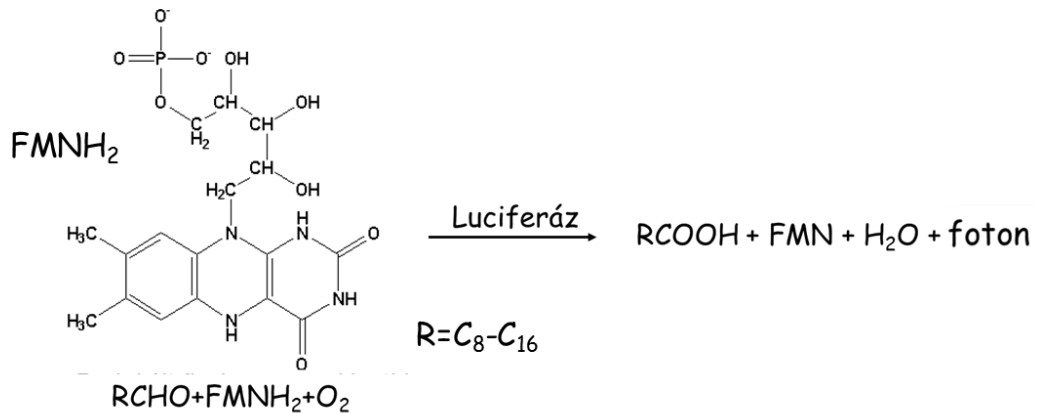
3. ábra – MTT redukciója mitokondriális dehidrogenáz enzim hatására.

Lumineszkáló baktériumok esetén a merítés után nincs szükség inkubálásra és festésre, a gátló anyagokat azonnal tudjuk detektálni hűtött kamera (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) segítségével.

Az expozíciós idők a baktériumtörzstől függően változtak:

- *Pseudomonas maculicola* - 15 perc
- *Aliivibrio fischeri* - 5 perc

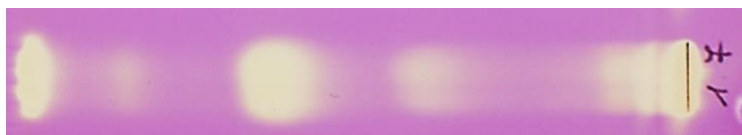
Ez esetben a háttér világít, mivel itt metabolikusan aktív, életképes baktériumok lumineszkálnak a rétegen, míg az elpusztult baktériumok sötét foltként jelennek meg. A biokémiai folyamatot a **4. ábra** írja le.



4. ábra – A fénykibocsátás mechanizmusa a lumineszkáló baktériumokban.

5.4. Antioxidáns aktivitás vizsgálatok (rétegen és mikrolemezen)

Az antioxidáns hatású vegyületeket egy mesterségesen előállított, stabil szabadgyökkel, DPPH-val (Sigma, Budapest) mutattuk ki. Ez a vegyület színreakcióval jelzi az aktivitást mutató anyagok jelenlétét: lila színe sárgára változik. A rétegen ezt a reakciót a futtatás után 0,396 mg/ml-es DPPH-oldatba merítéssel értük el. A réteg újbóli száradását követően a lila háttéren megjelenő sárga foltok jelzik az aktív anyagok jelenlétét (5. ábra).



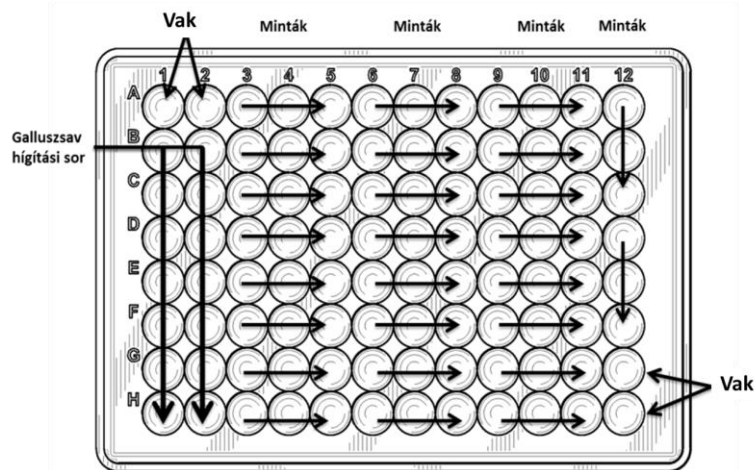
5. ábra – Antioxidáns hatású anyagok kimutatása vékonyrétegen. Az antioxidáns jelenlétét színváltozás jelzi, a lila színű reagens kisárgul

A metanolos kivonatok összantioxidáns kapacitását 96 lyukú mikrolemezen vizsgáltuk. A kvantitatív mérésben kapott számadatokat galluszsav-ekvivalens egységekbe átszámolva összehasonlítást tudunk végezni a minták antioxidáns aktivitása között. A műszer kalibrálását követően a kivonatokhoz 0,396 mg/ml-es DPPH oldatot injektáltunk, az arányokat 3. táblázat foglalja össze.

3.táblázat – A mikrolemezes mérések vizsgálati paraméterei

Tavaszi			Éves			Őszi		
Minta	Koncentráció (mg/ml)	DPPH + kivonat (μl)	Minta	Koncentráció (mg/ml)	DPPH + kivonat (μl)	Minta	Koncentráció (mg/ml)	DPPH + kivonat (μl)
Levél	5	100 + 20	Levél	5	100 + 20	Levél	5	100 + 20
Kéreg	50	90 + 30	Kéreg	50	90 + 30	Kéreg	33,3	90 + 30

A színváltozás itt is azonos módon történik, mint a rétegen. Vannak a kivonatoknak megfelelő mennyiségű MeOH-t használtunk, mely nem mutat antioxidáns hatást. Az adatok galluszsav-ekvivalens értékének meghatározásához, hígítási sort készítettünk 1 mg/ml galluszsav MeOH-os oldatából kiindulva. A mikrolemezen végzett kísérlet elrendezése a 6. ábrán látható.



6. ábra - 96 lyukú mikrolemez kísérleti elrendezése.

A mérések során technikai ismétlésként mintánként három-három lyukat használtunk fel, megbizonyosodva arról, hogy a reakcióelegyben egységes az anyageloszlás, illetve nincs bomlás. A műszeres mérést StatFax 2100 mikrolemez-olvasóval végeztük, abszorbanciát mérve 492 nm hullámhosszon. A szabadgyök-fogó képességet százalékban adjuk meg az alábbi képlet alapján:

$$A\% = \frac{A_{492 \text{ blank}} - A_{492 \text{ minta}}}{A_{492 \text{ blank}}} \times 100$$

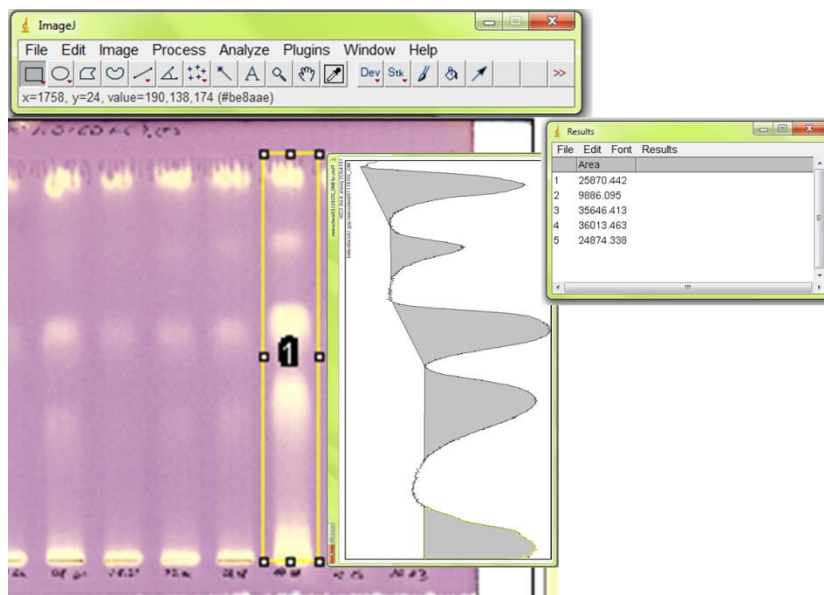
- $A_{492 \text{ blank}}$ a vak (DPPH + MeOH) abszorbanciája
- $A_{492 \text{ minta}}$ a minta mért abszorbanciája

Az adatokat Microsoft Office Excelben rögzítettük. A statisztikai próbákhoz az RStudio programot használtuk.

5.5. Statisztika és video denzitometria

A mintázott fehér akácfák egyes részeinek teljes antioxidáns kapacitásának összehasonlításához, mikrolemezen folyadékfázisban végzett kísérleteket végeztünk. A szabadgyök-fogó képességüket átszámoltuk galluszsav-ekvivalens egységbe, ami segítségével összehasonlítottuk a minták aktivitását. A galluszsav, egy ismert antioxidáns anyag, melyre számos szakirodalom is hivatkozik. Az Rstudio programban összevetettük a kéreg- és levélkivonatok GAE értékeit, illetve következtettünk arra, lehet-e kapcsolat az egyedekben a tavaszi és az őszi antioxidáns aktivitás között.

A kivonatokból a rétegen elválasztott aktív komponensek arányát terület-összehasonlítással tudjuk mérni. Ehhez az előhívott réteget bescanneltük és ImageJ program segítségével a sávokat video denzitometráltuk (**7. ábra**).



7. ábra – TLC video denzitometrálsa ImageJ programmal.

A video denzitometriával kapott terület-integráltakat párosított T-próbával vizsgáltuk, hogy évszakonként, illetve mintatípusként lehet-e szignifikáns különbséget kimutatni a fehér akác egyes elválasztott komponensei között.

5.6. Karakterizálás (reagens vizsgálatok)

Annak érdekében, hogy a kivonatokból kimutatott antibakteriális és antioxidáns hatású komponensek anyagcsoportját meghatározzuk, párhuzamosan fejlesztettünk ki rétegeket. A vizsgálatok során a kivonatokból 10 µl-t vittünk fel a rétegre, majd *n*-hexán-EtAc megfelelő arányú elegyében futtattuk CAMAG kifejlesztő kádban. Ezt követően direkt bioautográfiás (*Bacillus subtilis*) és antioxidáns aktivitás (DPPH) vizsgálatokat végeztünk az aktív komponensek meghatározásához. Az alkalmazott reagens receptjét és használatát a **4. táblázata** foglalja össze.

4. táblázat - Az azonosításhoz használt kémiai reagensek és jellemzőik

Reagens	Recept	Szubsztrát	Hevítés (°C)	Láthatóság
Anilin	15% anilin + 50% ortofoszforsav 1-butanolban oldva	Szénhidrát	125	VIS
AlCl₃	5 g só+ 50 ml MeOH	Flavonoid	90	366 nm
Difenilamin	2 g difenilamin + 2 ml anilin + 80 ml acetone + 15 ml foszforsav	Szénhidrát	110	VIS
DPPH	19,8 mg DPPH + 50 ml MeOH	Antioxidáns	45	VIS
FastBlueB	140 mg só + 10 ml desztillált víz + MeOH-val kiegészítve 40 ml-re; ebből 20 ml + 55 ml MeOH + 25 ml diklórmétán	Fenoloid	45	254 nm
Folin	10 % Folin + 7 m/m % Na ₂ CO ₃	Fenoloid	60	VIS
Ninhidrin	0,3 mg ninhidrin + 95 ml 2-propanol + 5 ml 96%-os ecetsav	Fehérje, amin	110	VIS
NP- PEG	0,25 g NP + 100 ml MEOH I.; 2,5 ml PEG + 250 ml MeOH II.	Flavonoid	60 I. + 60 II.	366 nm
Primulin	0,02%-os oldat + acetone: víz 4:1 oldószerben	Zsírsv	45	366 nm
RhodaminB	50 mg só + 200 ml desztillált víz	Fenoloid	60	366nm
Vanillin-Kénsav	200 mg vanillin + 1 ml cc. H ₂ SO ₄ + 50 ml EtOH	Általános	110	VIS, 366 nm

5.7. Izolálás

Az aktív anyagok meghatározását biztosító nagyműszeres vizsgálatokhoz, az aktív komponenseket izoláltuk a rétegről. A kifejlesztéshez 10 mm-en 10 µl és 5 mm-es közzel 155 mm-en 155 µl kivonatot vittünk fel szilikagél 60 F₂₅₄ típusú rétegre. Eluensként *n*-hexán:EtAc megfelelő arányú elegyét alkalmaztuk. Az alapján a réteg további részéről az aktív sávot, valamint negatív kontrollnak egy háttér foltot kijelöltünk és lekapartunk. A lekapart adszorbenst Eppendorf-csőbe tettük és az antibakteriális anyagot MeOH-val, az antioxidáns anyagot 10% ecetsavat tartalmazó MeOH-val oldottuk le a szilika szemcsékről. Az adszorbenstről való leoldás lépései a kivonatkészítés lépései szerint történtek. A felülúszót vákuumos szárítógépben (Savant SpeedVac ISS100) beszárítottuk majd újra feloldottuk 100 µl MeOH-ban. Az izolálás sikerességét rétegen ellenőriztük. Ehhez az izolátumot, a háttérrel és az eredeti mintát egy rétegen futtattuk, s direkt bioautográfiával vagy DPPH-teszttel kimutattuk, hogy az aktív anyag jelen van-e az izolátumban.

5.8. Nagyműszeres vizsgálatok

Az izolátumokban lévő antibakteriális és antioxidáns hatású anyagok jellemzéséhez nagyműszeres vizsgálatokat terveztünk. A fordított fázisú HPLC elválasztás után DAD, ESI-MS vagy ESI-MS/MS detektorokkal jellemeztük az anyagokat. A vizsgálatokat követően az aktív anyagoknak megkaptuk a retenciós idejét, az UV spektrumát és a tömegspektrumát. Az egyik legelterjedtebb ionizációs technika az elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization, ESI). A nagy hőmérséklet és a nagy feszültségkülönbség eredményeképpen az ionizáló cellában a porlasztott mintaoldat cseppjei töltést vesznek fel és beszáradnak, melynek eredményeképpen gázfázisú ionok képződnek. Az ESI, egy úgynevezett „lágyszó ionizációs” technika, ami alkalmas a molekulaionok vagy addukcionok kimutatására fragmentáció bekövetkezése nélkül. Az MS/MS méréseket kooperációban a SOTE Farmakognózia Intézetében Dr. Alberti Ágnes végezte, s ez esetben a molekulaion fragmentációját nézzük, mely szerkezeti meghatározást segít elő. A tömegspektrométer végzi a keletkezett ionok tömeg/töltés (m/z) szerinti szétválasztását és detektálását.

A nagyműszeres vizsgálatok paraméterei:

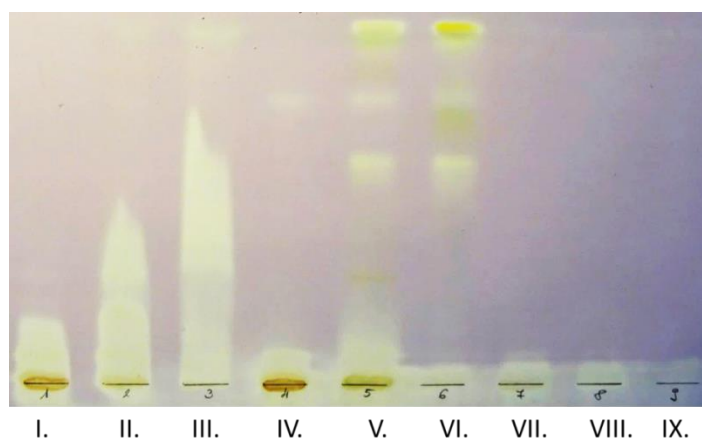
- **Műszer:** Az általunk használt HPLC-DAD-ESI-MS (Shimadzu, LC-MS-2020) bináris gradiens oldószer pumpával (LC-20AD), vákuum gáztalanítóval (DGU-20A_{3R}), termosztált automata mintavevővel és oszlop termosztáttal (CTO-20AC) felszerelt.
- **Detektorok:** DAD – diódasoros detektor, deutérium és wolfram izzóval (SPD-M20A), kvadрупól tömegdetektor.

Az adatok rögzítése és feldolgozása a *LabSolution* program segítségével történt. Az egyes izolátumokat közvetlenül az MS-ben is vizsgáltuk, ezekről a mérésekről bővebben az **Eredmények** fejezetben olvashatnak. A műszer beállításának további paraméterei a **Függelék, 5. táblázatában** olvasható.

6. Eredmények

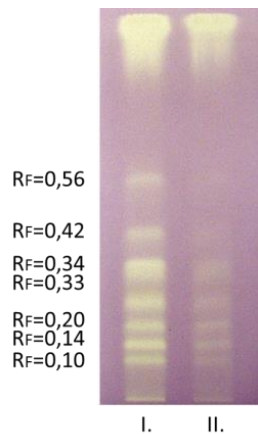
6.1. Vékonyréteg kromatográfia (TLC) eredményei

A kromatográfias elővizsgálatok során először a különböző oldószerekkel készített kivonatokat hasonlítottuk össze. Az antioxidáns hatású anyagok TLC-DPPH-s vizsgálatánál kiderült, hogy a különböző oldószeres kivonatok közül a MeOH-s kivonatok tartalmazták a legtöbb antioxidáns hatású anyagot a kéreg, levél és virág esetében tavasszal és ősszel is, míg a termésnél az 50%-os EtOH bizonyult a legjobbnak. A kéreg és a levél tartalmazta a legnagyobb mennyiségben az aktív anyagokat, így a továbbiakban ezek MeOH-os kivonatait vizsgáltuk. A **8. ábra** mutatja, hogy az első kísérleteknél kipróbált eluenst tovább kellett fejlesztenünk, hogy jobb elválasztást, kompaktabb aktív zónákat kapjunk. Az úgynevezett bioaktivitás irányította módszerfejlesztést alkalmaztuk, azaz a kromatográfias körülményeket a biológiai értékelés eredménye alapján változtattuk.



8. ábra – A kéreg, levél és termés kivonatok antioxidáns hatású anyagainak kimutatása. DPPH-val. Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v); Réteg: 60 F₂₅₄;
I.-III. Kéregkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
IV.-VI. Levélkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
VII.-IX. Terméskivonat (EtOH, MeOH, EtAc)

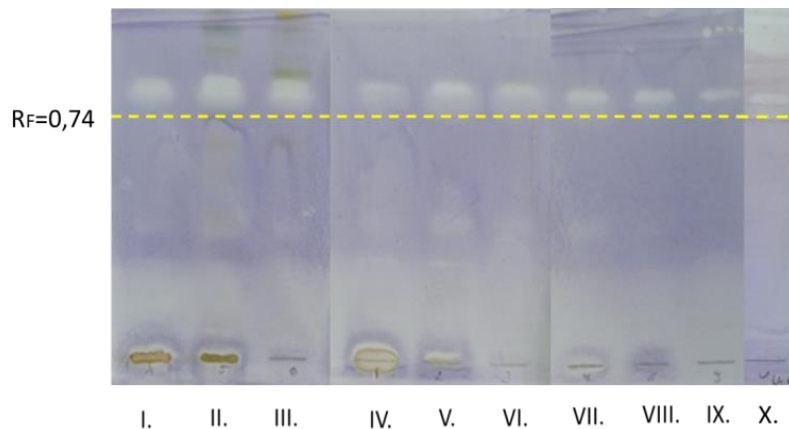
A kéregkivonatok esetében a frontba futó anyagok további elválasztását HPTLC RP-18 rétegen végeztük, aminek az eredményét a **9. ábra** szemlélteti (a fordított fázisú rétegen frontba futó anyagok a normál fázisú rétegen $R_F=0,2-0,9$ között elvált anyagok).



9. ábra – Kéregkivonatok antioxidáns hatású anyagainak kimutatása DPPH-val.
 Eluens: ACN:EtOH (70:30); Réteg: HPTLC RP-18;
 I. – Őszi kéregkivonat, II. – Tavaszi kéregkivonat

6.2 Direkt bioautográfia eredményei

A vékonyrétegen elvégzett direkt bioautográfias vizsgálatok alapján a fehér akác vizsgált részei tartalmaznak antibakteriális anyagokat *Bacillus subtilis* (**10. ábra**), *Xanthomonas euvesicatoria* (**11. ábra**), *Aliivibrio fischeri* (**12. ábra**) és *Pseudomonas maculicola* (**13. ábra**) baktériumokkal szemben.

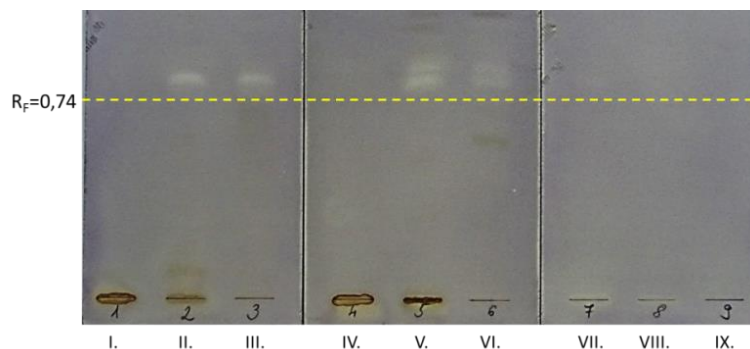


10. ábra – Antibakteriális hatás igazolása rétegen *B. subtilis*-szel szemben.

Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;

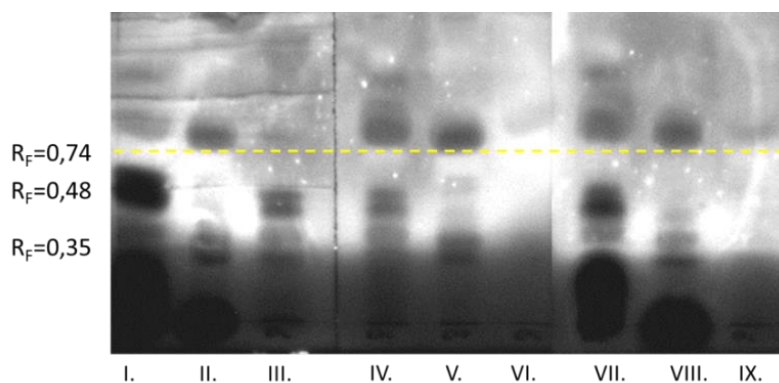
- I.-III. - Kéregkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
- IV.-VI. – Levélkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
- VII.-IX. - Terméskivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
- X. – Virágkivonat (MeOH)

B. subtilis-szel szemben a vizsgált növényi részek (kéreg, levél, termés, virág) kivonatai azonos R_F értéknél (0,74) gátlóhatást mutatnak, így ezek MeOH-os kivonatai ugyanazon antibakteriális anyag(ok)at tartalmazhatják.



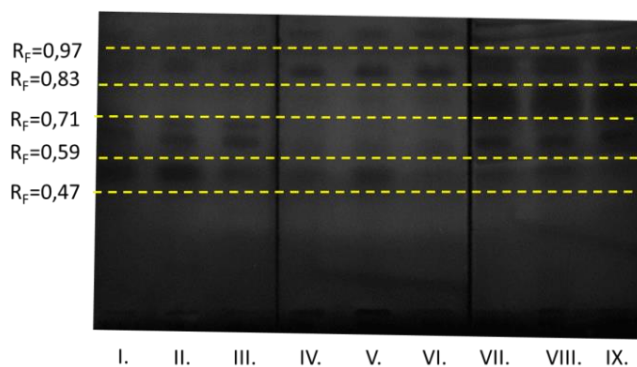
11. ábra - Antibakteriális hatás igazolása rétegen *X. euvesicatoria*-val szemben.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
 I.-III. - Kéregkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
 IV.-VI. – Levélkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),
 VII.-IX. - Terméskivonat (EtOH, MeOH, EtAc)

A **11. ábrán** a MeOH-os és EtAc-os kéreg- és levélkivonatoknál, a *B. subtilis*-hez hasonlóan, ugyancsak $R_F=0,74$ -nél antibakteriális gátlózóna látható. Az EtOH-os kivonatok nem mutatnak aktivitást, továbbá a termés sem tartalmaz jelentős mértékben gátló anyagot *X. euvesicatoria*-val szemben. Ennek oka lehet, hogy bár az anyag jelen van, a minimum gátló koncentrációt nem éri el, így antibakteriális hatása nem tapasztalható.



12. ábra - Antibakteriális hatás igazolása rétegen *A. fischeri*-vel szemben.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
 I.-III. – EtOH-os kivonat (kéreg, levél, termés),
 IV.-VI. – EtAc-os kivonat (kéreg, levél, termés),
 VII.-IX. - MeOH-os kivonat (kéreg, levél, termés)

A. fischeri lumineszkáló baktériummal szemben a gátlózóna sötét foltként jelenik meg a rétegen, ahol nincs életképes baktérium, így lumineszkálás sem látható. Egységesen erős gátlóhatás figyelhető meg a kéreg alkoholos kivonataiban $R_F=0,48$ -nál, mindhárom levélkivonatban $R_F=0,35$ -nél, illetve $R_F=0,74$ -en is megfigyelhető antibakteriális hatást jelző sötétebb zóna, mely az előző két baktériummal szemben is aktív volt. A termés aktivitása itt sem meghatározó.



13. ábra - Antibakteriális hatás igazolása rétegen *P. maculicola*-val szemben.

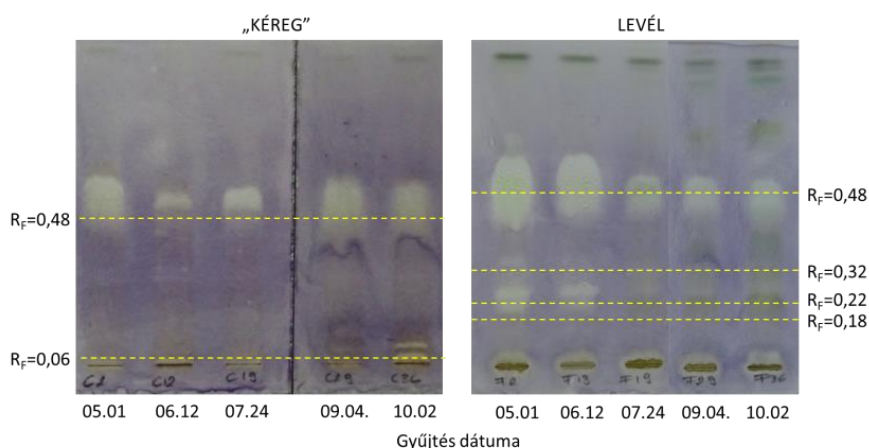
Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;

I.-III. - Kéregkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),

IV.-VI. – Levélkivonat (EtOH, MeOH, EtAc),

VII.-IX. - Terméskivonat (EtOH, MeOH, EtAc)

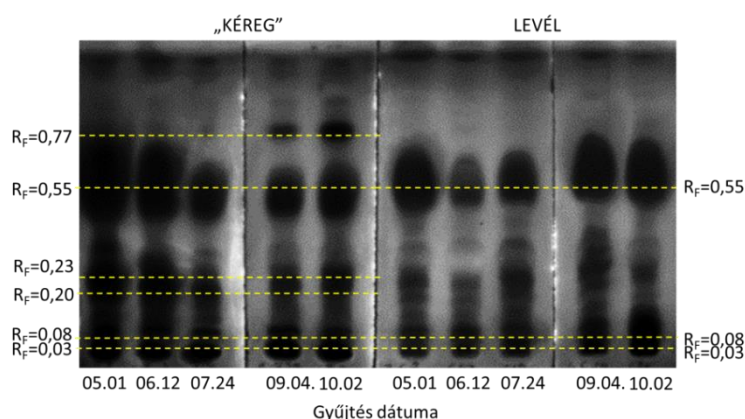
Számos gátlóanyag *P. maculicola* baktériumtörzsszel szemben is kimutatható, azonban az eddig egységes 0,74-es R_F értékű gátló zóna nem jelenik meg. Eddigi vizsgálataink alapján elmondható, hogy a fehér akác *B. subtilis*, *X. euvesicatoria*, *A. fischeri* és *P. maculicola* baktériummal szemben hatásos antibakteriális anyagokat tartalmaz a növény vizsgált részeiben. Bár egyes esetekben mutatnak eltérést a kéreg- és levélkivonatok mátrixai, $R_F=0,74$ -en az első három baktériummal szemben megjelenik egy karakteres gátlózóna, viszont a *P. maculicola* ezen R_F -nél lévő anyag(ok)kal szemben nem érzékeny. Ezen gátlózónában lévő anyag(ok)at további vizsgálatok során jellemeztük és azonosítottuk. Megvizsgáltuk, hogy a kivonatok antibakteriális hatása az év során egységes-e a növényben, avagy függ az évszaktól. Ehhez virágzástól terméshezásig öt-öt kéreg- és levélkivonatot vizsgáltunk nagyjából egy hónapos gyűjtési különbségekkel.



14. ábra - A kéreg és levélminták antibakteriális hatásának változása tavasztól őszig.

B. subtilis-szel szemben. Eluens: *n*-hexán:EtAc (60:40), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄

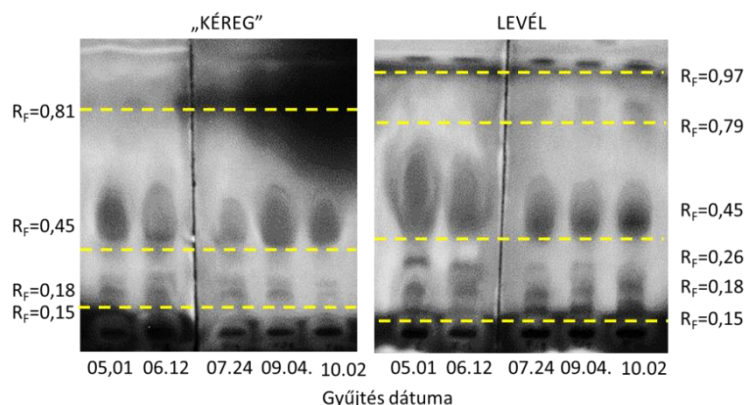
Elmondható, hogy az akác kérgében a korábban is tapasztalt gátlózónát (gyengébb eluenssel R_F 0,48-nál) kimutattuk mind az öt időpontban szedett mintában, melyek közel azonos méretűek, illetve ősszel egy új anyag jelenik meg 0,06-os retenciós idővel (**14. ábra, bal oldal**). A levélben tavasszal figyelhető meg nagyobb mennyiségű és többféle antibakteriális anyag. $R_F=0,32$ és $R_F=0,18$ -on megjelenik egy új gátló anyag, mely később eltűnik, továbbá egy új karakteres gátlózóna is megjelenik $R_F=0,22$ -nél mely nyár közepétől már szintén nem számottevő a növényben. Az $R_F=0,48$ -as anyag mennyisége az év folyamán szemmel láthatóan csökken (**14. ábra, jobb oldal**).



15. ábra - A kéreg- és levélminták antibakteriális hatásának változása tavasztól őszig *A. fischeri*- vel szemben.

Eluens: *n*-hexán:EtAc (60:40), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄

A *B. subtilis*- szel szemben tapasztalt különbségek a kéreg- és a levélminták kivonatai között *A. fischeri*- vel szemben kevésbé látványosak (**15. ábra**). A kéregkivonatokban ősszel megjelenik egy új, markáns gátlóanyag, viszont a levélben lévő gátlóanyagok minőségében nincs számottevő eltérés az év során.



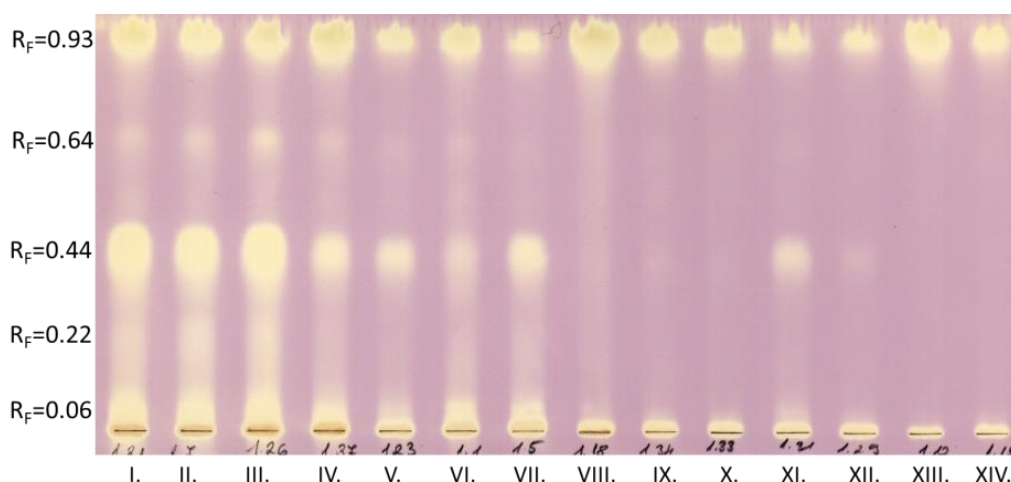
16. ábra - A kéreg- és levélminták antibakteriális hatásának változása tavasztól őszig *P. maculicola*-val szemben.

Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄

Az évszakos változás az antibakteriális anyagok tekintetében *P. maculicola*-val szemben is megfigyelhető (**16. ábra**). Főleg a levélkivonatokban, az ősz közeledtével látványosan gyengülnek a gátlóhatást mutató anyagok, így a zónák is egyre kisebbek lesznek, a kéreg esetében az alacsonyabb R_F értékű anyagok el is tűnnek, azonban az $R_F=0,45$ -nél lévő anyag a teljes mintázás alatt megfigyelhető a kivonatokban.

6.3 Antioxidáns aktivitás vizsgálatok eredményei (rétegen és mikrolemmez)

A vékonyrétegen az elővizsgálatok során kifejlesztett eluenseket használva összehasonlítottuk a minták antioxidáns aktivitását, melyből a legszemléletesebbet, a kéregmintákét mutatjuk be részletesen. A rétegen mennyiségi összehasonlítás az aktív zónák denzitometráálásával (pl.: video denzitometráással) lehetséges. A nagyobb átmérőjű foltok nagyobb relatív mennyiségi változást jeleznek. A **17. ábrán** a tavasszal gyűjtött kéregminták kivonatainak aktivitása látható.



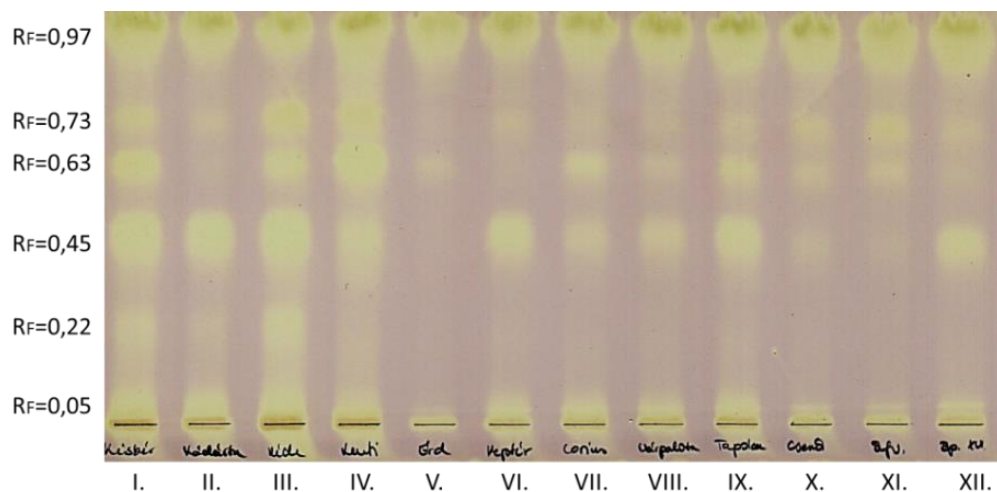
17. ábra – Tavasszal gyűjtött kéregminták antioxidáns hatásának összehasonlítása.
Eluens: *n*-hexán:EtAc (40:60+5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
Gyűjtés helye: I.-XIV. (Függelék, 1. táblázat)

A rétegre a minták felvitele a mikrolemmez vizsgálatok GAE értékei szerint csökkenő sorrendben történt. Az antioxidáns kapacitás (mikrolemezes vizsgálat) sokkal objektívebb képet ad, mivel az egyes komponensek különböző arányban járulnak ehhez hozzá, illetve nem elhanyagolható tény, hogy az egyes antioxidáns anyagok más antioxidáns vegyületeket képesek visszaredukálni, így nagyobb antioxidáns kapacitás értékeket adnak együtt, mint külön-külön. Antioxidáns hatású zónák 5 különböző R_F-nél mutathatók ki (R_F - 0,06 - 0,22 - 0,44 - 0,64 – 0,93), az egyes kivonatok aktivitása azonban jelentős eltérést mutat. A II. és III. mintának közel azonos a GAE értéke, az I.-nek magasabb, ez azonban a kromatogramokon szemmel látható különbségként nem figyelhető meg.

A IV-VII. minták a rétegen kisebb diverzitást mutatnak az antioxidáns hatású komponensek tekintetében, azonban a 0,44-es retenciós faktorú folt aktivitása ezekben is jelentős. A VIII.-XIV. minták GAE értéke lényegesen kisebb az előzőeknél, rétegen jól látható, hogy a jelentős aktivitásért felelős komponensek itt hiányoznak, az aktív foltok a

starton, vagy a frontba futnak (kivéve a XI. minta, ahol $R_F=0,44$ -nél is megjelenik az aktív anyag.)

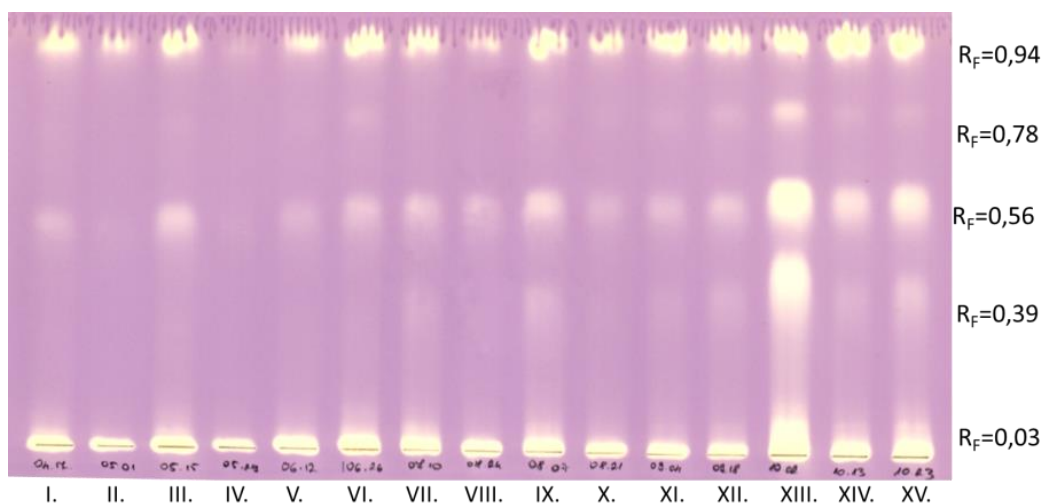
Az őszi mintavételezéskor gyűjtött kéregmintákból készült kivonatok kromatogramját a **18. ábra** szemlélteti.



18. ábra – Ősszel gyűjtött kéregminták antioxidáns hatásának összehasonlítása.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (40:60+5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄; Gyűjtés helye: I.-XII.
 (Függelék, 2. táblázat)

A mintafelvittelt ebben az esetben is a galluszsav-ekvivalens egységek határozták meg, az aktivitásbeli különbségeket legalább 4 komponens (egy folt több vegyületet is tartalmazhat) befolyásolja. Az R_F 0,22 – 0,45 – 0,63 – 0,73 zónák változó méretéből illetve jelenlétéből lehet következtetéseket levonni. A 0,22 retenciós faktorú vegyület(ek) az első 4 mintában meghatározó a többiben nem látható. A legjelentősebb mennyiségben az R_F 0,45-ös komponens van jelen a mintákban. Az R_F 0,63-as zóna változatos mennyiségekben található, de egyes esetekben egyáltalán nincs jelen az adott mintában. A 0,73-as retenciós faktorú anyag minden mintában, kis mennyiségben jelen van, kivételt képez a II. és V. minta. Emellett fontos megemlíteni, hogy a starton maradt, illetve a frontba futott anyagok aktivitása is meghatározó lehet az összantioxidáns aktivitás tekintetében.

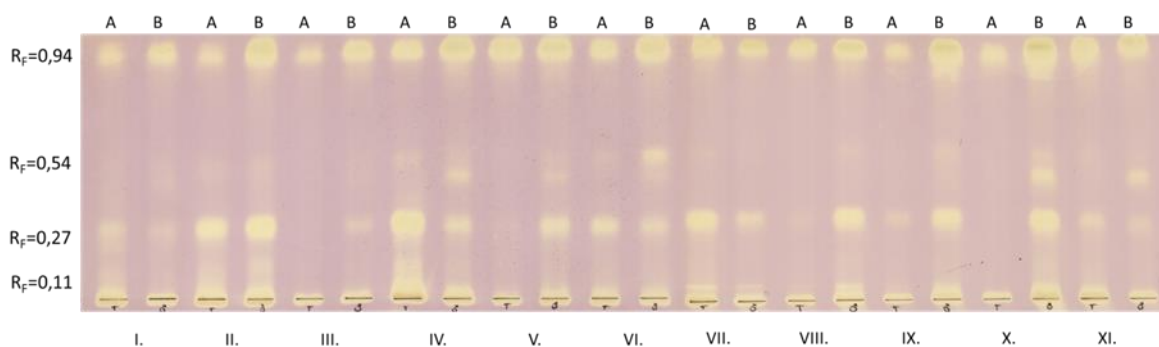
Ahhoz, hogy a tavasztól ősziig tartó változásokat a minél pontosabban nyomon tudjuk követni, kéthetente mintáztunk egy egyedet, s kivonatait időrendben rétegre vittük **(19. ábra)**.



19. ábra – A kéregminták antioxidáns összetételének változása tavasztól ősziig.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (40:60+5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
 Mintagyűjtés ideje: I. – XV. **(Függelék, 6. táblázat)**

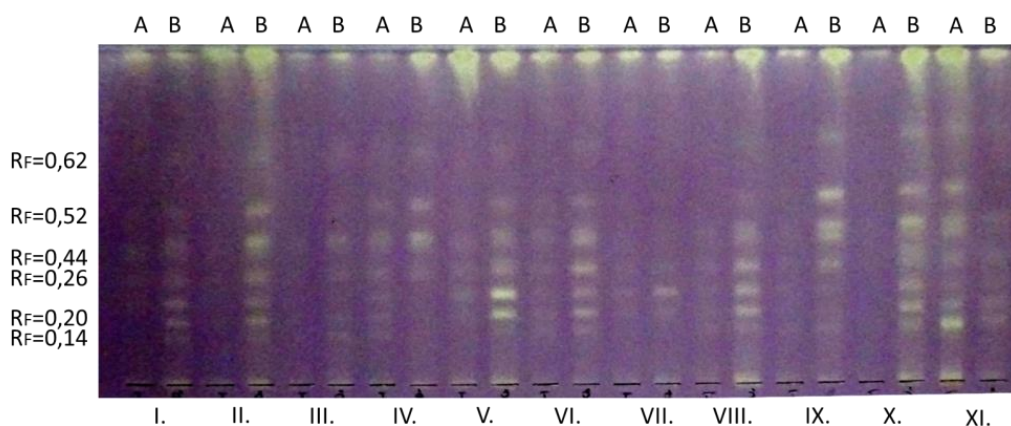
A kéregkivonatok esetében megállapítható, hogy az őszi közeledtével nő az aktivitás aktivitást mutató komponensek mennyisége. A vegetációs idő kezdetekor még alacsony, az elvált anyagok főleg a starton maradnak, vagy a frontba futnak, virágzás előtt (III. sáv) azonban megnő az R_F=0,56-os anyag aktivitása. Virágfakadás után a kéreg antioxidáns hatású anyagainak mennyisége lecsökken (IV. sáv), majd fokozatosan újra elkezd nőni. A nyári időszak alatt (V.-XII. minta) a kivonatok aktivitásában a kromatogram és a GAE érték szerint nincs jelentős változás. XIII. minta, a termésérésének kezdeti szakasza egy aktivitási csúcs, ekkor kiugróan magas az antioxidáns aktivitás, mely után ismét lecsökken.

Ahhoz, hogy igazoljuk, a leírt változás általános a fehér akác tekintetében, az ország különböző pontjairól, tavasszal és ősszel azonos egyedről, gyűjtött minták kivonatait hasonlítottuk össze a **20. ábrán**.



20. ábra – A kéregkivonatok antioxidáns hatása tavasszal (A) és ősszel (B).
Eluens: *n*-hexán:EtAc (40:60+5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
Gyűjtés helye: I. –XI. (**Függelék, 7. táblázat**)

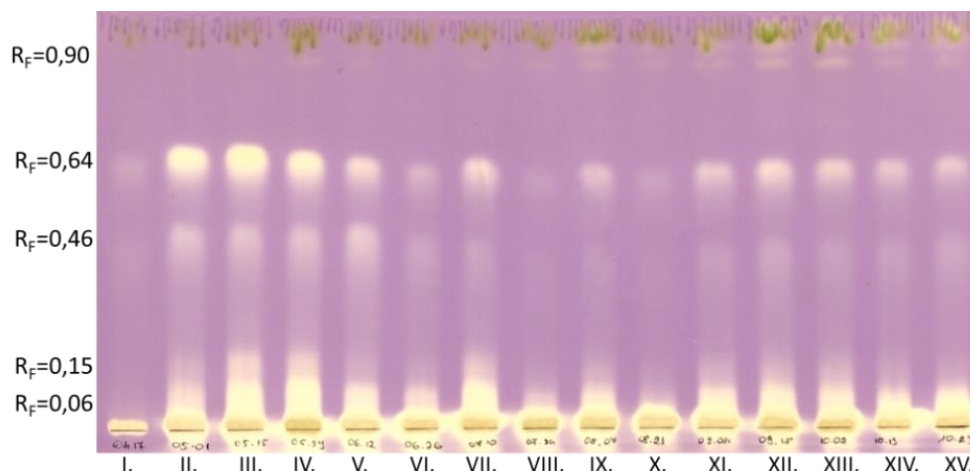
Látható, hogy az elválasztott komponensek aktivitása a kivonatok döntő többségében magasabb ősszel, mint tavasszal, kivéve az I., IV., VII. minták esetében. Ezen minták gyűjtési helye távol esik egymástól, így nem hivatkozhatunk helyi sajátosságra, viszont okozhatja például egy fertőzés, mely ellen az egyednek védekeznie kellett. A frontba futott ($R_F=0,94$) anyagok további elválasztását is elvégeztük (**21. ábra**).



21. ábra – A kéregminták antioxidáns hatása tavasszal (A) és ősszel (B).
Eluens: ACN:EtOH (60:40), Réteg: HPTLC RP-18;
Gyűjtés helye: I. –XI. (**Függelék, 7. táblázat**)

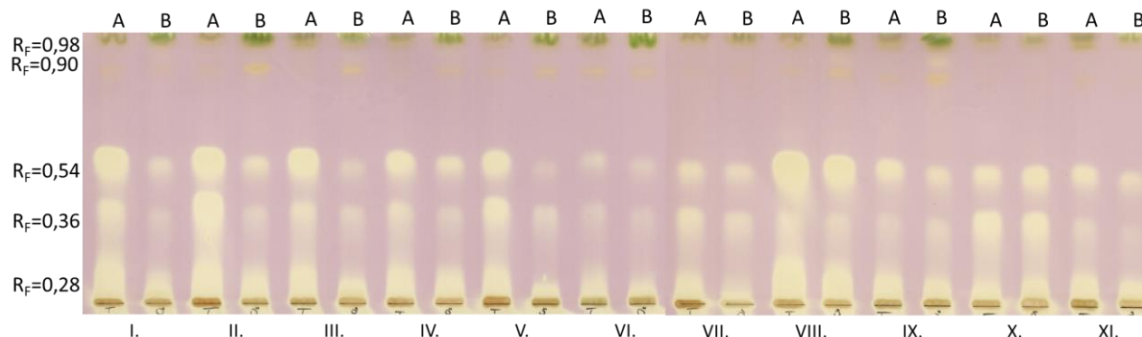
A frontból elválasztott komponensek aktivitása azokban a kivonatokban is ősszel mutatkozott erősebbnek, melyeknek a normál fázisú rétegen tavasszal tartalmaztak nagyobb mennyiségű antioxidánst. Ez alól kivétel a XI. kivonat, mely fordított fázison történő futtatásakor a tavaszi kivonat prezentált több aktív anyagot.

A vegetációs periódusban kéthetente levélmintákat is gyűjtöttünk, hogy az antioxidáns aktivitás változását ebben a szervben is nyomon követhessük. A kromatogram a **22. ábrán** látható.



22. ábra – A levélminták antioxidáns összetételének változása tavasztól őszig.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (30:70+5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
 Mintagyűjtés ideje: I. – XV. (**Függelék, 1. táblázat**)

Megfigyelhető, hogy közvetlenül rügyfakadás után (I. sáv) a levél metanolos kivonataiban alig mutatkozik antioxidáns. Közvetlenül a virágzást megelőző, és az azt követő mintázaskor (II.-IV.) rendkívül magas a növényben az aktív anyag tartalom. A nyár közepén (VIII. és X.), akárcsak a kéregkivonat esetében, itt is megfigyelhető, hogy jelentősen lecsökken az elválasztott komponensek mennyisége. Az őszt közeledtével újra nőni kezd az antioxidáns tartalom a levélben is, amit valószínűleg a bomlástermékek okoznak, például színanyagoké. Levélkivonatok esetében az év során a kiválasztott egyednél tapasztalt változást több egyed vizsgálatával alátámasztottuk (**23. ábra**). A minták mindegyikében jelentkezett a várt különbség a tavasszal és az ősszel gyűjtött levélkivonatok antioxidáns aktivitása között.

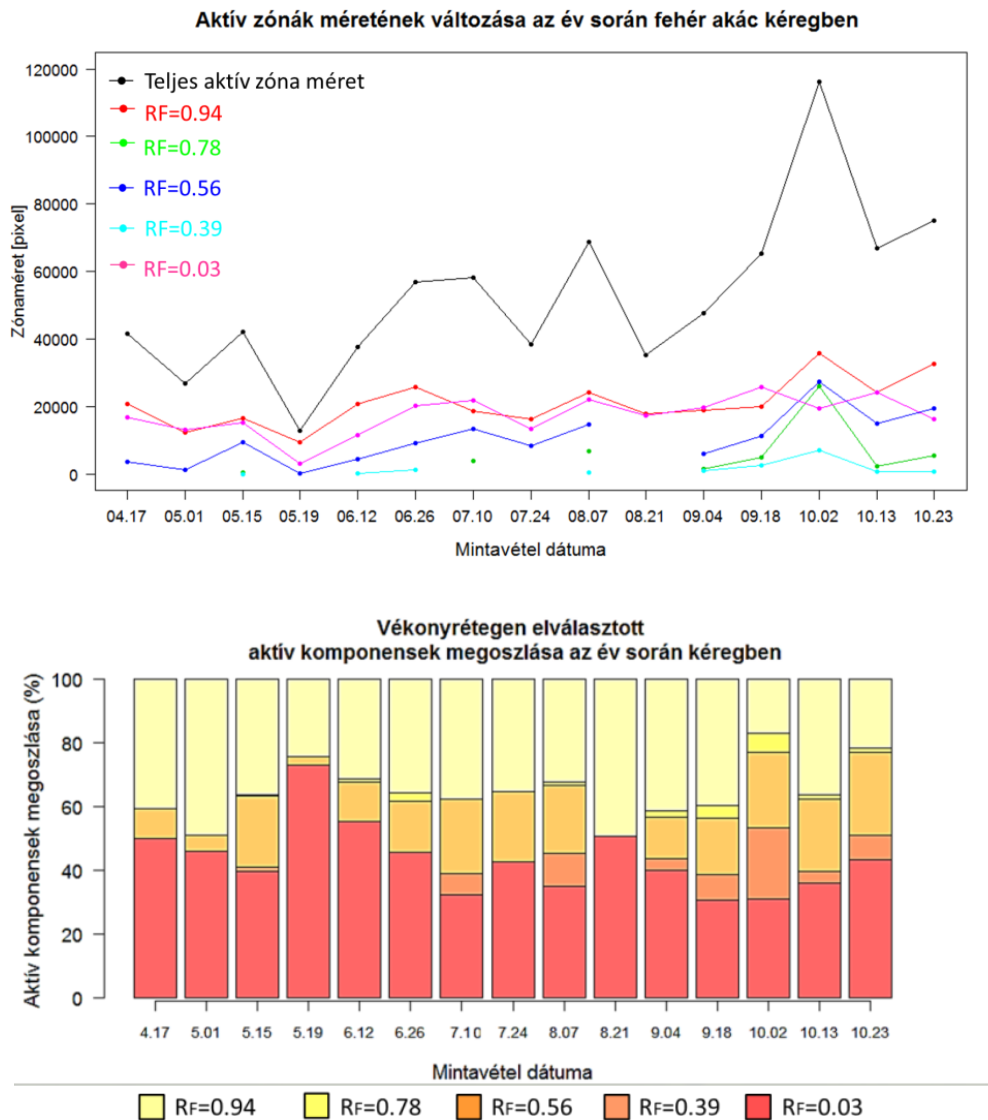


23. ábra – A levélminták antioxidáns hatása tavasszal (A) és ősszel (B).
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (40:60+5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
 Gyűjtés helye: I. –XI. (**Függelék, 7. táblázat**)

6.4 Statisztika és video denzitometria

A kiválasztott veszprémi akácot mintázva létrehoztunk egy teljes változás-követést, az antioxidáns hatású anyagokra, mely a tavaszi lombfakadástól az őszi lombullásig tartott.

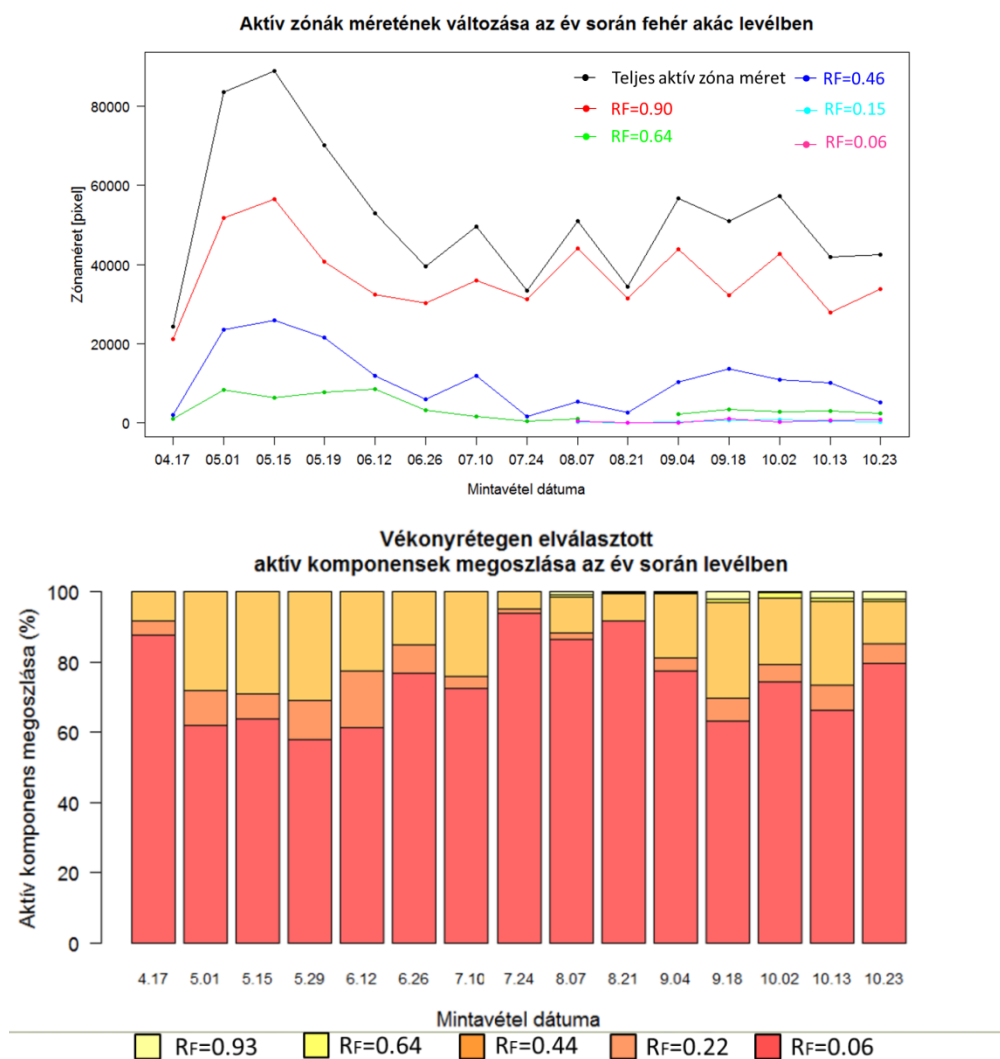
Az aktív komponensek, és az összantioxidáns aktivitás változása a kéregre a **24. ábrán, felső képe** az összantioxidáns aktivitáshoz képest az elválasztott komponensek megoszlását kéregkivonatra a **24. ábra, alsó képe** mutatja.



24. ábra - TLC-n elválasztott kéregkivonatok antioxidáns hatású komponenseinek változása.

A diagramon a kéthetenkénti mintázás függvényében látjuk az aktív komponensek területének változását a rétegen. A **24. ábra, alsó képén** a TLC-n elválasztott kéregkivonatok antioxidáns hatású komponenseinek változása az összantioxidáns aktivitáshoz képest. A video denzitometria a **19. ábra** alapján készült.

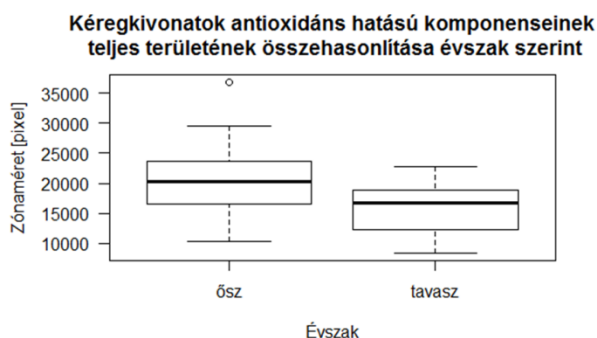
A levélkivonat összantioxidáns aktivitásának változását a **25. ábra felső képe**, az elválasztott komponensek megoszlását a **25. ábra alsó képe** szemlélteti.



25. ábra - TLC-n elválasztott levélkivonatok antioxidáns hatású komponenseinek változása.

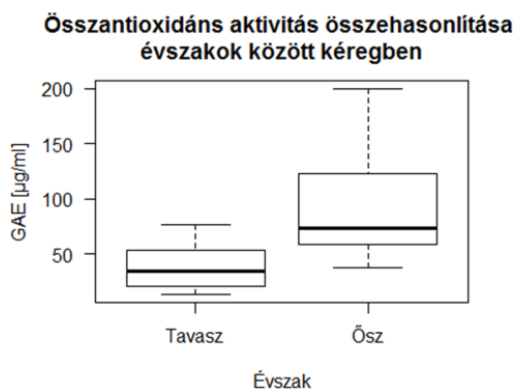
A **25. ábra** változáskövetése mutatja, hogy az összantioxidáns aktivitás az elvált komponensek területintegráltja alapján kéregkivonatokra nézve nő az év során, míg levélre csökken. Ennek magyarázata, hogy tavasszal a növény a tápanyagokat a friss hajtásokba juttatja, elősegítve azok fejlődését és a mihamarabbi lombfakadást, majd virágzást. Ősszel a lombhullató fák, az értékes tápanyagokat és egyéb másodlagos anyagcseretermékeket visszaszívják a levelekből, az akác ezt feltehetőleg a kambiumban és a gyökérben raktározza el, ezzel magyarázható a megnövekedett aktivitás. A video denzitometria **22. ábra** alapján készült.

A változás-követés eredményének alátámasztására az ország több pontjáról, gyűjtött minták kivonatait vizsgáltuk tavasszal és ősszel, is ugyanazt az egyedet mintázva.



26. ábra – TLC-n elválasztott kéregkivonatok antioxidáns hatású komponenseinek összantioxidáns aktivitása ősszel és tavasszal.

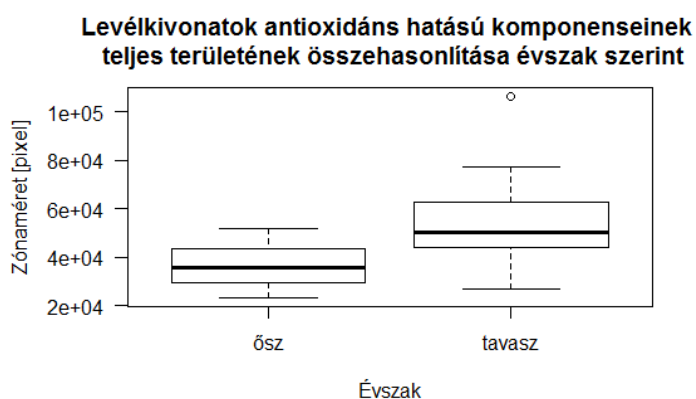
A **26. ábra** látható, hogy a kéregkivonatok összantioxidáns aktivitása hogyan oszlik meg ősszel és tavasszal. Párosított T-próbával vizsgálva az adatokat szignifikáns különbség nem mutatható ki ($n=12$, p -érték = 0.08862, CI: -11955.0671,993.7782), bár a **20. ábrán** jelentősnek tűnő különbségek láthatóak. Az összantioxidáns aktivitást az elválasztott komponensek együttesen adják, közülük csak start közelében maradt anyagok között tapasztaltunk szignifikáns különbséget (p -érték = 0.04266, CI: -1796.88183,-36.88908).



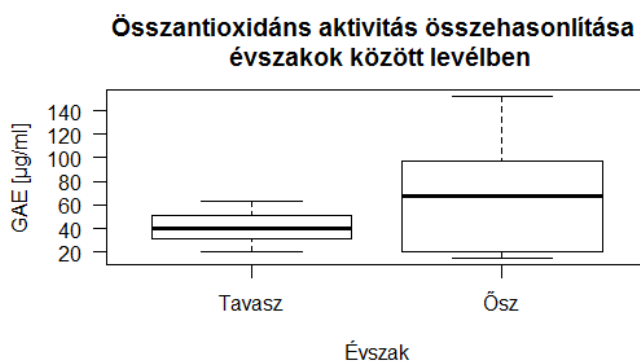
27. ábra – Összantioxidáns aktivitás kéregkivonatokban ősszel és tavasszal.

A **27. ábrán** az ősszel és tavasszal, azonos mintavételi helyről gyűjtött akác kéregkivonatai GAE-egységben megadva jelentős különbséget mutat, melyet a párosított T-próba megerősít, a különbség szignifikáns ($n=12$, p -érték = 0.007289, CI: -72.24326, -14.59311). Figyelembe véve, hogy a mikrolemezes vizsgálatokhoz, ősszel 33,3 mg/ml, tavasszal viszont 50 mg/ml-es kivonatokot használtunk (**3. táblázat**), mert a az őszi minták 50 mg/ml-es kivonatai túl erősnek bizonyultak az adott koncentrációjú DPPH-val szemben, az eredmény nem meglepő. Kijelenthetjük tehát, hogy a fehér akác kérge ősszel nagyobb mennyiségben tartalmaz antioxidánsokat.

Ezen vizsgálatokat levélkivonatokra is elvégeztük (**28. ábra.**). A **23. ábra** video denzitometrálsból kapott eredményekre, a TLC-n elválasztott, antioxidáns aktivitással bíró anyagok között szignifikáns különbség tapasztalható ősze és tavasszal gyűjtött levelek kivonatai között (párosított T-próba: $n=12$, p -érték = 0.006742, CI: 7097.897, 34029.675). Vizsgálva az egyes aktív zónákat, csak az $R_F=0.54$ -es esetében mutatható ki számottevő eltérés (p -érték = 0.003403, CI: 3088.969, 11415.801.)



28. ábra - TLC-n elválasztott levélkivonatok antioxidáns hatású komponenseinek összantioxidáns aktivitása ősze és tavasszal.



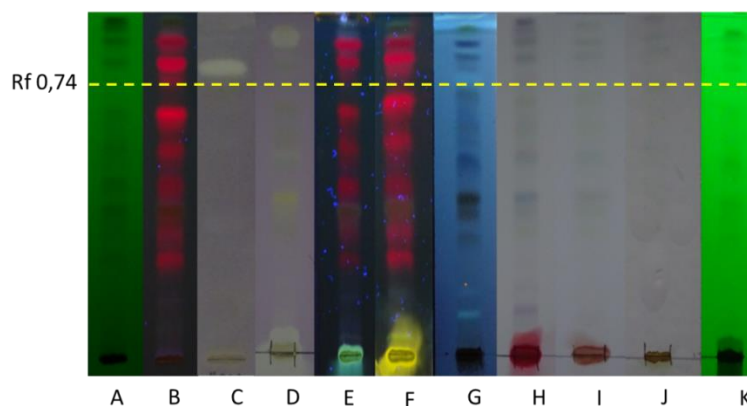
29. ábra – Összantioxidáns aktivitás levélkivonatokban tavasszal és ősze.

Az eredményeket megerősíti a **29. ábra**, mely a GAE-egységben megadott értéket veszi alapul, 5 mg/ml-es kivonatok esetén. Párosított T-próba is szignifikáns különbséget ad ($n=11$, p -érték = 0.03006, CI: -66.330730, -4.160179.), miszerint az ősze gyűjtött akác levél kivonatainak antioxidáns aktivitása ősze nagyobb, mint tavasszal. Felmerült a kérdés, hogy korrelál-e a kéreg vagy a levél összantioxidáns aktivitása a GAE-értékek alapján tavasszal és ősze. Pearson-féle korrelációt alkalmazva azt mondhatjuk, hogy a vizsgált egyedek esetében tavasszal és ősze gyűjtött levélminták kivonatait véve korreláció nem mutatható ki ($n=11$, $cor=-0.06069707$, CI: -0.6373652, 0.5595516.) kéregkivonatoknál gyenge korreláció figyelhető meg az adatokból ($n=11$, $cor=0.2879045$, CI: -0.3770978, 0.7570346).

Kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált fehér akácok összantioxidáns aktivitását alapul véve a tavasszal és ősszel gyűjtött minták között nincs, vagy gyenge a korreláció, tehát attól, hogy egy egyed tavasszal gazdag e bioaktív anyagokban, még nem garancia arra, hogy ősszel is az lesz. Ez érthető, hiszen a növényeket folyamatosan érik különböző hatások, ki vannak téve az időjárásnak és a kártevőknek, melyek megjósolhatatlan változásokat idézhetnek elő az élő szervezetekben.

6.5 Reagensvizsgálatok eredményei

A reagens vizsgálatok célja az volt, hogy a kimutatott antibakteriális és antioxidáns hatású anyagok anyagcsoportját megállapítsuk a levél- és kéregkivonatból. A használt reagenseket a **4. táblázat** foglalja össze. Az alábbi képen (**30. ábra**) a levél reagensvizsgálat eredményei láthatók.

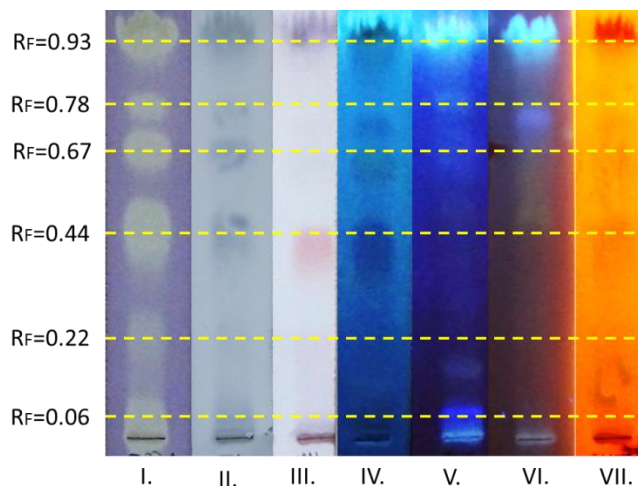


30. ábra - A reagens vizsgálatok eredményei levél kivonatra.

Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;

A - UV 254 nm; B - UV 366 nm; C - *B. subtilis*; D - DPPH; E - AlCl₃; F - NP-PEG; G – Primulin; H - Vanillin-kénsav; I - Ninhidrin; J - Anilin; K - Fast Blue B.

Az antibakteriális (C) és antioxidáns (D) hatású anyagok jellemzésére különféle reagenseket próbáltunk ki. A vanillin-kénsav, mint általános reagens (H) számos aktív anyagot kimutatott, mellyel azonban csak jelenlétük állapítható meg, anyagcsoportjuk nem. A szénhidrátok kimutatását megcélozva (J) csak a startvonalon látható aktivitás. Az F rétegen NP-PEG reagenssel kimutatott néhány flavonoid azonos R_F-en fut az antioxidáns hatást mutató anyagokkal. A G réteg primulinos előhívásra aktív foltot látunk az antibakteriális hatást mutató anyag R_F értékén. Ez arra enged következtetni, hogy az antibakteriális anyag lipofil, pl. zsírsav. A **31. ábra** mutatja a kéregkivonat reagensvizsgálatának eredményét.

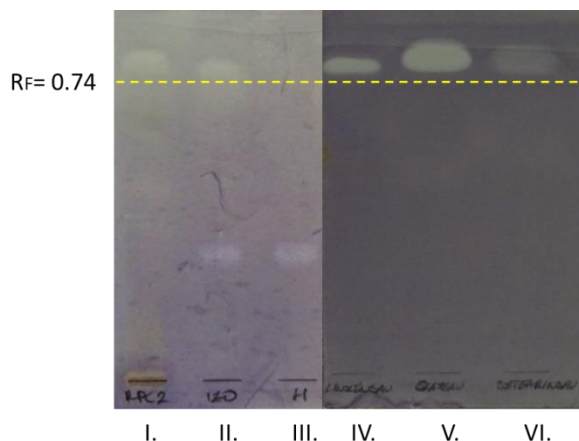


31. ábra – A kéreg reagens vizsgálatok pozitív eredményei.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (40:60 + 5% ecetsav), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄
 I. - DPPH; II. – Folin; III. – Vanillin-kénsav; IV: - Primulin;
 V. – AlCl₃; VI. – NP-PEG; VII. – Rhodamin;

A DPPH-val előhívott, antioxidáns hatású komponensek Folinnal, AlCl₃ és Rhodamin reagensekkel mutathatók ki. Így az aktív anyagaink lehetnek fenoloidok (ezt a FastBlue B nem erősítette meg) vagy flavonoidok. A difenilamin, a ninhidrin és az anilin segítségével nem mutathatók ki. Noha zsírsavat sikerült kimutatnunk a rétegen, ez nem az antioxidáns zónájában van, így nem lehet az.

6.6 Izolálás eredményei

Mivel $R_f=0,74$ -en minden minta produkált antibakteriális hatást, így ebből a zónából végeztük az izolálást a MeOH-os kéregkivonatot használva. Az izolálás után sikeres visszakromatografálással igazoltuk, hogy az aktív anyag jelen van az izolátumban, mely emellett tartalmaz egy műterméket is, mely a háttérben is megtalálható, az eredeti kivonatban azonban nem. Ez nagyvalószínűséggel a ragasztóanyag, ami az izolálás során leoldódik a szilika szemcsékről. Vizsgálatunkat nem befolyásolja, hiszen retenciós ideje eltér az általunk vizsgált anyagétól. A reagens vizsgálatokkal előzetesen megállapítottuk, hogy az antibakteriális anyag lipofil, pl. zsírsav, így három zsírsav standarddal (linolénsav, olajsav és sztearinsav) összehasonlítottuk az izolált anyagunkat (**32. ábra**).



32. ábra – Az aktív anyag meghatározása standardokkal, bioautogram *B. subtilis*-szel.
 Eluens: *n*-hexán:EtAc (1/1, v/v), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;
 I. - kéregkivonat, II. - Izolátum, III. – Háttér, IV. - Linolénsav, V. – Olajsav, VI. – Sztearinsav.

Az **32. ábra I. sávjában** az eredeti minta látható, mely ugyanazon az R_F értéken tartalmazza az antibakteriális anyagot, mint az izolátum (**II.**). Az izolátumban és a háttérben (**III.**) megjelenő folt az izolálás mellékterméke. A retenciós faktorokat figyelembe véve megállapítható, hogy a felvitt standardok gátlózónája egybe esik a minta és izolátum gátlózónájával, így az feltehetően zsírsav. Annak érdekében, hogy egyértelműen igazoljuk, hogy a fehér akácban jelenlévő antibakteriális anyag - valamelyik zsírsav - nagyműszeres vizsgálatokat végeztünk az izolátummal.

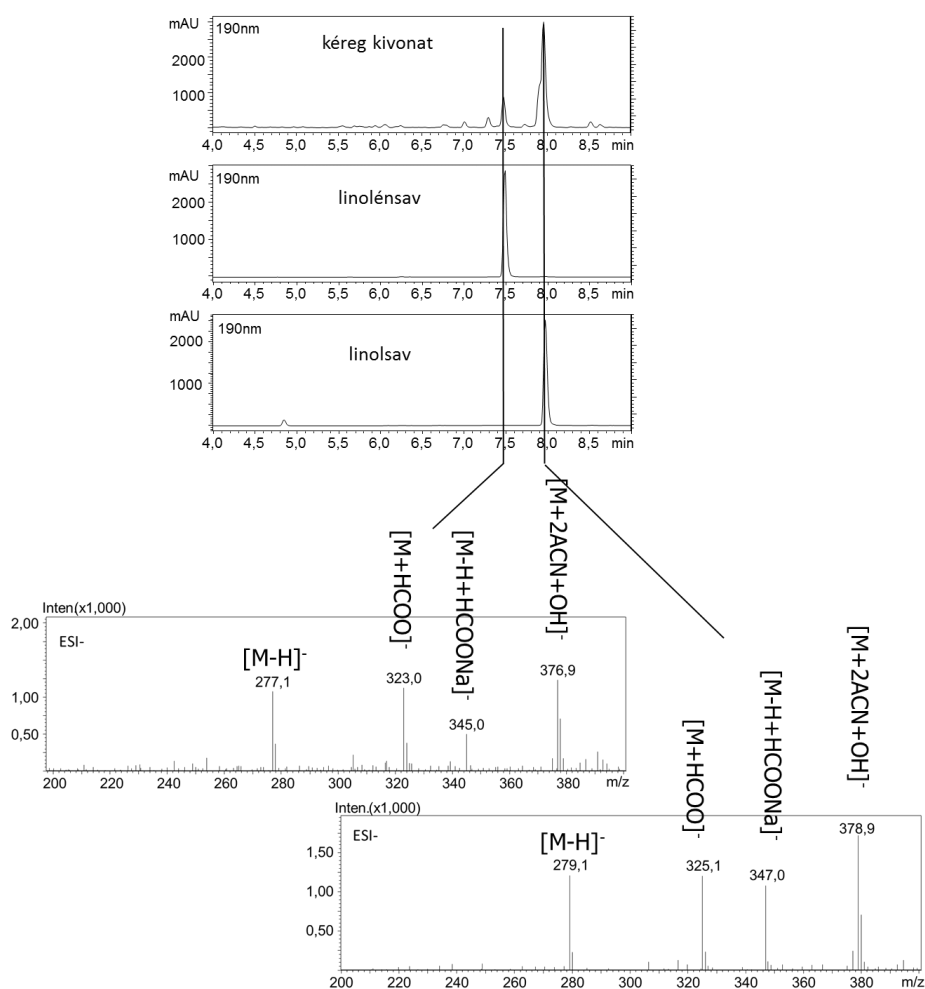
6.7 Nagyműszeres vizsgálatok eredményei

Mind az eredeti kéreg kivonatban, mind az izolátumban 190 nm-en detektáltunk 2 csúcsot 7,48 és 7,97 perc retenciós idővel. A negatív ionizációs módban felvett MS spektrumokban az m/z értékek a következők:

1. anyag (7,48 perc retenciós időnél): **277** $[M-H]^-$, **323** $[M+HCOO]^-$ és **377** $[M+2ACN+OH]^-$;

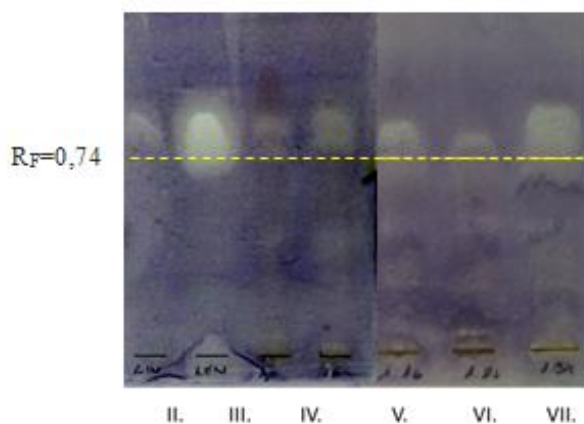
2. anyag (7,97 perc retenciós időnél): **279** $[M-H]^-$, **325** $[M+HCOO]^-$ és **379** $[M+2ACN+OH]^-$.

Ezáltal a várható moláris tömegük 278 illetve 280, amelyek megegyeznek a linolénsav és a linolsav moláris tömegével. A két csúcs retenciós ideje és tömegspektruma meg is egyezett a standard anyagokéval, így ténylegesen azonosítottuk őket (**33. ábra**).



33. ábra - A kéregkivonat antibakteriális anyagainak HPLC-MS vizsgálata. A kivonat, a linolénsav és a linolsav HPLC-UV kromatogramja (190 nm), valamint 7,48 és 7,97 percnél detektálható linolénsav és linolsav MS spektruma (negatív ion módban).

Ezt az eredményt HPLC-MS/MS mérésekkel is sikerült alátámasztani. Korábbi kísérletek alapján a linolsav is antibakteriális hatású, gátlást mutatott mind *B. subtilis*, mind *A. fischeri* baktériumokkal szemben (KRÜZSELYI ÉS MTSAI, 2016). Ahhoz, hogy igazoljuk, hogy a kimutatott antibakteriális hatású anyagok nem egyedi esetek az átfogóan vizsgált veszprémi akácmintában, az ország távolabbi pontjairól tavasszal gyűjtött kéregmintákat is ellenőriztük *B. subtilis*-szel szemben. Az összes vizsgált minta aktív volt (**34. ábra**).

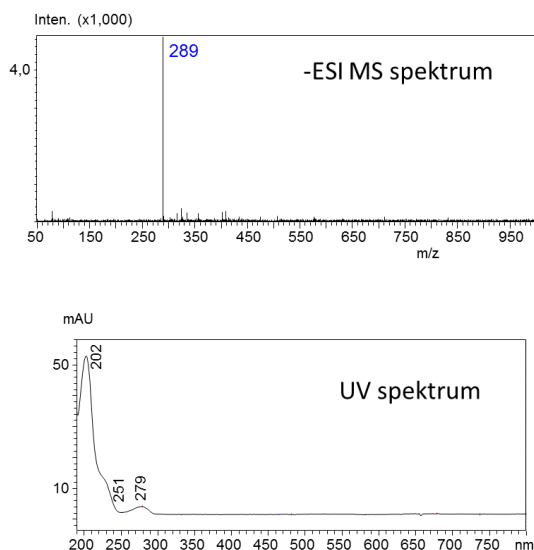


34. ábra – Különböző helyről gyűjtött akácminták antibakteriális hatása.

Eluens: Hexán: EtAc (60:40), Réteg: szilikagél 60 F₂₅₄;

I. – Linolsav, II. – Linolénsav, III. – Leányfalu, IV. – Harta, V. – Balatongyörök, VI. – Szedged, VII. – Nagytevel

Az antioxidáns hatású anyagok közül eddig kettőt, a katechint és az epikatechint sikerült azonosítanunk HPLC-DAD-MS méréssel kapott UV és MS spektrumok alapján (**35. ábra**.) A meghatározásukat alátámasztottuk irodalomban talált módszerrel (VOVKA, 2003) és nagy felbontású MS méréssel. Az utóbbival megkaptuk a pontos tömegüket és az összegképletüket. A többi anyag azonosítása folyamatban van.



35. ábra – A katechin UV és MS spektruma, mely teljesen megegyeznek az epikatechinével.

A mérés során azonosított anyag tömegét réteghez kapcsolt nagy felbontású MS-sel határoztuk meg (TLC-MS Interface segítségével lett összekapcsolva a réteg az MS-sel). A pontos tömegük: katechin 289,07190 és epikatechin 289,07192, így mindkettő összegképlete: $C_{15}H_{13}O_6$.

7. Következtetések

A fehér akácra elvégzett különböző vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy eme tájidegen növény, számos jótékony hatású vegyületet tartalmaz.

A kéreg- és a levélminták különböző oldószeres kivonatait készítettük el és vizsgáltuk antibakteriális és antioxidáns hatású komponenseket keresve. Ehhez kidolgoztunk egy mintaelőkészítési protokollt, a fehér akác vizsgált részeiből általában a MeOH-os extraktumok bizonyultak a legjobb minőségűeknek. A rétegekromatográfiához csatolt biológiai tesztek elvégzéséhez elválasztási módszereket is fejlesztettünk.

Számos baktériummal szemben vizsgáltuk a növényi minták elválasztott komponenseit, s a kromatográfiás rétegen egy karakteres antibakteriális zónát találtunk, melyből nagyműszeres vizsgálattal sikerült két aktív anyagot azonosítani, a linolénsavat és a linolsavat, melyek többszörösen telítetlen zsírsavak. Megfigyeltük, hogy a tavasztól őszi gyűjtött minták, főleg a levél kivonatai eltérő mennyiségű és minőségű gátlóanyagokat tartalmaznak. Mindemellett megvizsgálva az ország különböző pontjairól gyűjtött minták kivonatait, nem találtunk különbséget a leírt anyagok előfordulását tekintve, így kijelenthetjük, hogy a fehér akác általában tartalmaz linolénsavat és linolsavat. Mindkettő esszenciális zsírsav, melyet az emberi szervezet nem képes előállítani, azonban fejlődéséhez és a normális működéséhez elengedhetetlen (BRANEN ÉS MTSAI, 2001). Szakirodalomból ismeretes, hogy a linolénsav és a linolsav több Gram-pozitív baktériummal szemben is antibakteriális hatású, mint például a *Bacillus*, vagy a humán patogén *Micrococcus* és *Staphylococcus*-okkal szemben, de a Gram-negatív *Helicobacter pylori* szaporodását is gátolják (GALBRAITH ÉS MTSAI, 1971; DILIKA ÉS MTSAI, 2000; SUN ÉS MTSAI, 2003). Kimutatták továbbá, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak hiánya a neurodegeneratív betegségek kialakulásában is jelentős szerepet játszik. Az Alzheimer-kór fő kiváltó oka az ideggyulladás, amelyet a zsírsavak gyulladáscsökkentő hatása késleltet, illetve az neuronok apoptotikus elhalását is lassítja (DEVASSY ÉS MTSAI, 2016). Ezek mellett a linolsavat és a linolénsavat az élelmiszeripar is hasznosítja, mint tartósítószer (BRANEN ÉS MTSAI, 2001).

Az azonosított linolsav és linolénsav igazoltan antibakteriális hatású, emellett, mint többszörösen telítetlen, az esszenciális zsírsavak, számos krónikus betegségnek elejét vehetik, mint az inzulin-rezisztencia, a kardiovaszkuláris rendszer megbetegedései vagy a daganatos elváltozások, elsősorban a prosztaták (ANDERSON ÉS MA, 2009).

A fehér akácban antioxidáns hatású anyagok is nagy mennyiségben előfordulnak, a vizsgált növényi részekben az anyagok megoszlása azonban nem azonos. A tavasztól őszi tartó mintázásnak köszönhetően megállapíthatjuk, hogy évszakos eltérés is mutatkozik az aktív vegyületek között. A kéregkivonatok aktivitása ősszel, míg a levélkivonatoké tavasszal erősebb, azonban a kéregminták tavaszi és őszi kivonatainak antioxidáns aktivitása között gyenge, míg levélkivonatok esetében nem figyelhető meg korreláció. Ebből arra következtetünk, hogy a tavaszi aktivitásból nem tudjuk megjósolni az őszi aktivitás alakulását.

Az egyik általunk meghatározott anyag a katechin, további vizsgálatokkal igyekszünk meghatározni a többi aktív anyagok is, hiszen gyógyászati szempontból az antioxidánsok is jelentősek. Alkalmasak számos káros folyamat megelőzésére, mint az oxidatív stressz okozta sejtkárosodások, a szervezetben keletkezett szabadgyökök okozta lipidperoxidáció vagy a motoros neuronok degradációja. Ezek szerepet játszhatnak a stroke, az Alzheimer-kór és a kognitív hanyatlás korai kialakulásában, egyes tanulmányok azonban nem találnak szoros összefüggést a betegségek kialakulása és az antioxidánsok között. (RAO ÉS BALACHANDRAN, 2000; CRICHTON ÉS MTSAI, 2013).

Felhasználhatóságát tekintve bizonyítottuk, hogy a fehér akác gyógyszeripari szempontból számos kiaknázatlan lehetőséget rejt. Az akác bioaktív anyagai további kutatások tárgyát képezhetik a közeljövőben.

8. Összefoglaló

A fehér akác (*Robinia pseudoacacia*) Észak-Amerikában őshonos, rendkívül mutatós fa, mely kiválóan alkalmazkodik a gyengébb minőségű életterekhez. Európa szerte invazív, így állománycsökkentése szükséges. Sokoldalú felhasználhatósága, mely kiterjed a növény minden részére, gazdasági szempontból kiemelten fontos.

Az utóbbi időben a gyógyszerkutatás a természetes alapanyagok és molekulák felé kezdett nyitni, így a fehér akác ideális jelölt lehet, mint nagy tömegben rendelkezésre álló és könnyen hasznosítható gyógyszeripari alapanyag. A fehér akác eddigi vizsgálatai elsősorban a flavonoid származékokat és a toxikus vegyületeket vette górcső alá.

Vizsgálataink célja antioxidáns és antibakteriális hatású anyagok keresése és azok jellemzése, melyhez a kérget, levelet, virágot és termést vizsgáltuk. A kivonatok komponenseit vékonyréteg kromatográfiához (TLC) kapcsolt biológiai tesztekkel vizsgáltuk.

A TLC-vel elválasztott anyagok antibakteriális hatását a rétegen direkt bioautográfiás módszerrel végeztük különböző baktériumok ellen. Ez a módszer gyors, megbízható és alkalmas nagy áteresztőképességű tesztelésre. Az antioxidánsok jelenlétét egy stabil szabadgyök, a DPPH metanolos oldatába való merítéssel teszteltük. Mind az antibakteriális, mind pedig az antioxidáns hatást mutató vegyületek kémiai jellemzését TLC reagensekkel végeztük.

Két kimutatott antibakteriális vegyületet sikeresen izoláltunk a rétegről és nagyműszeres analitikai módszerrel (HPLC-DAD-ESI-MS(/MS)) azonosítottunk, mint a két esszenciális zsírsav, a linolsav és a linolénsav.

Antioxidáns anyagok közül sikerült azonosítanunk a katechint, amely daganatellenes hatásáról ismert.

Megfigyeltünk évszakos változást az aktív anyagok előfordulásában. Mind az antibakteriális, mind az antioxidáns anyagokat vizsgálva levélkivonataink tavasszal nagyobb mennyiségű aktív anyagot tartalmaztak, mint az őszié. Ezzel szemben a kéregkivonatokban tavasztól ősziig egyre nagyobb mennyiségben voltak jelen aktív anyagok.

9. Summary

The black locust tree (*Robinia pseudoacacia*) is native to North America, which adapts astonishingly well to lower quality habitats. It is a species considered invasive all across Europe and is in need of artificial population decrease, but the diverse use of all parts of the plant can be extremely important from an economic view.

Recently pharmaceutical researches have shown great interest in naturally occurring molecules and the black locust tree can be a great target of such researches, since it is widely available and it can be utilized easily. So far studies of the black locust mainly focused on the plants flavonoids and toxic substances.

The aim of our research was to search and characterize antioxidant and antibacterial black locust compounds, for which we used the different parts of the plant (bark, leaves and flowers). The components of the extracts were tested by thin-layer chromatography (TLC) coupled with bioactivity assays. The antibacterial activities of the components separated by TLC were detected in situ in the adsorbent bed by direct bioautography using various bacterial strains. This fast and reliable method is suitable for high-throughput tests. The antioxidants were visualized by dipping the developed layer into methanol solution of the relatively stable radical DPPH. Further characterizations of the compounds were done by TLC reagents.

We successfully isolated two antibacterial compounds from the layer using HPLC-DAD-ESI-MS(/MS), which turned out to be linolenic acid and linoleic acid, two essential fatty acids.

We also identified two antioxidant compounds, epicatechin and catechin that has anticancer effect.

We also examined seasonal fluctuations in the occurrence of bioactive components. Both the antioxidant and antibacterial compounds were present in higher concentrations in the leaves during springtime than in autumn. Contrarily, the amount of the active compounds in the bark extracts was increased from spring to autumn.

10. Irodalomjegyzék

- ANDERSON, B. M., MA, D. W. L.: Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?; *Lipids in Health and Disease*, (2009); 8:33.
- BABOS, M.: A fehér szarvasgomba és a homoki szarvasgomba elterjedése Magyarországon; *Mikológiai közlemények*, (1981); 47-57.
- BOWLING, A. C., BEAL, M. F.: Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases; *Life Sciences*, (1995); 56: 1151-1171.
- CAVADA, B. S., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., NUNES, E. P., SALES, P. V. P., RAMOS R. L., A. M. DE SOUSA, F., CRISOSTOMOT C. V., CALVETE, A. J.: Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke; *Phytochemistry*, (1998); 49: 675-680.
- CRICHTON, G. E., BRYAN, J., MURPHY, K. J.: Dietary antioxidants, cognitive function and dementia - a systematic review; *Plant Foods for Human Nutrition*, (2013); 68:279-292.
- CSISZÁR, Á.: Inváziós növényfajok Magyarországon; (2012); 128-131. Nyugat-magyarországi Egyetem Kiadó, Sopron.
- DEVASSY, J. G., LENG, S., GABBS, M., MONIRUJAMAN, M., AUKEMA, H. M.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and oxylipins in neuroinflammation and management of Alzheimer disease; *Advances in Nutrition*, (2016); 7: 905-916.
- DILIKA, F., BREMNER, P.D., MEYER, J. J. M.: Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites; *Fitoterapia*, (2000); 71: 450-452.
- DUVERGER E., DELMOTTE, F. M.: Purification of lectins from *Robinia pseudoacacia* L. root-tips; *Plant Science*, (1997); 123: 9-18
- EVANS, P.H.: Free radicals in brain metabolism and pathology; *British Medical Bulletin* (1993); 49: 577-587.
- FREUDENBERG, K., HARTMANN, L.: Inhaltstoffe der *Robinia pseudacacia*; *Liebigs Annalen der Chemie Journal*, (1954) 587: 207–212.
- GALBRAITH, H., MILLER, T. B., PATON, A. M., THOMPSON, J. K.: Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with Calcium, Magnesium, Ergocalciferol and Cholesterol; *Journal of Applied Microbiology*, (1971); 34: 803-813.
- HATTORI, S.: Untersuchungen über das Acaciin, ein neues Flavonglykosid aus den Blättern von *Robinia Pseudoacacia*, L.; *Acta Phytochimica*, (1925); 2: 99–112.
- JOYEUX, M. LOBSTEIN, A. ANTON, R. MORTIER, F.: Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and bioflavones from Ginkgo and some flavonoids; *Planta Medica*; (1995) 61: 126–129.
- KENJERIC, D., MANDIC, M.L., PRIMORAC, M., BUBALO, D., PERL, A.: Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia; *Food Chemistry*, (2007); 102: 683–690

KIRÁLY, G.: Új magyar fűvészkönyv, Határozókulcs; (2009); 242. Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósvafő.

KÖZPONTI STATISZTIKAI HIVATAL: Erdők Magyarországon; (2010), <http://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/stattukor/regiok/orsz/erdogazd12.pdf>

KÖZPONTI STATISZTIKAI HIVATAL:A méhészet, méztermelés helyzete és lehetőségei, különös tekintettel Észak-Magyarország megyéire; (2012), <http://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/idoszaki/regiok/meheszet.pdf>

KÖZPONTI STATISZTIKAI HIVATAL: Az erdőgazdálkodás jellemzői; (2013), <https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/gyor/jel/jel31004.pdf>

KRÜZSELYI D., NAGY R., OTT P., MÓRICZ M. Á.: Rapid, bioassay-guided process for the detection and identification of antibacterial Neem oil compounds; *Journal of Chromatographic Science*, (2016); 54: 1084-1089

BRANEN, A. L., DAVIDSON, P. M., SALMINEN, S., THORNGATE, J.: Food Additives (2001); 316. Marcel Dekker INC., New York.

NASIR, H., IQBAL, Z., HIRADATE, S., FUJII, Y.: Allelopathic potential of *Robinia pseudo-acacia* L.; *Journal of Chemical Ecology*, (2005); 31: 2179-2192.

PERKIN, A. G.: The leaves of *Robinia pseudoacacia*; *Journal of the Chemical Society*, (1900); 77: 430–432.

RAO, A.V., BALACHANDRAN, B.: Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases; *Nutritional Neuroscience*, (2002); 5:291–309.

SUN, C. Q., O'CONNOR, C. J., ROBERTON, A. M.: Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*; *Immunology and Medical Microbiology*, (2003); 36: 9-17.

TALAS-OĞRAŞ, T., İPEKÇİ, Z., BAJROVIÇ, K., GÜZÜNKIRMIZI, N.: Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*; *Fitoterapia*, (2005); 76: 67– 72.

TIAN, F., MCLAUGHLIN, J.: Bioactive flavonoids from the black locust tree, *Robinia pseudoacacia*, *Pharmaceutical Biology*, (2000); 38:229–234

TRUCHADO, P., FERRERES, F., BORTOLOTTI, L., SABATINI, A.G., TOMÁS-BARBERÁN, F. A.: Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2008); 56: 8815–8824.

VEITCH, N. C., ELLIOTT, P. C., KITE, G. K., LEWIS, G. P.: Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae); *Phytochemistry*, (2010); 71: 479–486.

VOVKA, I., SIMONOVSKAA, B., ANDRENŠEKA, S., VUORELAB, H., VUORELAC, P.: Rotation planar extraction and rotation planar chromatography of oak (*Quercus robur* L.) bark; *Journal of Chromatography A*, (2003); 991: 267–274.

2., 6. ábra: Krüzselyi Dániel rajza

3., 4. ábra Dr. Móricz Ágnes rajza

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Móricz Ágnesnek, belső konzulensemnek, Dr. Szabó Péternek és Krüzselyi Dánielnek a támogatásért és útmutatásért, hogy időt és energiát nem sajnálva segítségemre voltak a téma kidolgozásában és a diplomadolgozat elkészítésében, továbbá felkészítettek a TDK és OTDK szereplésre.

Köszönöm Dr. Ott Péternek a direkt bioautográfiás vizsgálatoknál nyújtott értékes segítségét, különösen a vizsgálatokhoz szükséges mikroorganizmusok fenntartását és tenyésztését.

Szeretném megköszönni Dr. Alberti Ágnes (SOTE, Farmakognóziai Intézet) segítségét a HPLC-MS/MS mérések elvégzéséért. Külön szeretném megköszönni Édesapámnak, Édesanyámnak, témavezetőmnek és a barátaimnak, hogy közreműködtek az akácminták összegyűjtésében. Továbbá Górnak, Derbáknak, valamint Dr. Lang Zsoltnak a statisztikai elemzésekben nyújtott értékes segítséget.

12. Függelék

1. táblázat – A tavasszal gyűjtött akácok mintavételi helyei. Mintavételi időszak:
2016.05.16- 29.

TAVASZ			
<u>Sorszám</u>	<u>Gyűjtés ideje</u>	<u>Gyűjtés helye</u>	<u>Gyűjtött minta</u>
I.	2016.05.16	Harta	kéreg, levél, virág
II.	2016.05.19	Budapest, VI.	kéreg, levél, virág
III.	2016.05.19	Budapest, Reptér	kéreg, levél, virág
IV.	2016.05.21	Eplény	kéreg, levél, virág
V.	2016.05.21	Kádárta	kéreg, levél, virág
VI.	2016.05.21	Gyulafirátót	kéreg, levél, virág
VII.	2016.05.22	Leányfalu	kéreg, levél, virág
VIII.	2016.05.22	Nagytevel	kéreg, levél, virág
IX.	2016.05.22	Tapolca	kéreg, levél, virág
X.	2016.05.23	Balatongyörök	kéreg, levél, virág
XI.	2016.05.24	Budapest, XII.	kéreg, levél
XII.	2016.05.26	Budapest, III.	kéreg, levél
XIII.	2016.05.27	Szeged	kéreg, levél
XIV.	2016.05.29	Veszprém	kéreg, levél, virág

2. táblázat – Az ősszel gyűjtött akácok mintavételi helyei. Mintavételi időszak: 2016.10.16-29.

Sorszám	Gyűjtés ideje	ŐSZ	
		Gyűjtés helye	Gyűjtött minta
I.	2016.10.23	Balatongyörök	kéreg, levél, termés
II.	2016.10.24	Budapest, IV.	kéreg, levél
III.	2016.10.28	Budapest, XII.	kéreg, levél, termés
IV.	2016.10.26	Budapest, XVI.	kéreg, levél
V.	2016.10.26	Budapest, Reptér	kéreg, levél
VI.	2016.10.23	Csesznek	kéreg, levél
VII.	2016.10.16	Eplény	kéreg, levél
VIII.	2016.10.24	Érd	kéreg, levél
IX.	2016.10.23	Harta	kéreg, levél, termés
X.	2016.10.29	Hete	kéreg, termés
XI.	2016.10.23	Budapest, János-hegy	kéreg, levél
XII.	2016.10.23	Kádárta	kéreg, levél
XIII.	2016.10.23	Kisbér	kéreg, levél
XIV.	2016.10.29	Komárom	kéreg, levél, termés
XV.	2016.10.23	Lenti	kéreg, levél
XVI.	2016.10.16	Nemesvámos	kéreg, levél
XVII.	2016.10.28	Budapest, III.	kéreg, levél, termés
XVIII.	2016.10.23	Réde	kéreg, levél
XIX.	2016.10.23	Szeged	kéreg, levél
XX.	2016.10.16	Székesfehérvár	kéreg, levél
XXI.	2016.10.16	Tapolca	kéreg, levél
XXII.	2016.10.16	Várpalota	kéreg, levél
XXIII.	2016.10.23	Veszprém	kéreg, levél
XXIV.	2016.10.16	Vigántpetend	kéreg, levél

5. táblázat - A nagyműszeres vizsgálatok további paramétereit

Kromatográfias elválasztási paraméterek antibakteriális anyag vizsgálatához

Oszlop	Kinetex C18, 3x100 mm, 2,6 µm szemcseméret, C18 előtétoszloppal és termosztálva 35 °C-ra
Mozgófázis	5% acetonitril 0,05% hangyasavval (<i>A oldószer</i>) és acetonitril 0,05% hangyasavval (<i>B oldószer</i>)
Áramlási sebesség	0,8 ml/perc
Gradiens elúció	0-7 percig 15-90% acetonitril, 7-13 percig 90%, 13-16 percig 15%
Injektált mennyiség	10 µl

Tömegspektrometriás paraméterek

ESI	deszolvatálási hőmérséklet 250 °C; fűtőblokk hőmérséklet 400 °C
N₂ gázáramlás	15 liter/perc
Porlasztó N₂ gáz	1,5 liter/perc
Scan mód	

Kromatográfias elválasztási paraméterek antioxidáns anyagok vizsgálatához

Oszlop	Kinetex C18, 3x100 mm, 2,6 µm szemcseméret, C18 előtétoszloppal és termosztálva 35 °C-ra
Mozgófázis	5% acetonitril 0,05% hangyasavval (<i>A oldószer</i>) és acetonitril 0,05% hangyasavval (<i>B oldószer</i>)
Áramlási sebesség	0,6 ml/perc
Gradiens elúció	0-7 percig 0% B, 7-9 percig 0-20%, 9-20 percig 20-90%, 20-25 percig 90%, 25,1-30 percig 100%
Injektált mennyiség	5 µl

Tömegspektrometriás paraméterek

ESI	deszolvatálási hőmérséklet 250 °C; fűtőblokk hőmérséklet 400 °C
N₂ gázáramlás	15 liter/perc
Porlasztó N₂ gáz	1,5 liter/perc
Scan mód	

6. táblázat – Az év során gyűjtött akácminták mintavételi időpontjai. Kiválasztott egyed GPS- koordinátái: 47.102411, 17.935618.

ÉVES		
<u>Sorszám</u>	<u>Gyűjtés ideje</u>	<u>Gyűjtött minta</u>
I.	2016.04.17	kéreg, levél
II.	2016.05.01	kéreg, levél
III.	2016.05.15	kéreg, levél
IV.	2016.05.29	kéreg, levél
V.	2016.06.12	kéreg, levél
VI.	2016.06.26	levél
VII.	2016.07.10	kéreg, levél
VIII.	2016.07.24	kéreg, levél
IX.	2016.08.07	kéreg, levél
X.	2016.08.21	kéreg, levél
XI.	2016.09.04	kéreg, levél
XII.	2016.09.18	kéreg, levél
XIII.	2016.10.02	kéreg, levél
XIV.	2016.10.13	kéreg, levél
XV.	2016.10.23	kéreg, levél

7. táblázat – Tavasszal és ősszel is gyűjtött minták gyűjtési paraméterei

TAVASZI- ŐSZI MINTAVÉTEL

Sorszám	Gyűjtés ideje tavasszal	Gyűjtés ideje ősszel	Gyűjtés helye
I.	2016.05.21	2016.10.16	Eplény
II.	2016.05.21	2016.10.23	Kádárta
III.	2016.05.16	2016.10.23	Harta
IV.	2016.05.24	2016.10.28	Budapest, XII.
V.	2016.05.23	2016.10.23	Balatongyörök
VI.	2016.05.27	2016.10.23	Szeged
VII.	2016.05.26	2016.10.28	Budapest, III.
VIII.	2016.05.19	2016.10.26	Budapest, Reptér
IX.	2016.05.19	2016.10.26	Budapest XVI.
X.	2016.05.22	2016.10.16	Tapolca
XI.	2016.05.29	2016.10.23	Veszprém