

HUMINSAVAK ANTIOXIDÁNS TULAJDONSÁGAI

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

CSICSOR ATTILA

Témavezetők

Prof. Dr.Tombácz Etelka

Dr. Szakácsné Dr. Földényi Rita †



Környezettudományi Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szeged

2024

1. Bevezetés és célkitűzés

Hazánk lakosságának túlnyomó része a szabadgyökökkel összefüggésbe hozható betegségek (elhízás, szív- és érrendszeri stb.) valamelyikében szenved. A statisztikai adatok alapján a korai halálozást tekintve Magyarország az EU-tagállamok között az elsők között szerepel. Ugyanakkor ismert tény, hogy zöldség- és gyümölcsfogyasztásunk messze alulmarad a tagállamokétól, pedig ma már tudományosan igazolt, hogy ezek elsősorban frissen történő fogyasztásával fedezni lehetne azokat az alapvető, vitaminokat, ásványi anyagokat és antioxidánsokat, amelyek szükségesek az egészséghez. Vajon milyen más lehetőségeink vannak még antioxidánsok bevitelére? Fontos és indokolt is, hogy új anyagok - például a humuszanyagok (HSs) - antioxidáns jellemzőit vizsgáljuk, valamint az antioxidáns kapacitásuk kialakításában döntő szerepet játszó komponenseiket mind minőségileg, mind mennyiségileg megismerjük.

A HSs már régóta kutatott anyagok, bár meglehet a teljes megismerésük, mechanizmusaik megértése és a társadalommal való széles megismertetése még várat magára. Az Nemzetközi Humuszanyag Társaság (International Humic Substances Society, IHSS) megfogalmazása szerint a HSs polidiszperz anyagok összetett és heterogén keverékei, amelyek talajban, üledékekben és természetes vizekben találhatóak, valamint főleg növényi maradványok bomlásából képződnek. A HSs kémiaiilag nem egységesek, változatos összetételű molekulák keverékei, amelyek hasonló oldhatóságú molekulacsoportokat tartalmaznak. A frakciók csoportosítása az oldhatóságuk alapján történik: humin nem oldódik vízben semmilyen pH-n sem; huminsav (HA) savas körülmények között vízben nem oldódik, fulvosav (FA) minden pH értéken oldható vízben; himatomelánsav (HY) alkoholos közegben oldódik.

A doktori munkám célja volt a HSs frakciók kinyerése (HA, FA, HY), tisztítása és elválasztása, két különböző kinyerési eljárással. A kinyert frakciók összehasonlítása a referencia mintákkal, mind fizikai-kémiai, mind antioxidáns tulajdonságok szempontjából. A kinyert frakciók antioxidáns tulajdonságainak feltárása különböző antioxidáns mérő módszerekkel, az eredmények összevetése már jól ismert antioxidáns hatóanyagokkal és más szakirodalmi értékekkel. Céлом volt továbbá az összefüggések keresése és feltárása, hogy a kivonási módszerek, hogyan befolyásolják a kinyert frakciók antioxidáns tulajdonságait.

A kinyerés hatásának vizsgálata a HSs antioxidáns hatására egy új szempont a HSs kutatásában. Léteznek már publikációk a HSs antioxidáns tulajdonságának vizsgálatáról, de ezek jellemzően csak egy fajta frakciót vizsgálnak, néhány módszerrel. Klein és munkatársai kutatásuk során eltérő szerkezetű HSs antioxidáns kapacitását vizsgálták többféle módszerrel.

Aeschbacher és munkatársai különböző HSs elektron donor képességét (EDC) számszerűsítették elektrokémiai oxidáció segítségével, széles pH tartományt figyelembe véve. *Efimova* és munkatársai barnaszénből extrahált HY antioxidáns hatását DPPH reakcióval vizsgálták. Azonban olyan átfogóbb mű még nem került publikálásra, amelyben egy azonos anyagból kinyert, több frakciót, több különböző antioxidáns módszerrel vizsgálta volna. Nem beszélve a HY frakció vizsgálatáról, ami a HSs frakciók legkevésbé kutatott frakciója. Ugyanakkor újdonság a különböző kivonási módszerek hatásának vizsgálata ezen frakciók antioxidáns tulajdonságaira. Jelen munkámban ezen, új szempontok figyelembevételével vizsgáltam a HS frakciók antioxidáns tulajdonságait beleértve a HY frakciót is.

A szakirodalomban általában nem nevesített eljárásokkal vonják ki a HSs frakciókat, melyek fő jellemzője, hogy a fő kivonási lépésben lúgos vagy savas anyag a feltáró közeg. Ennek megfelelően terjedtek el a lúgos és savas kinyerésű eljárások, hatékonyságukkal nem szoktak foglalkozni. A kinyerési módszerem eltért a szakirodalomban említettektől, mivel általában nem leonardit a forrásanyag, illetve csak talajminták esetén szoktak savas feltárást alkalmazni. A kutató munkám során leonarditot használtam és két különböző (egy savas és egy lúgos) feltárási módszert is alkalmaztam, hogy fény derüljön arra, mely módszer alkalmasabb az antioxidáns célú HSs kinyerésére. Mindkét módszernél alkalmaztam intenzifikálást savas és/vagy H₂O₂-os előkezelést, hogy a másodrendű kötéseket feltudjuk szakítani, ezáltal növelve a frakciók kihozatalát.

A munkát saját kinyerésű, minták készítésével kezdtem, ezt követte a minták általános jellemzése (elemi összetétel, spektrális jellemzés, savas funkciós csoportok, stb.) és összehasonlítása az IHSS referencia mintákkal. Ezt követően több módszerrel vizsgáltam antioxidáns tulajdonságaikat. Próbáltam minél több fajta metóduson alapuló módszerrel vizsgálni a mintáim antioxidáns potenciálját. Ennek érdekében elektron átmeneten alapuló antioxidáns mérő módszerekkel (DPPH, CUPRAC, FRAP), és hidrogén átmenettel járó módszerrel (ORAC) is teszteltem a minták antioxidáns tulajdonságait. Ezen felül megmértem a minták antioxidáns hatásával összefüggő összes fenol tartalmát (TPC módszer), továbbá ESR, elektrokémiai és enzimes módszerekkel is próbáltam a minták antioxidáns hatását jellemezni.

2. Kísérleti módszerek és eljárások

A saját kinyerésű minták elkészítéséhez alapanyagként hazai leonarditot (Dudar, Magyarország) használtam. Az ásvány begyűjtése után szárítottam daráltam és szitáltam. Majd megkezdtem a két különböző extrakciós módszerrel a minták előállítását.

A savas feltárás során 20%-os HCl-al extraháltam a mintát 2 órán keresztül 30-40 °C között. Ezután szűrtem és mostam az szuszpenziót, majd megszáritottam. Ezt követte egy alkoholos extrakció, amely során a szűrletként megkaptam az ac-HY frakciót. A szűrőleplenyből dolgoztam tovább, 10%-os szuszpenziót készítettem belőle majd H₂O₂-oldattal (35 w/w%) oxidáltam, centrifugáltam és szűrtem. Az ac-FA frakciót a szűrletből nyertem ki, míg a fennmaradt iszaptól az ac-HA frakciót.

A lúgos feltárás során 2,5%-os KOH-al extraháltam a mintát 2 órán keresztül 30-40 °C között. Ezután centrifugáltam a szuszpenziót, a felülúszót megsavanyítottam kénsav hozzáadásával azért, hogy az al-FA és az al-HA frakciókat elkülöníthessem. A szuszpenziót leszűrtem, szűrletként megkaptam az al-FA-frakciót. A szűrőleplenyt ezután etanollal extraháltam. Az extrakciót ülepités és szűrés követte. A szilárd rész az al-HA, a szűrlet pedig az al-HY. A kinyerésük után mind a hat mintát megszáritottam 40°C-on és tároltam további felhasználásig. A saját kinyerésű mintákon felül referencia mintaként az IHSS-től szereztem be HA és FA frakciókat, összesen három darabot, így végül kísérleteimet összesen kilenc mintával végeztem el.

A kinyerések után megkezdtem a minták fizikai-kémiai elemzését elem analízissal, FT-IR spektroszkópiával, UV-Vis spektrofotometriával és sav-bázis titrálással. A minták elemi összetételét egy Fisons EA-1108 CHNS-O Elem Analizátor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével határoztam meg a Nápolyi Federico II. Egyetemen. Meghatároztam az összes szén, nitrogén és kén mennyiségét a mintákban.

Az FT-IR spektrumokat Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) technikával vettem fel Perkin Elmer Frontier FT-IR/NIR spektrométerrel (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Körülbelül 2 mg port mértem be, és 200 mg KBr-mal őröltem mozsárban, majd átvittem a mintatartó csészébe. Először a KBr spektrumát mértem, majd az adott mintát pásztáztam. Minden spektrumot a 4000-600 cm⁻¹ hullámszám tartományban vettem fel 1 cm⁻¹ felbontás mellett.

Az UV-Vis abszorpciós spektrumokat SP-UV1100, DLAB spektrofotométeren (DLAB Scientific Co., Ltd. Beijing, Kína) segítségével vettem fel a 190 és 800 nm közötti hullámhossz tartományban. A mintákból hígítási sort készítettem [1*10⁻³ g/cm³ – 1*10⁻⁵ g/cm³] intervallumban, úgy, hogy legalább 5 mintából álljon a sorozat.

A potenciometriás sav-bázis titrálás elvégzéséhez a GIMET1 automata titrálóberendezést használtam, amelyet a Szegedi Tudományegyetem, Kolloidkémia Tanszék munkatársai fejlesztettek ki. A mérések elvégzése során ~10 mg HS mintát 50 ml térfogatú 0,005 M koncentrációjú KCl oldatban titráltunk, 3 – 10,5 pH tartományban. A beállított mérési

ciklus 15 s, az egyensúlyi feltétel 0,0002 pH változás /s. A mért adatok kiértékelése adszorpciós elven, a kiindulási és az egyensúlyi proton koncentráció különbségének számolása alapján történt. Ehhez a titráló rendszer proton koncentráció kalibrálása kellett, amit a csak háttélelektrolitot tartalmazó oldatok (0,005 M KCl) titrálásával valósítottunk meg.

A minták elemzését követően különböző módszerekkel feltérképeztem a frakciók antioxidáns tulajdonságait. Az összes fenol tartalom (TPC) meghatározást a *Shetty* és társai által kidolgozott módszere alapján végeztem. A FRAP értékek meghatározása *Benzie és Strain* módosított változatát használtam, 2,2'-dipiridil reagenssel, tripiridil triazine helyett. Ezt követte a DPPH módszer, ahol a stabil gyök reakcióba lép a hidrogéndonorokkal. Az 517 nm-en mérhető mélylila színt, amely az oldatban lévő DPPH-t mutatja, az antioxidánsok jelenléte elszínteleníti az általuk befogott elektronok számával arányosan. Ezután a CUPRAC és módosított-CUPRAC módszerekkel folytattam tovább, amelyek *Karadirek és munkatársai* nevéhez köthetőek. A klasszikus antioxidáns mérő módszerek közül a sort az ORAC módszerrel zártuk.

Nem klasszikus antioxidáns mérő módszereket is alkalmaztam, mint például az ESR módszer, az enzimikus tesztek és az elektrokémiai mérések. Az ESR méréseket a németországi Bruker Company (Bruker BioSpin, Ettlingen) végezte. A mérési kísérletekhez használt műszerkonfigurációt egy automatizálással felszerelt Benchtop Micro ESR M (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, U.S.) rendszeren végezték. Komplex szerves anyagok enzimikus aktivitásának vizsgálatára *Hadwan és munkatársai* által kifejlesztett, színváltozáson alapuló módszert használtunk. Az elektrokémiai méréseket *Muthuri és munkatársai* munkája alapján végeztük.

3. Új tudományos eredmények

T1. A kinyerési módszerek hatása a frakciókra

T1.1. Humuszanyag frakciók kinyerése, a forrásanyag előkezelésének hatása a kinyerhető frakciók mennyiségére

Megállapítottam, hogy a HA frakciók kinyerésére az általam alkalmazott savas feltárású eljárás alkalmasabb, 17%-al több HA vonható ki, mint a lúgos feltárással. A FA frakcióra az ellenkezője mondható el. A lúgos eljárással 66%-kal több FA frakciót tudtam kinyerni, mint a savas feltárású eljárással. A lúgos feltárással viszont kétszer annyi HY frakciót tudtam elválasztani, mint a savas feltárású módszerrel.

T1.2. Humuszanyag frakciók fizikai-kémiai jellemzése és összehasonlítása az IHSS referencia mintákkal

A saját kinyerésű mintákat a referencia mintákkal és más szakirodalmi értékekkel összehasonlítva bizonyítottam, hogy az elválasztott HA, FA és HY frakciók fizikai-kémiai paraméterei a frakciókat jellemző tartományba esnek.

Az elemanalízis eredményei alapján számolt H/C vs. O/C arányok a HSs van Krevelen diagramjában a FA, HA frakciók régiójába esnek. A saját kinyerésű és a referencia minták C/H/N/O/S tartalmai azonban eltéréseket mutattak. A saját kinyerésű mintáknál a C tartalom valamivel alacsonyabb, míg a H-tartalom néhány százalékkal magasabb, a N és S százalékos aránya nagyjából azonos. Frakcióink O tartalma magasabb, mint a referencia mintáké, és a lúgos extrakcióból származó minták ezen értékei magasabbak, mint a savas extrakciós mintáké.

Spektrális módszerekkel összehasonlítva a saját és a referencia mintákat megállapítottam, hogy az FT-IR spektrumokban jellemző eltérések a funkciós csoportok (mint például OH, COOH, kinon) deformációs rezgései tekintetében nem azonosítható. Az ujjlenyomat régióban viszont a referencia minták spektruma kevésbé „zajos” a lényegesen kisebb ásványi anyag tartalmuk miatt.

Megállapítottam, hogy a HA és FA frakciók UV-Vis spektrumai jellegtelen lefutásúak, ami a HSs-ra jellemző, a HY frakció spektrumán viszont megjelenik egy csúcs 210 nm környékén. Az UV-Vis spektrumokból számolt a HSs jellemzésére szolgáló spektrális arányok, az E4/E6, E2/E3 és URI indexek, a HSs frakciókra tipikus irodalmi intervallumba esnek.

Megállapítottam, hogy a potenciometriás sav-bázis titrálások eredményei bizonyították, hogy az általam előállított HA és FA frakciók karboxil- és fenolos hidroxilcsoport tartalma és

a teljes aciditás értékei az ezeket a frakciókat jellemző irodalmi intervallumba esnek. A HA és FA frakcióim pH-függő disszociációja jól korrelál a referencia minták disszociációs jellegével, a karboxil- és fenolos hidroxilcsoport tartalmuk azonban kisebb. A HY frakció pH-függő disszociációs görbéje is ugyanolyan lefutású, karboxil- és fenolos hidroxilcsoport tartalma a legkisebb, irodalmi adat hiányában nem tudtam összehasonlítani, HY potenciometriás sav-bázis titrálása újdonság a szakirodalomban.

T1.3. Leonarditból kinyert huminsav és grafén oxid analóg viselkedése: pH és ionerősség függő disszociáció és kolloid stabilitás

Megállapítottam a huminsav és grafén oxid analóg viselkedését. Noha az elemanalízis a HA-aknál jóval kisebb H/C arányokat ad az egy rétegű grafit oxidokra jelezvén a domináns aromás szerkezetet, az O/C arányuk (0,3-0,5) viszont a HA-aknál leggyakoribb sávba esik. Ezzel összhangban a savas funkciós csoportjaik mennyisége és disszociabilitása meglepően nagy hasonlóságot mutat. Ennek következménye, hogy a pH és ionerősség függő disszociációjuk és kolloid stabilitásuk is analóg, azonban a HA-k sótűrése lényegesen jobb.

T2 A saját kinyerésű frakciók antioxidáns hatásának igazolása

T2.1. A saját kinyerésű frakciók antioxidáns hatásának összehasonlítása a szakirodalmi értékekkel

Az alkalmazott antioxidáns mérő módszerek mindegyikével igazoltam az általam kinyert frakciók antioxidáns tulajdonságait, az antioxidáns kapacitás értékek korrelációját a szakirodalomban fellelhető eredményekkel.

A TPC eredmények szerint a vizsgált HS-frakciók magas fenolos csoport tartalmúak, ami arra utal, hogy szabad gyökfogóként vagy antioxidánsként működhetnek.

A DPPH módszerrel az 50%-os gátláshoz tartozó koncentrációk (IC₅₀ érték) alapján a saját kinyerésű mintáim gyenge (IC₅₀ = 180 – 400 µg/mL), az IHSS HAL és HAP referencia minták pedig közepes (IC₅₀ = 57 - 53 µg/mL) antioxidánsok.

A CUPRAC és a módosított CUPRAC módszer eredményei (TEAC értékek) alapján az IHSS referencia minták a leghatékonyabb antioxidánsok. A saját kinyerésű frakciók antioxidáns potenciálja HY>HA>FA rendben csökken, TEAC értékeik 55-247 µmol/g intervallumba esnek, a növényi kivonatokhoz hasonlóak.

A frakcióim ORAC módszerrel mért AOC értékei (0,85 – 5,11 µM TE/mg) jól korrelálnak a szakirodalomban HA és FA frakciókra fellelhető adatokkal (0,3 – 2,56 µM

TE/mg). Névumként sikerült a HY frakciók AOC értékeit is megmérni, a dolgozat elkészüléséig azonban nem találtam olyan szakirodalmat, ahol publikáltak volna ilyen értékeket a HY frakcióra. Megállapítottam, hogy az általam előállított HS frakciók igen magas antioxidáns kapacitással rendelkeznek.

T2.2. A saját kinyerésű frakciók antioxidáns hatásának összehasonlítása a referencia mintákkal

Az antioxidáns hatások vizsgálata során az alábbi megállapításokat tettem: A TPC vizsgálatok szerint az IHSS referencia minták gallusz sav egyenértékei szignifikánsan nagyobbak, mint a saját kinyerésű HA, FA frakciók értékei.

Az irodalomban többnyire egy-két módszerrel tesztelik a HSs antioxidáns hatását, én a referencia mintákat és a saját előállítású frakciókat többféle módszerrel vizsgáltam, ezek eredményeit összevetve megállapítottam:

- A DPPH módszer szerint a saját kinyerésű frakciók lényegesen gyengébb hatást mutatnak, mint az IHSS minták.

- A CUPRAC és a módosított CUPRAC módszerekkel tesztelve a saját kinyerésű frakciók kissé gyengébb hatást mutatnak, mint az IHSS minták.

- Az ORAC módszerrel vizsgálva a referencia mintákhoz viszonyítva a saját kinyerésű frakciók jobb antioxidáns potenciálját bizonyítottam. Az IHSS referencia minták AOC értékei FAP (2,28), HAL (1,22), HAP (0,69) $\mu\text{M TE/mg}$ -nak, míg a saját kinyerésű mintáké HY (5,11;4,06), HA (1,58; 1,03), FA (1,35; 0,85) $\mu\text{M TE/mg}$ -nak adódtak.

T2.3 Himatomelánsav frakció antioxidáns potenciálja

Bebizonyítottam, hogy a HY frakció a leghatékonyabb antioxidáns a saját kinyerésű minták közül. Az öt antioxidáns mérő módszer közül négy esetben (DPPH, Cuprac, módosított Cuprac, ORAC) ez a frakció bizonyult a leghatékonyabbnak. Ebből a frakcióból sajnos nincs referencia minta, mert ez még egy keveset kutatott frakció, így vizsgálata újdonság a szakirodalomban.

A CUPRAC módszerekkel a HY frakciók körülbelül kétszer olyan hatékonyan bizonyultak, mint a többi frakció.

Az ORAC módszer szerint a HY minták antioxidáns potenciálja kiemelkedő. Antioxidáns kapacitásuk meghaladja az aszkorbinsav és az E-vitamin értékét és valamennyi bemutatott magas antioxidáns tartalmú élelmiszerét.

4. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Az értekezés témájához tartozó közlemények:

[1] Csicsor, A. & Tombácz, E., 2022. Screening of Humic Substances Extracted from Leonardite for Free Radical Scavenging Activity Using DPPH Method. *Molecules*, 27(19), pp. 6334. ISSN: 1420-3049, DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196334>

Q1, IF₅ év átlag (2022) = 4,927

Hivatkozások: 13 (1)

[2] Csicsor, A. & Tombácz, E., 2022. Antioxidant Effect of Humic Substances from Hungarian Leonardite. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 50(1), pp. 1-5. ISSN: 2450-5102, DOI: <https://doi.org/10.33927/hjic-2022-01>.

IF = 0,200

Hivatkozások = 0 (1)

[3] Csicsor, A., Tombácz, E. & Kulcsár, P., 2023. Antioxidant potential of humic substances measured by Folin-Ciocalteu, CUPRAC, QUENCHER-CUPRAC and ESR methods. *Journal of Molecular Liquids*, 391(B), pp. 123294. ISSN 0167-7322, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123294>

Q1, IF (2022-2023) = 6,633

Hivatkozások = 0 (0)

[4] Tombácz, E., Tóth, I. Y., Kovács, K., Illés, E., Szekeres, M., Barna B., Csicsor, A. & Szabó, T., 2020. Striking analogies and dissimilarities between graphene oxides and humic acids: pH-dependent charging and colloidal stability. *Journal of Molecular Liquids*, 306, 112948. ISSN 0167-7322, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112948>.

Q1, IF (2020-2021) = 6,165

Hivatkozások = 7 (2)

Σ IF = 17,925

Σ Idézettség = 19 (ebből önhivatkozás 4)

Konferenciakiadványok és elektronikus publikációk

(1) Csicsor, A., 2019. Humuszanyagok mint antioxidánsok? Budapest, Professzorok az Európai Magyarországiért Egyesület (PEME) XVIII. Nemzetközi tudományos konferencia, pp. 74-81, ISBN: 978-615-5709-08-1.

(2) Hausinger, P., Sepp, K., **Csicsor, A.**, Radács, M., Molnár, Zs., Gálfi, M., 2020. Chlorobenzene compounds as possible immuno-disruptor agents. Szeged, International Symposium on Analytical and Environmental Problems (26.), pp. 157-161, ISBN: 978-963-306-771-0.

Nemzetközi és hazai konferencia-részvételek

(1) **Csicsor, A.** Colloidal stability of different humic substances fractions: pH and salt concentration dependence.

35th International Conference on Solution Chemistry (ICSC) Szeged, Magyarország (2018) – szóbeli előadás

(2) **Csicsor, A.** Humuszanyagok mint antioxidánsok?

Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület (PEME) XVIII. Nemzetközi tudományos konferencia

Budapest, Magyarország (2019) – szóbeli előadás

(3) **Csicsor, A.** Could be humic substances good antioxidants?

26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems
Szeged, Magyarország (2020) – szóbeli előadás

(4) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Optimized humic products from natural sources.

26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems.
Szeged, Magyarország (2020) – poszter prezentáció

(5) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Magyar leonarditból kinyert humuszanyagok antioxidáns hatása.

Pannon Egyetem Műszaki Kémiai Napok

Veszprém, Magyarország (2021) – szóbeli előadás

(6) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Humuszanyagok antioxidáns tulajdonságainak vizsgálata CUPRAC módszerrel, saját fényelnyelésük figyelembevételével.

9. Környezetkémiai Szimpózium

Siófok, Magyarország (2021) – szóbeli előadás

(7) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Humic substances (HS) in the environment and their detections.
Electrochemistry V4 Workshop

Pécs, Magyarország (2021) – poszter prezentáció

(8) Muthuri, L., **Csicsor, A.**, Tombácz. E., Nagy, L. & Nagy, G. Electro chemical method for detection and measurement of humic substances using chemically modified carbon electrodes.
Electrochemistry V4 Workshop.

Pécs, Magyarország (2021) – poszter prezentáció

(9) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Antioxidant effect of humic substances: an overview.
CPBCI 2022 Chemistry Physics and Biology of Colloids and Interfaces.

Eger, Magyarország (2022) – szóbeli előadás

(10) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Impact of humic substances on the living organisms.
CPBCI 2022 Chemistry Physics and Biology of Colloids and Interfaces.

Eger, Magyarország (2022) – poszter prezentáció

(11) **Csicsor, A.** & Tombácz. E. Leonarditból kinyert humuszanyagok szabadgyök fogó aktivitásának mérés DPPH módszerrel.

10. Környezetkémiai Szimpózium.

Siófok, Magyarország (2022) – szóbeli előadás

Summary

In my research, I placed emphasis on the extraction from a locally available raw material Leonardite (Dudar, Hungary). The primary aim of my study was to investigate the potential antioxidant effects of HSs. Additionally, I deemed it crucial to utilize two distinct extraction methods feasible within an industrial context. This approach enabled the assessment of the impact of various extraction techniques on the physicochemical and antioxidant characteristics of the fractions. HA and FA fractions sourced from the International Humic Substances Society served as reference materials. Subsequent to the physicochemical analysis of the prepared samples, various antioxidant assay methods were employed for evaluation. The physicochemical measurements (elemental analysis, FTIR and UV-Vis spectroscopies, acid-base titration) proved the quality of HA, FA and HY fractions are good and their characteristics meet the expectations. The majority of selected methods confirmed the presence of antioxidant properties in the extracted fractions, including antioxidant capacity, activity, and radical scavenging capability. Challenges were encountered in the assessment of enzyme assays and electrochemical techniques regarding evaluation consistency. Some methods exhibited pronounced effects, while others demonstrated weaker responses. This validation supported our hypothesis that the extraction method not only impacts the physicochemical properties of the fractions but also their free radical scavenging potential. Notably, the choice of leonardite or peat as the raw material has a lesser influence on results compared to the extraction method itself. Overall, fractions derived from acid extraction processes yielded superior outcomes compared to alkaline-derived counterparts. A general ranking of fractions based on antioxidant activity indicates that, across most methodologies, the HY fractions showed the highest efficacy, followed by HA fractions and FA fractions. However, variations were observed in two methodologies, with HA fractions exhibiting optimal performance in the TPC assay, followed by HY and FA fractions. In ESR measurements, the FA fractions showed the highest effectiveness, followed by the HY fractions. Moreover, the antioxidant activity of self-extracted fractions was lower in TPC, DPPH, CUPRAC, and modified CUPRAC assays compared to reference samples, likely attributed to the accurate purification of IHSS samples.