



A (+)-katechin kinyerése tölgyek kérgéből*

MAKK Ádám Nándor¹, HOFMANN Tamás¹, RÉTFALVI Tamás¹

¹ NymE EMK, Kémiai Intézet

Kivonat

A tölgyek hazánkban elterjedt fafajok, erdeink közel 30%-át teszik ki, faanyagukat széles körben és számos célra használják, kérgük azonban ipari szempontból kevésbé értékes alapanyag, mellékterméknek, hulladéknak minősül. A nagy mennyiségben rendelkezésre álló, de eddig szűk körben felhasznált tölgykéreg jelentős mennyiségben tartalmaz értékes extraktanyagokat, (+)-katechin tartalma 1% körüli. A (+)-katechint élelmiszeripari, gyógyászati és számos egyéb ipari célokra is alkalmazzák, jelentős anyagi értéket képvisel. Jelen kutatás célja a főbb hazai tölgyfajok kérgében megtalálható (+)-katechin tartalmak összehasonlító vizsgálata, valamint költség- és időhatékony kivonási és tisztítási eljárások kidolgozása volt. Megállapítottuk, hogy a legmagasabb koncentrációk a szlavón és kocsányos tölgyek kérgében mutathatók ki: 8-12 mg (+)-katechin/g száraz kéreg (0,8-1,2 tömeg%), a mikrohullámú extrakció és tartósítás a leginkább idő- és költséghatékony mintafeldolgozási módszerek. További vizsgálatokat igényel az extrahált kéregdaralmány hasznosítása.

Kulcsszavak: (+)-katechin, tölgykéreg, vékonyréteg kromatográfia, antioxidáns, polifenol

Isolation of (+)-catechin from the bark of different oak species

Abstract

Oak species are widely distributed and industrially important. They make up about 30% of the forest stands in Hungary. The bark of trees represents an industrially less valuable material. In fact it is mostly regarded as a by-product or waste originating from wood processing. Oak bark is a raw material available in large amounts, and it does not have an industrial application yet. Besides it contains valuable extractives. Its (+)-catechin content is about 1%. (+)-Catechin is widely used in food-, pharmaceutical, and other industrial products and applications, hence it has considerable economic value. The aim of this research was the comparative investigation of the (+)-catechin content present in the bark of domestic oak species and the study and development of feasible (time- and cost effective) strategies for the sample clean-up, for the extraction and for the isolation.

Key words: (+)-catechin, oak bark, thin-layer chromatography, antioxidant, polyphenol

Bevezetés

Az erdei fák kérgé iparilag legtöbbször értéktelen anyagnak, egyfajta hulladéknak minősül, mely jelentős és hosszú ideje fennálló problémát és megoldandó feladatot jelent a faipar számára (Harkin és mtsai

1971, Molnár 2004). Magas hamutartalma miatt energetikai célra nehezen alkalmazható nagy mennyiségben (Németh 1997, Molnár 2004). A belőle készített faipari termékek (pl. forgácslapok, hőszigetelő borítások) piaca nem elég széles körű (McKeever 2002).

*A kutatás a Talentum – Hallgatói tehetséggondozás feltételrendszerének fejlesztése a Nyugat-magyarországi Egyetemen c. TÁMOP 4.2.2.B-10/1-2010-0018 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

This research - as a part of the Development of Student Talent Fostering at WHU, TAMOP 4.2.2. B-10/1-2010-0018 project - was sponsored by the EU/European Social Foundation. The financial support is gratefully acknowledged.

A kéreg kémiai összetétele jelentősen eltér a faanyagától, elsősorban magasabb járulékos (extrakt) anyag és szeretlen anyag, valamint alacsonyabb cellulóz tartalma miatt (Németh 1997). A különböző fakéreg kivonatának jótékony élettani hatását már az ókortól ismerték (Vainio és mtsai 1997, Bellakhdar 1997). Napjainkban is számos példa létezik már a fakéregben található extraktanyagok hasznosítására az élelmiszeripar, a gyógyászat és a faipar terén (Németh 1994, Packer és mtsai 1999, Jennewein és mtsai 2001, Wen-Jau és mtsai 2006, Harkin és mtsai 1971, Janceva és mtsai 2011, Berahou és mtsai 2011). Ennek ellenére a fakéreg komplex hasznosítása még mindig gyerekcipőben jár (Sen és mtsai 2010), melynek fő okai a magas szállítási, tárolási és aprítási költségek, valamint a nagy mennyiségek és a szűk körű, speciális alkalmazási lehetőségek (Allison 1971, McKeever 2002). Külön problémát jelent, hogy a fakéreg összetétele fajfüggő, a megfelelő hasznosíthatósághoz külön kellene gyűjteni a fűrésztelepeken az egyes fajok kérgeit, ami újabb költségeket vet fel (Allison 1971). A nyersanyagárak folyamatos emelkedése, a megújuló energiaforrások előtérbe helyeződése és jobb hasznosíthatóságukat irányzó társadalmi és környezetvédelmi elvárások jelentős hajtóerőt jelentenek a kéreg komplex hasznosítására. A fakéreg, mint nyersanyag és alapanyag még tartogat lehetőségeket.

A tölgyek Magyarország legjelentősebb fafajai közé tartoznak, mind az általuk elfoglalt erdőterület, mind az általuk képviselt érték szempontjából (1. táblázat). A tölgyek ipari feldolgozása során jelentős mennyiségű kéreghulladék keletkezik, melynek megfelelő, hatékony és komplex ipari hasznosítása mind

1. táblázat Magyarországi erdők fafajok szerinti megoszlása (http://www.mgszh.hu/erdeszeti_cd/htm/tablajegyzek.html)

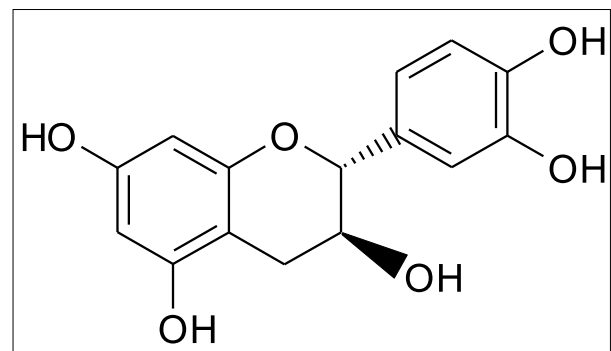
Table 1 The proportion of wood species in Hungarian forests (http://www.mgszh.hu/erdeszeti_cd/htm/tablajegyzek.html)

Fafaj(csoport)ok	2004. I. 1.	2005. I. 1.
	terület %	
Tölgy	20,5	20,7
Cser	11,4	11,2
Bükk	6,0	6,0
Gyertyán	5,5	5,4
Akác	22,6	22,9
Egyéb kemény lombos	4,8	5,0
Nyár	10,3	10,3
Egyéb lágy lombos	5,6	5,6
Fenyő	13,3	12,9
Összesen	100,0	100,0

a mai napig nem megoldott kérdés (Molnár 2004). Kérgük jelentős mennyiségben (6–20%) tartalmaz kivonható extraktanyagokat, elsősorban tanninokat, flavonoidokat, melyek erős gyökfogyó és antioxidáns hatásuk révén védelmet jelentenek vírusos és bakteriális fertőzések esetében (Vovk és mtsai 2003, Andrenek és mtsai 2004). A tölgykéreg-kivonatokat évszázadok óta használja a népi gyógyászat gyulladáscsökkentő hatásuk miatt elsősorban emésztőrendszeri bántalmakra, torokfertőtlenítésre, illetve külső sebek gyógyítására (Bellakhdar 1997, Berahou és mtsai 2007). A tölgykéreg legjellemzőbb kémiai hasznosítása a múltban a tanninok kivonása volt, melyet nem csak bőrcserzésre lehet használni, hanem megfelelő előkészítés után faipari ragasztók, műgyanták előállítására is (Janceva és mtsai 2011). A szintetikus tanninok megjelenésével (1950–60-as évek) a tölgykéreg ez irányú ipari hasznosítása megszűnt, az egyetlen növényi tanninforrás napjainkra szinte kizárólag a Schinopsis fajok kérge és fája maradt (Janceva és mtsai 2011). A tölgykéreg egyéb kémiai hasznosítására a legújabb szakirodalomban is találunk példát, de ezek nem elég széles körűek és csak speciális vegyületeket, vegyületcsoportokat ölelnek fel (Berahou és mtsai 2007, Pinto és mtsai 2009, Sen és mtsai 2010). Ki kell emelnünk azonban, hogy az alapanyag nagy mennyisége miatt a kéreg, mint „hulladék”, „melléktermék” komplex hasznosítására van szükség, mely faipari illetve környezetvédelmi problémákat is megoldhat.

A tölgyek kérgének egyik azonosított, számos kedvező élettani hatással (antioxidáns és gyökfogyó hatás, gyulladáscsökkentő, antibakteriális, antitumor hatás) rendelkező és ipari alkalmazások szempontból is jelentős polifenol komponense a (+)-katechin (1. ábra), mely a flavan-3-olok csoportjába tartozó vegyület (Vovk és mtsai 2003).

A vegyületet többek között alkalmazzák a gyógyá-



1. ábra A (+)-katechin szerkezete

Figure 1 The structure of (+)-catechin



szatban, klinikai kísérletekben (Reimann és mtsai 1977; Nath és mtsai 2012), sőt légkondicionáló berendezések szűrőrendszerében (Takano és mtsai 2008) is. A (+)-katechinhez köthető kutatási, fejlesztési és alkalmazási tevékenységek megkívánják a (+)-katechin megfelelő tisztaságú előállítását. Ez elsősorban növényi szövetekből (pl. zöld tea, borsos keserűfű *Polygonum hydropiper* L., stb.) való izolálással és tisztítással történik (Ono és mtsai 1997). A nagy mennyiségben rendelkezésre álló tölgykéreg-alapanyagból költség- és időhatékony eljárással kinyerhető a (+)-katechin, másrészt az extrakció után visszamaradt kéreg energetikailag is előnyösebben hasznosítható (alacsonyabb hamu- és extraktanyag-tartalom, kisebb szemcseméret) különös tekintettel a hőenergia és a biogáz területeken. A tölgykéreg ilyen irányú alternatív felhasználása összetett és multidiszciplináris vizsgálatokat igényel.

Jelen kutatás célkitűzései a következők voltak:

- A különböző tölgyfajok kérgében megtalálható (+)-katechin tartalmak összehasonlító vizsgálata.
- Módszer kidolgozása a kéreg előkészítésére és feldolgozására, tartósítására.
- Különböző extrakciós módszerek összehasonlítása, hogy megtaláljuk a leginkább idő- és költséghatékony eljárást a (+)-katechin kivonására.
- Eljárás kidolgozása a (+)-katechin nagy mennyiségben történő izolálására és tisztítására.

Anyagok és módszerek

Mintavétel és előkészítés

A minták származásai helye: Szárhalmi erdő, Sopron 56 A és 52 A, B erdőrészetek, cseres kocsánytalan tölgyes. A törzsek üzemterv szerinti kora az 56 A erdőrészletben 38 év, az 52 A-ban 19 év, az 52 B-ben 23 év. Átmérőjük 7–19 cm között változott. A törzsekről a kérget a töréstől kb. 1,5 méter magasságig hántottuk le. Törzsenként a 800–1000 g kéreg leválasztása fejszével történt. Ez egyaránt tartalmazta a háncsot és a héjkérget is. A vizsgált fajok illetve alfajok a következők voltak:

- vöröstölgy (*Quercus rubra* L.)
- csertölgy (*Quercus cerris* L.)
- kocsányos tölgy (*Quercus robur* L.)
- valódi kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea* L.)
- dárdáskaréjú kocsánytalan tölgy (*Quercus dalechampii* L.)
- erdélyi kocsánytalan tölgy (*Quercus polycarpa* L.)
- szlavón tölgy (*Quercus robur* ssp. *slavonica* L.)

A fajok illetve alfajok azonosítása a levelek illetve a kéreg alapján történt meg. Mindegyik fajból/alfajból egy-egy törzset vizsgáltunk.

Enzim inaktiválás

Előzetes kísérleteink során megfigyeltük, hogy a lehántott kéreg gyorsan megbarnul és a benne mérhető (+)-katechin tartalom az enzimátikus oxidációs folyamatok következtében gyorsan csökken. Először tehát olyan tartósítási eljárásokat kellett kidolgozni, melyek segítségével a leghatékonyabban lehet inaktiválni az enzimeket, ezáltal megőrizni a feldolgozott és tárolt kéreg (+)-katechin tartalmát. Négy homogén frakciót készítettünk (250–250 g) a törzsenként lehántott kéregmintákból.

A törzsenkénti négy frakciót a következőképpen kezeltük:

K – kezeletlen (250 g kéreg, azonnal feldolgozva)

M – mikrohullámú inaktiválás (250 g kéreg, 3 percig, 700 W teljesítménnyel kezelve)

S – termikus inaktiválás szárítószekrényben (250 g kéreg, 15 percig, 105–110 °C-on)

U – UV-lámpa segítségével történő inaktiválás (250 g kéreg, 10 perc, UV, higanygőz lámpa)

A frakciók kezelés utáni feldarabolása kisebb darabokra szalagfűrészsel történt, majd a minták további aprítását kávédarálóval végeztük. A darálmányt ezután szitáltuk. A kísérletekben az 1 mm alatti szemcseméretű frakciót vizsgáltuk.

Enzimaktivitás mérés

Extrakció: 0,6 g minta bemérése mindegyik frakcióból + 15 ml foszfátpuffer (pH=6). Extrakció: 10 percig keverés, majd egy napig tárolás a hűtőben, utána keverés 10 percig és végül a centrifugálás (1000/perc, 4 perc) történt. Mérés a felüliszóából. A POD (peroxidáz enzim) aktivitás meghatározása a Shannon és mtsai (1966) által leírt módszer alapján történt.

A PPO (polifenol oxidáz enzim) aktivitás meghatározása a Hofmann és mtsai (2002) által leírt módszer alapján történt.

Extrakció

A minták (+)-katechin tartalmának meghatározásához: extrahálószer 80%-os vizes etanol oldat. 0,1–0,2 g mintát 3 órán keresztül homogenizáltunk 25 ml extrahálószerben, majd az extraktumot Whatman GF/A üvegszálás szűrőpapíron szűrtük. Nagy mennyiségű kioldás vizsgálatához (3 g kéreg/100 ml extrahálószer): extrahálószer 80%-os vizes etanol oldat.

- Szakasos oldószeres extrakció 3 szakaszban (3x2 óra) 40 + 30 + 30 ml extrahálószerrel. Extraktumok egyesítése és 100 ml végtérfo-gatra töltése.
- Soxhlet-extrakció 6 órán keresztül.
- Szakasos mikrohullámú extrakció 3 szakaszban (40 + 30 + 30 ml extrahálószerrel). Egy szakasz 5 kezelési cikusból állt. 1 kezelési ciklus: 10 másodperc mikrohullámú kezelés, 40 másodperc hűtés.

Töményítés

Az extraktumokból 15 ml-t rotációs bepárlón (Büchi Rotavapor) 40 °C-on szárazra pároltunk. A bepárlási maradékot 1 ml etanolba oldottuk vissza és az így kapott oldatot használtuk a mennyiségi vizsgálatokhoz.

Mennyiségi kiértékelés

A minták (+)-katechin tartalmának meghatározása vékonyréteg kromatográfiás elválasztással majd az azt követő előhívással és denzitometriás kiértékeléssel történt.

- Mintafelvétel: CAMAG Linomat 5 automatizált mintafelvívő egységgel, 3 párhuzamos felvétel mintánként azonos réteglapra.
- Kromatográfiás elválasztás körülményei: állófázis: HPTLC szilikagél réteg; mozgófázis: 9:1 diizopropil-éter: hangyasav; kifejlesztés: fel szálló kifejlesztés, telítetlen gőzterű kamrában (CAMAG twin trough chamber); kifejlesztési távolság: 6 cm
- Előhívás: lefújás vanillin-foszforsav reagenssel (Stahl 1962), majd melegítés 120 °C-on 15 percig (Desaga Plateheater). A (+)-katechin vörös foltként jelenik meg.
- Denzitometriás mennyiségi kiértékelés: CAMAG TLC Scanner 3 pásztázó denzitométer segítségével, abszorpciós üzemmódban 480 nm-en, 5 pontos polinomiális kalibráció alkalmazásával.

A (+)-katechin preparatív elválasztása

350 gramm kérget mikrohullámú kezeléssel (5 perc, 700 Watt) inaktívtunk, majd felapritás után 1500 ml 7:3 arányú acetón-víz eleggyel extraháltuk mágneses keverőn 3 órán keresztül. Az extraktumból rotációs bepárló segítségével eltávolítottuk az acetont és a vizes fázist 2x500 ml etil-acetáttal extraháltuk, ezáltal a (+)-katechin tartalom legnagyobb része az etil-acetátos fázisba került. Az etil-acetátos fázist ezután rotációs be-

párlóval szárazra pároltuk 40 °C-on és a maradékot 5 ml etil-alkoholba oldottuk fel. A preparatív elválasztáshoz erdeifenyő kéregre kidolgozott módszerét adaptáltuk (Jerez és mtsai 2007). Az állófázis Sephadex LH-20 gél volt, melyből egy 1x8 cm méretű üvegoszlopot töltöttünk meg. A töményített extraktumból 0,3 ml-t vittünk fel az oszlopra, majd rendre 20 ml 60:40 arányú metanol-víz, 20 ml 75:15 arányú metanol-víz majd 90:10 arányú metanol-víz elegyekkel eluáltuk a komponenseket az oszlopról. A megvalósítható áramlási sebesség 0,6 ml/perc volt. Az oszlopról 2 ml-enként gyűjtöttük a frakciókat (összesen 30-at).

Szárazanyagtartalom meghatározása

A szárazanyag tartalom meghatározása 3-4 g famintha 105 °C-on tömegállandóságig történő szárításával történt.

Eredmények és értékelés

Mintatartósítás, enzimaktiválás

Előzetes kísérleteink során megfigyeltük, hogy a lehántott kéreg gyorsan megbarnul és a benne mérhető (+)-katechin tartalom az oxidációs folyamatok következtében gyorsan csökken. Először tehát olyan tartósítási eljárásokat kellett kidolgozni, melyek segítségével a leghatékonyabban meg lehet tartani a feldolgozott és tárolt kéreg (+)-katechin tartalmát.

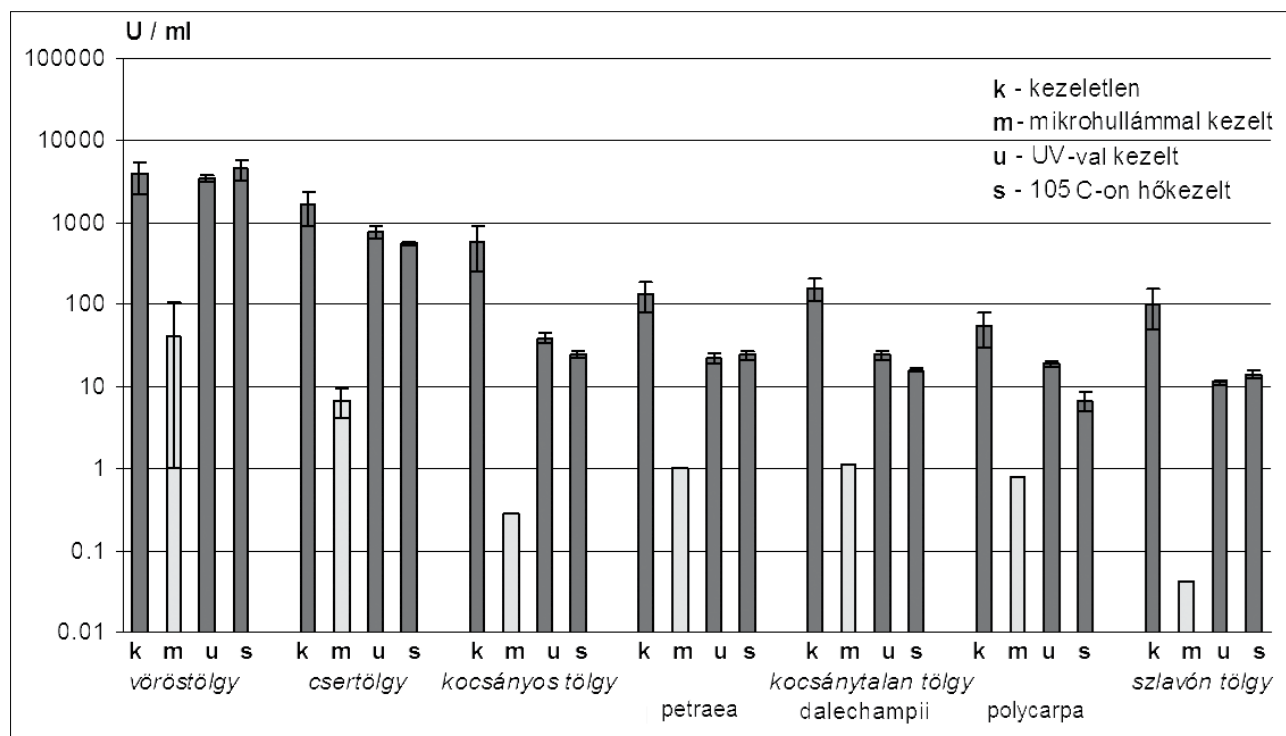
A lehántott kéregben a (+)-katechin gyors oxidációjáért az oxidoreduktáz-enzimek (elsősorban peroxidáz- és polifenol-oxidáz enzimek) felelősek, ezért a kéreg tartósításhoz ezeket az enzimeket inaktíválni kell. A szakirodalmakat (Chutintrasri és Noomhorm 2004, Gui és mtsai 2005, Ümit Ünal 2005, Noci és mtsai 2007, Yuanyuan és mtsai 2007) áttanulmányozva három módszert választottunk ki, melyeket az élelmiszeriparban is rutinszerűen alkalmaznak: a mikrohullámú kezelés, az ultrabolya sugárzással történő kezelés, és a szárítószekrényben történő hőkezelés. Ezen módszereket a frissen lehántolt kérgeken azonnal elvégeztük. A kezelés után daráltuk a mintákat, mely technológiai szempontból is kedvezőbbnek bizonyult, mivel a kéreg a kezelése során sokat veszített nedvességtartalmából, így könnyebbé vált a darálás folyamata.

A tartósítási eljárások eredményességét a kezelés után a kéregben visszamaradó polifenol-oxidáz-, és peroxidáz enzimek aktivitásából lehet felmérni. A három vizsgált módszer eredményeit az 2. és 3. ábrák összegzik. Megállapítható, hogy az UV-min-

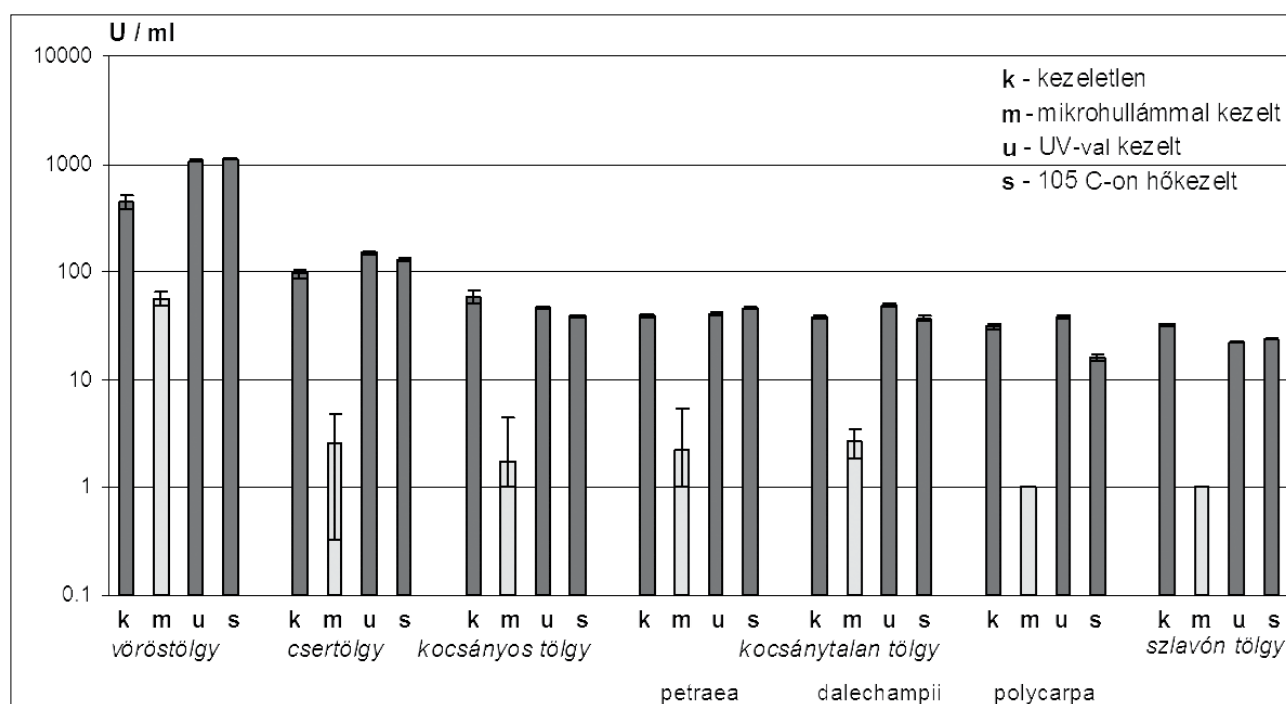
táiban és a hőkezelt mintákban az enzimaktivitás csak kis mértékben csökken a kezeletlen mintához képest, míg a mikrohullámú kezelés során igen nagymértékű (90–99%-os) POD és PPO aktivitás csökkenést tudunk elérni. Ez a módszer alkalmas tehát legjobban a vizsgált enzimek inaktíválására.

A (+)-katechin koncentráció időbeli változása a tartósított mintákban

A (+)-katechin tartalom időbeli vizsgálatára azért volt szükség, hogy lássuk, mennyire tartják meg a tartósított minták a (+)-katechin tartalmukat, illetve a tartósítási eljárások közt fellelhető-e különbség. A vizsgált időintervallum 56 nap volt. A



2. ábra A polifenol-oxidáz enzim aktivitás értékei különböző kezelések hatására. A hibásávok 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek
Figure 2 Polyphenol-oxidase enzyme activities with different treatments. The error bars represent 95% confidence intervals



3. ábra A peroxidáz enzim aktivitás értékei különböző kezelések hatására. A hibásávok 95%-os konfidencia intervallumot jelölnek
Figure 3 Peroxidase enzyme activities with different treatments. The error bars represent 95% confidence intervals

(+)-katechin koncentrációkat a 0., a 7., a 28., és az 56. napon mértük.

A 4. ábrán látható, hogy a kezeletlen kéregmintákban a kezdeti (+)-katechin koncentráció igen eltérő, a legmagasabb a kocsányos, illetve szlavón tölgyek kérgében volt mérhető. Az idővel tapasztalható mennyiségi csökkenés igen gyors. A legjelentősebb mértékű koncentráció csökkenés a minta lehántását és aprítását követő első héten megy végbe. Figyelemre méltó a erdélyi kocsánytalan tölgy (*Quercus polycarpa*) igen alacsony értéke. További, nagy mintaszámon elvégzett vizsgálatokra van szükség, hogy megállapítsuk, hogy az alacsony koncentráció ténylegesen a faj jellemző sajátja. Megállapítható, hogy a két legmagasabb (+)-katechin koncentrációjú minta a kocsányos tölgyé és a szlavón tölgyé. Ezen két minta segítségével kerül bemutatásra, hogy ugyanazon minta esetén mekkora különbségek mutathatók ki a tartósítási módszerek között. Az 5. és 6. ábrák alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a vizsgált minták esetén a leghatékonyabb tartósítási módszer a mikrohullámmal való kezelés, mivel megtartja a minta kezdeti magas koncentrációját és időben csak lassan és keveset csökken a (+)-katechin tartalom.

Az extrakciós módszerek összehasonlítása

A vizsgálatok következő szakasza arra irányult, hogy milyen módszerekkel célszerű a kéregből a leggyorsabban és a leghatékonyabban a legnagyobb mennyiségű (+)-katechint kivonni. A szakirodalmak (US Patent 20030157216, Gao és Liu 2005, Jerez és mtsai 2007) alapján kiválasztottunk három extrakciós eljárást (lásd: Anyagok és módszerek).

Az extrakciós eljárásokat nagy mennyiségű mintákon hasonlítottuk össze, mindegyik eljárásban 3 g famintát 100 ml extrahálószerrel kezeltük.

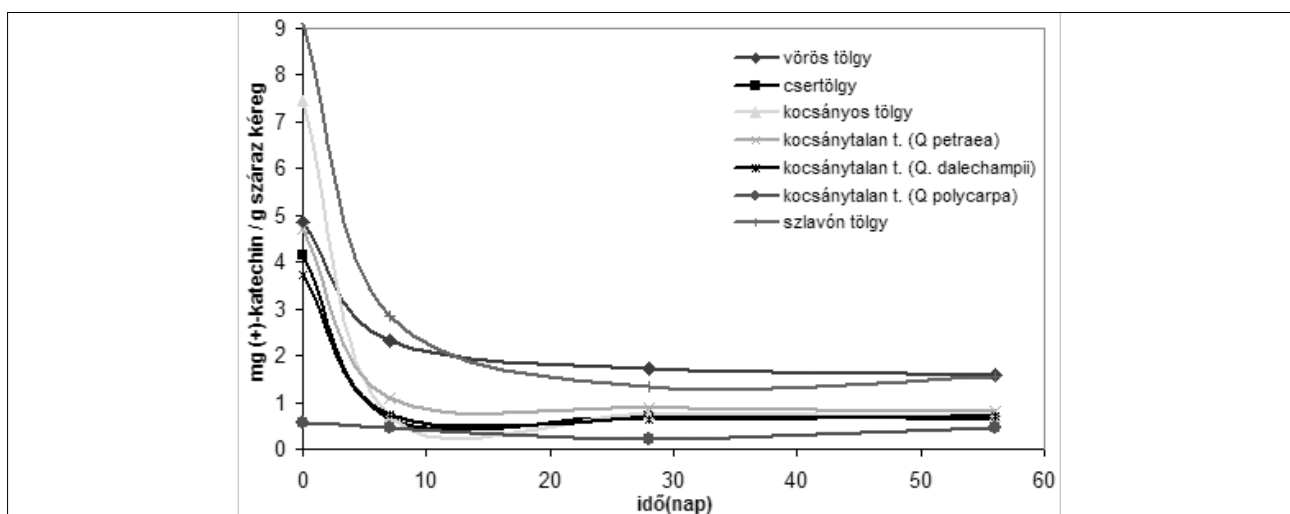
A 7. ábrán az extrakció eredményei láthatók. A mágneses keverőn végzett kivonás 6 óráig, a mikrohullámú 12,5 percig, a Soxhlet-extrakció 7 óráig tartott. A mikrohullámú extrakció 12,5 perc alatt hozott ki közel azonos mennyiséget, mint a másik két extrakció hosszú órák alatt.

Összességében a mikrohullámú extrakció lényegesen – mintegy 40-50-szer – gyorsabb, mint a másik két módszer, ennek következtében idő- és költség-hatékonyabb is (8. ábra, 2. táblázat).

A (+)-katechin preparatív elválasztása

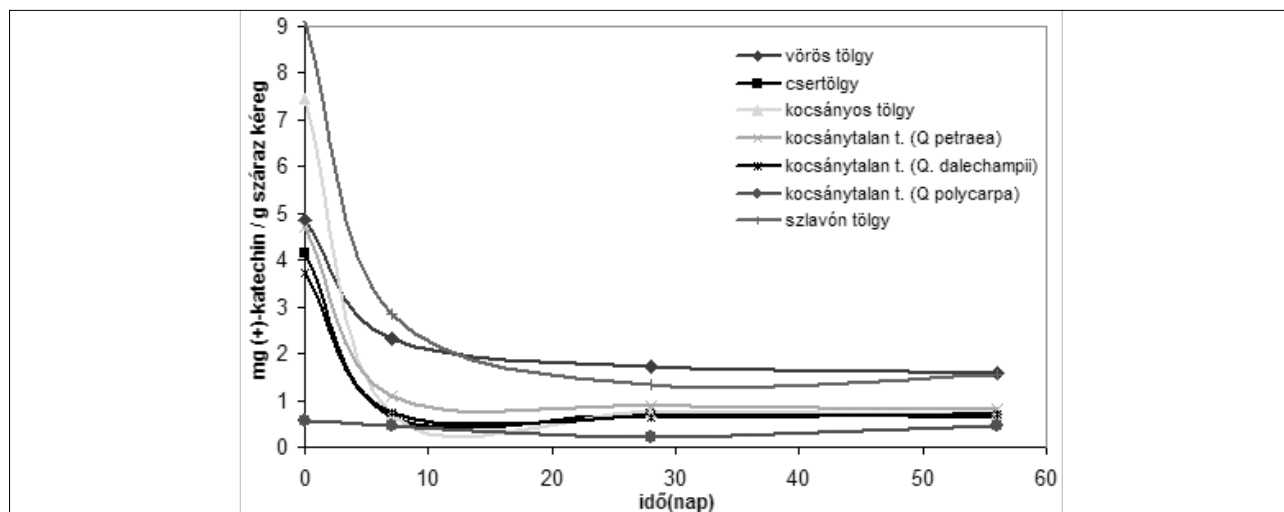
A mintaelőkészítési és extrakciós módszerek optimalizálása után a célunk olyan módszer kidolgozása volt, mely alkalmas (+)-katechin nagy mennyiségben történő izolálására és nagy tisztaságban történő előállítására tölgykéregből. Ez a szakirodalomban már meglévő módszer (Jerez és mtsai 2007) adaptálásával történt. A preparatív elválasztás során 2 ml-enként gyűjtöttünk frakciókat, összesen harmincat. A frakció összetételének vizsgálata vékony réteg kromatográfiás elválasztással történt. A 9. ábrán megfigyelhető, hogy a (+)-katechin legnagyobb mennyiségben a 10-13-as frakciókban volt megtalálható, a legmagasabb koncentráció a 11-es frakcióban figyelhető meg.

A preparatív elválasztás eredménye egy tisztított frakció, melynek tisztasága jellemzi az elválasztás eredményességét. Ezért a (+)-katechint legnagyobb koncentrációban tartalmazó 11-es frakció tisztaságát vizsgálatuk. Mivel a vanillin-foszforsavas eljárás



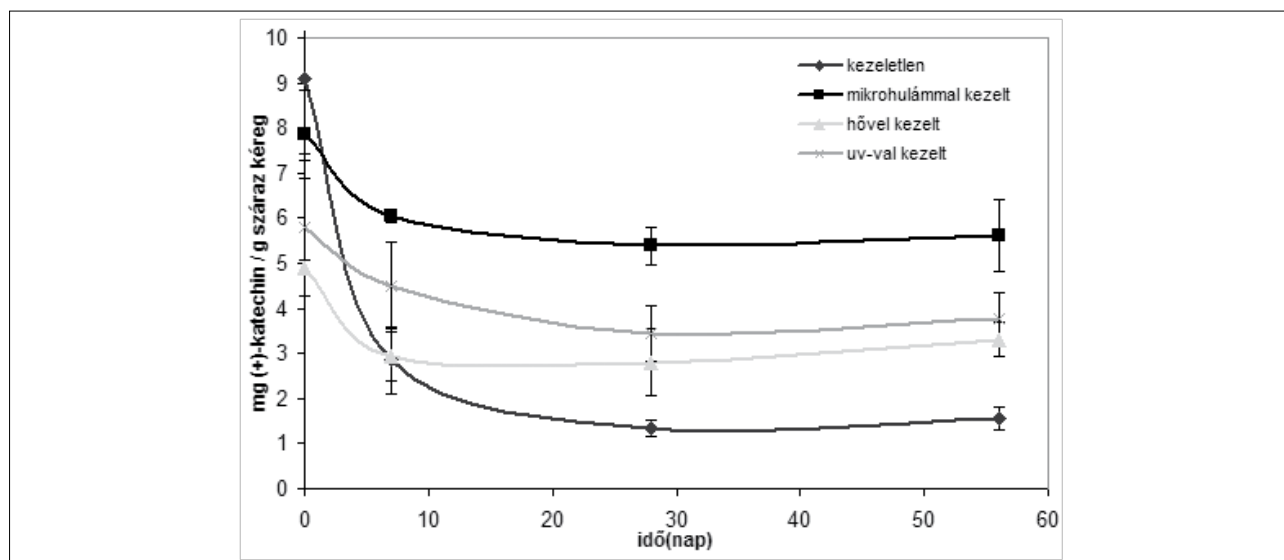
4. ábra A kezeletlen minták (+)-katechin tartalmának időbeli változása

Figure 4 The temporal change of (+)-catechin concentrations in untreated samples



5. ábra A kocsányos tölgy (*Quercus robur* L.) (+)-katechin tartalmának időbeli változása, különböző tartósítási eljárások alkalmazásával. Hibasávok: 95%-os konfidencia intervallum

Figure 5 The temporal change of (+)-catechin concentrations in the differently-treated pedunculate oak samples. The error bars represent 95% confidence intervals



6. ábra A szlavón tölgy (*Quercus robur* ssp. *slavnica* L.) (+)-katechin tartalmának időbeli változása, különböző tartósítási eljárások esetén. Hibasávok: 95%-os konfidencia intervallum

Figure 6 The temporal change of (+)-catechin concentrations in the differently-treated Slavonian oak samples. The error bars represent 95% confidence intervals

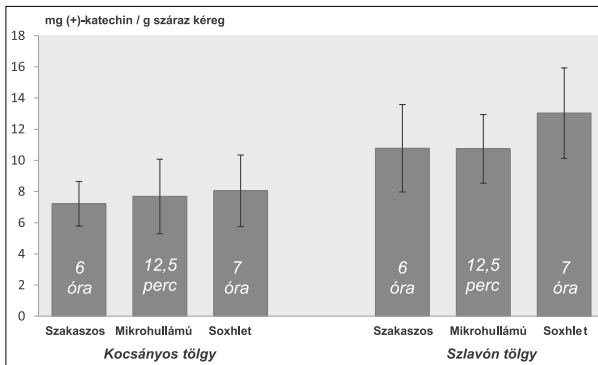
nagyon sok vegyülettel nem képez színes származékot, a 9. ábrán lévő kromatogram nem jeleníti meg az összes lehetséges szennyezőt. A tisztaság vizsgálatához éppen ezért a kromatográfias elválasztás után, de még a vanillin-foszforsavas előhívás előtt kapott ugyanazon (lásd: 8. ábra) réteglapot is kiértékeljük denzitometriásan. Az eredményét a 10. ábra szemlélteti.

A 10. ábrán a 11-es frakció kromatogramjából megállapítható, hogy a (+)-katechin csúcsterülete mintegy 60%-a az összes kromatográfias csúcstól lévő területek összegének. Hozzávetőlegesen tehát

a 11-es frakció 60%-os tisztaságú a (+)-katechin tartalomra nézve, ez az érték a preparatív elválasztás körülményeinek változtatásával javítható.

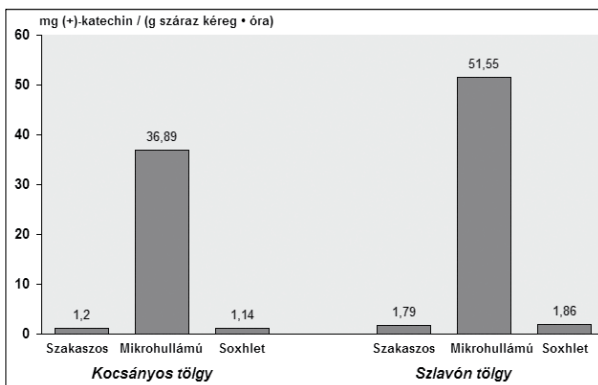
Következtetések

A fakéreg felhasználása erősen kiaknázatlan területe a fafeldolgozásnak. A tölgyek hazánk erdeinek jelentős részét teszik ki, kérgük jelentős mennyiségű alapanyagot biztosít, emellett nagy koncentrációban tartalmaznak hasznosítható extraktanyagokat. Vizsgálataink egyik célja a hazai tölgyfajok kérgének (+)-katechin tartalmának összehasonlítása volt,



7. ábra A vizsgált minták (+)-katechin tartalma extrakciós módszerek alkalmazásával, valamint az egyes eljárások időigénye; hibásáv: 95%-os konfidencia intervallum (n=3)

Figure 7 (+)-catechin concentrations of the investigated samples with different extraction methods and the time consumption of the different methods. The error bars represent 95% confidence intervals, (n=3)



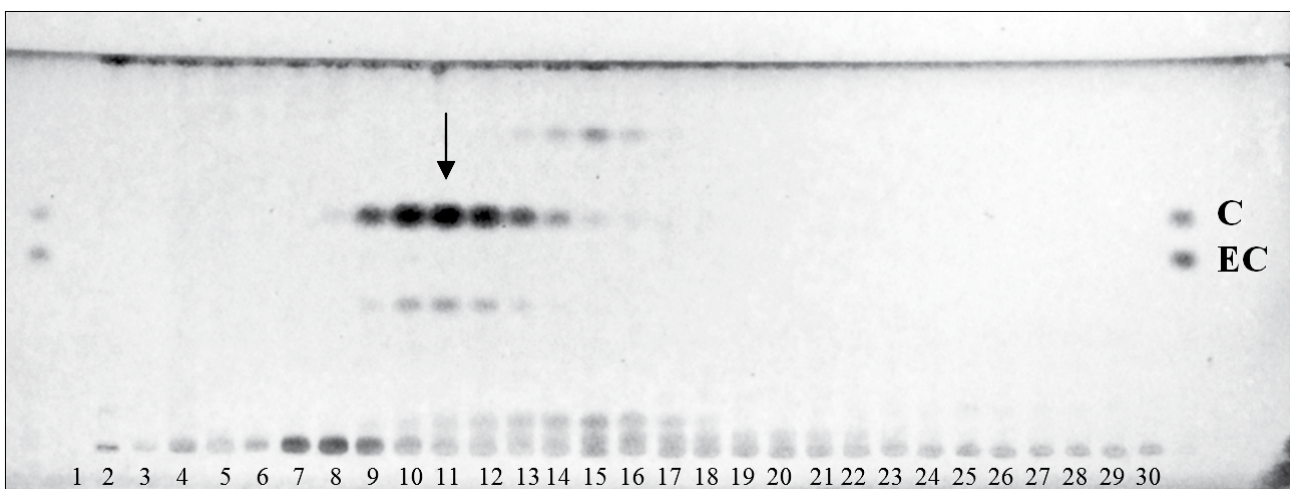
8. ábra Különböző extrakciós módszerek kihozatala (mg (+)-katechin/ (g száraz kéreg • óra))

Figure 8 The yield of the different extraction methods (mg (+)-catechin/ (g dry bark • hour))

másrészt olyan eljárások kidolgozása, melyek alkalmasak a vegyület idő- és költségghatékony kivonására és tisztítására.

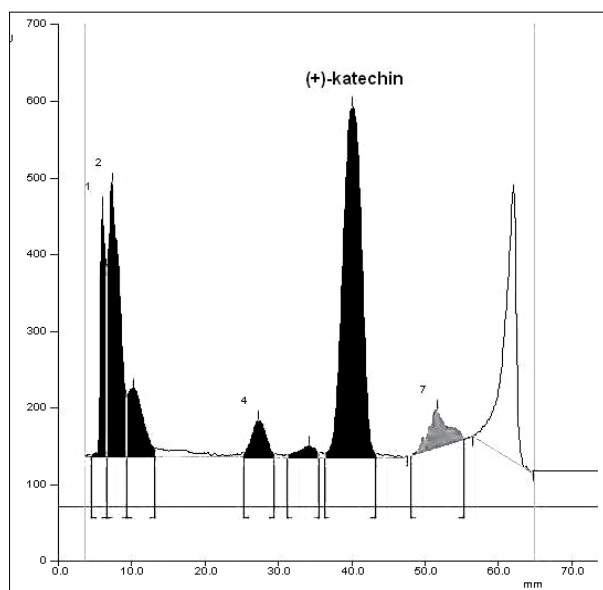
- A tölgyfajokat összehasonlítva megállapítottuk, hogy a legmagasabb koncentrációk a szlavón és kocsányos tölgyek kérgében mutathatók ki: 8-12 mg (+)-katechin/g száraz kéreg (0,8-1,2 tömeg%).
- Kísérleteink során módszereket hasonlítottunk össze és dolgoztunk ki a lehántott kéregminta tartósítására, melyek közül a leghatékonyabbnak a mikrohullámú kezelés bizonyult.
- Az extrakciós kísérleteink során megállapítottuk, hogy a mikrohullámú berendezésben végzett kivonás közel 5-10 perc alatt old ki annyi (+)-katechint, mint a többi módszer órák alatt. A mikrohullámú extrakció és tartósítás igen gyors, ez a leginkább idő- és költségghatékony módszer is egyben.
- A szakirodalom alapján módszert adaptáltunk a (+)-katechin preparatív elválasztására. A módszerrel a (+)-katechint mintegy 60%-os tisztaságban sikerült izolálni. Nagy nyomású preparatív HPLC-rendszerrel való alkalmazás esetén a grammos nagyságrendű elválasztás is gyorsan és hatékonyan megvalósítható.

A vizsgálataink során feltűnő volt, hogy az erdélyi kocsánytalan tölgy (*Quercus polycarpa* L.) (+)-katechin tartalma nagyon alacsony a másik két kocsánytalan tölgy mintákban mértekhez képest. Az általunk készített minta homogén volt, ám csak egy egyed kérgéből készült, így a faji sajátosság



9. ábra A frakciók tisztaságának vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával; C: (+)-katechin, EC: (-)-epikatechin; a (+)-katechin megjelenítése vanillin-foszforsavas előhívással történt; mintafelvétel: 1 μl mindegyik frakcióból

Figure 9 Investigation of the purity of the fractions with thin-layer chromatography; C: (+)-catechin, EC: (-)-epicatechin; the visualization of (+)-catechin was done with vanillin-phosphoric-acid reagent; sample application: 1 μl for each fraction



10. ábra A 11-es frakció összetételének vizsgálata denzitometriás kiértékeléssel (a vanillin-foszforsavas előhívás előtt, 280 nm-en, abszorpciós üzemmódban)

Figure 10 Investigation of the composition of fraction 11 with densitometric evaluation (at 280 nm prior to visualization with vanillin – phosphoric-acid reagent)

ez alapján nem bizonyítható egyértelműen, ehhez további vizsgálatokra van szükség. További feladat a feldolgozás és az extrakció után visszamaradt kéreg őrlemény hasznosításának vizsgálata főként hő-energiái és biogáz előállítási szempontból.

Irodalomjegyzék

- Albert L., Hofmann T., Rajczi E., Csepregi I., Makk Á. (2007) Biogén polifenolok kinyerése magyarországi fafajok kérgéből – különböző extrakciós eljárások hatékonyságának vizsgálata. (+)-katechin tartalom a tölgyfajok kérgében. Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdészeti Tudományos Konferencia. Sopron
- Allison RC. (1971) Utilization of oak residues in Oak Symposium Proceedings. U.S. Department of Agriculture. Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station. Upper Darby, PA. 111-117.
- Andrensek S., Simonovska B., Vovk I., Fyhrquist P., Vuorela H., Vuorela P. (2004) Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur* L.) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom®. International Journal of Food Microbiology 92, 181–187
- Bellakhdar J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press, Paris, p. 764.
- Berahou A., Auhmanib A., Fdil N., Benharref

- A., Jana M., Gadhi CA (2007) Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. Journal of Ethnopharmacology 112, 426–429
- Chutintrasri B., Noomhorm A. (2004) Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. LWT 39. 492-495.
- Gao M., and Liu C-Z. (2005) Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21, 1461–1463.
- Gui F., Wu J., Chen F., Liao X., Hu X., Zhang Z., Wang Z. (2005) Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. Food Chemistry 100, 1678–1685.
- Harkin JM., Rowe JW. (1971) Bark and its possible uses. U.S.D.A Forest Service Research Note. FPL – 091, Revised 1971, p 56
- Hofmann T., Albert L., Rétfálvi T., Bányai É., Visi-Rajczi E., Börcsök E., Németh Zs. I., Koloszar J., Varga Sz., Csepregi I. (2002) A peroxidáz és polifeno-oxidáz enzimek aktivitásának sugárirányú vizsgálata az álgesztes bükkben (*Fagus sylvatica* L.). A Kémiai Intézet tudományos ülészaka, Sopron
- Hofmann T. (2006) A kémiai paraméterek szerepe a bükk (*Fagus sylvatica* L.) álgesztesedésében. Doktori (PhD) disszertáció, NYME Roth Gyula Erdészeti és Vadgazdálkodási Tudományok Doktori Iskola, Sopron
- http://www.mgszh.hu/erdeszet_cd/html/tablajegyzek.htm, (2013.01.)
- Janceva S., Dizhbite T., Telisheva G., Spulle U., Klavinsh L., Dzenis M. (2011) Tannins of deciduous trees bark as a potential source for obtaining ecologically safe wood adhesives. Environment Technology. Resources Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference. Volume 1, Rēzeknes Augstskola, Rēzekne, RA Izdevniecība, 265-270
- Jennewein S., Croteau R. (2001) Taxol biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology 57, 13–19
- Jerez M., Touriñ S., Sineiro J., Torres JL., Núñez MJ. (2007) Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. Food Chemistry 104, 518–527.

- McKeever DB. (2002) Inventories of Woody Residues and Solid Wood Waste in the United States, Madison, Wisconsin: USDA Forest Service. Forest Products Laboratory
- Molnár S. (2004) Faanyagismeret, Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó
- Nath S., Bachani M., Harshavardhana D., Steiner JP. (2012) Catechins protect neurons against mitochondrial toxins and HIV proteins via activation of the BDNF pathway. *Journal of Neuro Virology* 18, 6, pp 445-455
- Németh K. (1994) Faanyagkémia. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest
- Noci F., Riener J., Walkling-Riberio M., Cronin DA., Morgan DJ., Lyng JG. (2007) Ultraviolet irradiation and pulsed electric field (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *Journal of Food Engineering* 85, 141-146 of oleochemicals. A comparative study. *Industrial crops and products* 29, 126-132
- Ono K., Nakano M., Toyota M., Terashi Y., Yamada M., Kohno T., Asakawa Y. (1997) Catechin product ion in cultured *Polygonum Hydropiper* cells. *Phytochemistry* 49, 1935-1939.
- Packer L., Rimbach G., Virgili F. (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 5/6, pp. 704-724.
- Pinto PCRO., Sousa AF., Silvestre AJD., Neto CP., Gandini A., Eckerman C., Holmbom B. (2009) *Quercus suber* and *Betula pendula* outer barks as renewable sources of oleochemicals. A comparative study. *Industrial crops and products* 29, 126-132
- Reimann H-J., Lorenz W., Fischer M., Frölich R., Meyer H-J., Schmal A. (1977) Histamine and acute hemorrhagic lesions in rat gastric mucosa: Prevention of stressulcer formation by (+)-catechin, an inhibitor of specific histidine decarboxylase in vitro. *Agents and Actions* 7, 1, pp 69-73
- Sen A., Isabel MI., Santos S, Graca J., Pereira H. (2010) The chemical composition of cork and phloem in the rhytidome of *Quercus cerris* L. bark. *Industrial Crops and Products* 31, 417-422
- Shannon LM., Kay E., Lew JY. (1996) Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. *J. Biol. Chem.* 241:2166-2172.
- Simonovska B., Vovk I., Andrenšek S., Yrjönen T., Vuorela P., Vuorela H. (2001) Isolation of (+)-Catechin from Oak Bark by Fractionation of Its Extracton ExtraChrom®. *Planar Chromatography*, Lillafüred, Hungary, 23-25, pp 335-341.
- Stahl E. (1962) *Dünnsicht-Chromatographie – Ein Laboratoriums Handbuch*, Springer, Heidelberg
- Takano T., Murakami T., Kamitakahara H., Nakatsubo F. (2008) Mechanism of formaldehyde adsorption of (+)-catechin. *Journal of Wood Science* 54 (4), 329.
- United States Patent 20030157216 (2003) Accelerated oak extraction method.
- Ümit Ünal M. (2005) Properties of polyphenol oxidase from Anamurbanana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry* 100, 909-913.
- Vainio H., Morgan G. (1997) Aspirin for the second hundred years, new uses for an old drug. *Pharmacology and Toxicology*, 81, 151-2.
- Vovk I., Simonovska B., Andrenšek S., Vuorela H., Vuorela P. (2003) Rotation planar extraction and rotation planar chromatography of oak (*Quercus robur* L.) bark. *Journal of Chromatography A*, 991, 267-274.
- Wen-Jau L., Wei-Chuan L. (2006) Properties of resorcinol-tannin-formaldehyde copolymer resins prepared from the bark extracts of Taiwan acacia and China fir. *Bioresource Technology* 97, 257-264
- Yuanyuan H., Jianchun S., Fangmei Y., Qiu HH. (2007) Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. *Journal of Food Engineering* 78, 687-692.