

# Doktori (PhD) értekezés

Csicsor Attila

Szegedi Tudományegyetem

Környezettudományi Doktori Iskola

Szeged

2024



Doktori (PhD) értekezés

# **Huminsavak antioxidáns tulajdonságai**

**Csicsor Attila**

**TÉMAVEZETŐK**

**Prof. Dr. Tombácz Etelka**

**Dr. Szakácsné Dr. Földényi Rita †**



**Környezettudományi Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

**Szeged**

**2024**

*“Humic substances may not be beautiful, but they do beautiful things.” – Fritz H. Frimmel*

# Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	8
1. BEVEZETÉS .....	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	11
2.1 Antioxidánsok és szabad gyökök .....	11
2.1.1 Szabadgyökök .....	11
2.1.2 A szabad gyökök élettani hatása .....	13
2.1.3 Az antioxidánsok .....	15
2.1.4 Az antioxidánsok fajtái .....	17
2.1.5. A növények, mint az antioxidáns molekulák forrásai.....	19
2.1.6 Antioxidáns-kapacitás mérő módszerek .....	20
2.1.7. Elektron átmeneten alapuló (ET) módszerek.....	22
2.1.8 Hidrogén átvitelen alapuló (HAT, Hidrogen Atom Transfer) módszerek.....	26
2.1.9. ESR (Electron Spin Resonance) módszerek .....	29
2.1.10 Antioxidánsok aktivitásának vizsgálata enzimekkel.....	30
2.1.11 Elektrokémia mérések.....	31
2.2. Humuszanyagok .....	32
2.2.1 A humuszanyagok.....	33
2.2.2 Humuszanyag frakciók kinyerése .....	39
2.2.3 A humuszanyag frakciók jellemzése.....	41
2.2.4 A humuszanyagok, mint antioxidánsok.....	45
3. CÉLKITŰZÉSEK .....	49
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	50
4.1 IHSS humuszanyag minták .....	51
4.2 Saját előállítású humuszanyag minták.....	51
4.3 Fizikai kémiai vizsgálatok.....	55
4.3.1 Elemanalízis .....	55
4.3.2 UV-VIS spektroszkópiai elemzés. ....	55

4.3.3. FT-IR spektroszkópia elemzés.....	55
4.3.4. Potenciometriás sav-bázis titrálás .....	56
4.4 Antioxidáns hatást mérő módszerek.....	57
4.4.1 Összes fenol tartalom – TPC módszer .....	57
4.4.2 FRAP módszer .....	58
4.4.3. DPPH módszer.....	58
4.4.4 CUPRAC módszer .....	59
4.4.5 Módosított CUPRAC módszer .....	60
4.4.6 ORAC módszer.....	60
4.4.7 ESR módszer.....	61
4.4.8 Antioxidáns aktivitás vizsgálata enzimekkel .....	61
4.4.9 Elektrokémiai módszer .....	63
4.4.10 A mérések nehézségei, korrigálásai.....	64
4.5 Kísérletek, mérések helye.....	64
5. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS .....	66
5.1 A frakciók fizikai kémiai jellemzése .....	66
5.1.1 Elem analízis eredményei .....	66
5.1.2. FT-IR Spektroszkópia eredményei .....	69
5.1.3. UV-Vis Spektroszkópia eredményei.....	72
5.1.4. Potenciometriás sav-bázis titrálás eredményei .....	75
5.2 Humuszanyag frakciók antioxidáns jellege.....	77
5.2.1 Összes fenol tartalom - TPC módszer eredményei .....	77
5.2.2 DPPH módszer eredményei .....	79
5.2.3 CUPRAC módszer eredményei .....	82
5.2.4 Módosított Cuprac módszer eredményei .....	83
5.2.5 ESR mérések eredményei .....	85
5.2.6 ORAC mérés eredményei .....	87

5.2.7 Sikertelen mérések .....	90
5.2.7.1 Elektrokémiai mérések eredményei .....	90
5.2.7.2 FRAP mérés eredményei .....	90
5.2.7.3 Enzimes antioxidáns aktivitás módszer eredményei.....	91
6. ÉRTÉKELÉS, ÖSSZEFOGLALÁS .....	92
SUMMARY .....	96
Köszönetnyilvánítás .....	100
Irodalomjegyzék.....	101
Függelék .....	130

## Rövidítések jegyzéke

ac-FA	Saját kinyerésű fulvosav minta, savas feltárású
ac-HA	Saját kinyerésű huminsav minta, savas feltárású
ac-HY	Saját kinyerésű himatomelánsav minta, savas feltárású
al-FA	Saját kinyerésű fulvosav minta, lúgos feltárású
al-HA	Saját kinyerésű huminsav minta, lúgos feltárású
al-HY	Saját kinyerésű himatomelánsav minta, lúgos feltárású
CL	Kemilumineszcencián alapuló módszerek – (Chemiluminescence)
CUPRAC	Réz(II)-ion redukción alapuló antioxidáns hatás vizsgálat (CUPric Reducing Antioxidant Capacity)
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
DPPH módszer	DPPH gyökfogó aktivitásán alapuló vizsgálat
ESR	Elektronspin-rezonancia (Electron Spin Resonance)
ET	Elektron átmeneten alapuló módszerek (Electron Transfer)
FA	Fulvosav
FRAP	Vas(III)-ion redukción alapuló antioxidáns hatás vizsgálat (Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAEAC	Galluszsav ekvivalens antioxidáns kapacitás (Gallic Acid Equivalent Antioxidant Capacity)
HA	Huminsav
HAs	Huminsavak
HAT	Hidrogén átvitelén alapuló módszerek (Hydrogen Atom Transfer)
HI	Humin anyag
HSs	Humuszanyagok
HY	Himatomelánsav
IHSS	Nemzetközi Humuszanyag Társaság (International Humic Substances Society)
IHSS FAP (2S103F)	Tőzegtől kivont fulvosav, referencia anyag
IHSS HAL (1S104H)	Leonarditból kivont huminsav, referencia anyag
IHSS HAP (1S103H)	Tőzegtől kivont huminsav, referencia anyag
Nc	Neocuprein, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin



NOM	Természetes szerves anyag (Natural Organic Matter)
ORAC	Oxigéngyök abszorpciós kapacitás (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PCL	Fotokemilumineszcencia mérések
ROS	Reaktív oxigén származékok (Reactive Oxygen Species)
RNS	Reaktív nitrogén származékok (Reactive Nitrogen Species)
SOD	Szuperoxid-diszmutáz enzimek
TEAC	Troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
Tempol	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxil
TPC	Összes polifenol meghatározás (Total Phenolic Content)
TRAP	Összes peroxilgyök mérés, teljes reaktív antioxidáns potenciál (Total Reactive Antioxidant Potential)
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-kromán-2-karbonsav

# 1. BEVEZETÉS

Hazánk lakosságának túlnyomó része a szabadgyökökkel összefüggésbe hozható betegségek (civilizációs betegségek, szív- és érrendszeri, rosszindulatú daganatos megbetegedések, csontritkulás, kettes típusú diabetes stb.) egyikében szenved. Ezek döntő hányadának kialakulásában a helytelen táplálkozási szokásoknak elsődleges a szerepe. Bár egyre több a tudatos fogyasztó, a médiában már sokszor unalomig hangsúlyozzák az egészséges életmódot és nincsen olyan nap, amikor ne jelennének meg valamelyik ismert médiaszereplő táplálkozási „tanácsai” a könyvesboltokban, de a statisztikai adatok alapján a korai halálozást tekintve Magyarország az EU-tagállamok között mégis az elsők között szerepel. Az áruházak polcai tele vannak újabbnál újabb, „fitnesz, karcsúsító, zsírégető, cukormentes, nagy antioxidáns tartalmú, több rostot tartalmazó” termékekkel, valamint szinte bármilyen panaszra, igényre lehet találni étrend-kiegészítőt. Ugyanakkor ismert tény, hogy zöldség- és gyümölcsfogyasztásunk messze alulmarad a tagállamokétól [1], pedig ma már tudományosan igazolt, hogy ezek elsősorban frissen történő fogyasztásával fedezni lehetne azokat az alapvető, vitaminokat és provitaminokat, ásványi elemeket, amelyek nemcsak a szervezet zavartalan működéséhez elengedhetetlenek, hanem elsősorban antioxidáns komponenseiknek köszönhetően a betegségek megelőzéséhez is döntő mértékben hozzájárulhatnak. Már az őskorban is szívesen fogyasztott bogyós gyümölcsöknek különösen fontos szerepük van a szabadgyökök káros hatásaival szembeni küzdelemben, ugyanis rendkívül nagy az antioxidáns hatásuk a bennük előforduló nagy vitamin- antocián és flavonoid tartalom miatt. Miután az utóbbi időben az orvoslásban jelentős szemléletváltozás következett be, egyre inkább a megelőzésre helyezik a hangsúlyt a betegségek kezelésével szemben, előtérbe kerültek a természetes alapanyagú gyógyhatású készítmények. A bogyós gyümölcsök számos, ezzel kapcsolatos kutatási munka [2 - 4] főszereplőivé váltak, mivel a daganatos megbetegedések, valamint a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében és utókezelésében is elengedhetetlenül fontosak. Vajon milyen más lehetőségeink vannak, milyen más anyagok rendelkezhetnek még magas antioxidáns tartalommal? Az eddigiek alapján 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 [2].

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Antioxidánsok és szabad gyökök

A szabad gyökökkel és a reaktív oxigén származékok (ROS) kapcsolatos ismereteink közelmúltbeli bővülése olyan orvosi forradalmat ígér, amely az egészségügy és a különböző betegségek kezelésében új korszakot hozhat [5]. Egészen ironikus, hogy az oxigén, ami az élethez nélkülözhetetlen, bizonyos helyzetekben, bizonyos formában káros, hatással van az emberi szervezetre [6]. Az oxigén azon vegyületeit, amelyek potenciálisan károsak, reaktív oxigénvegyületeknek nevezzük. Káros hatásuk abból adódik, hogy hajlamosak oxidálni más anyagokat. Ezen hatást hivatottak az antioxidáns anyagok ellensúlyozni.

#### 2.1.1 Szabadgyökök

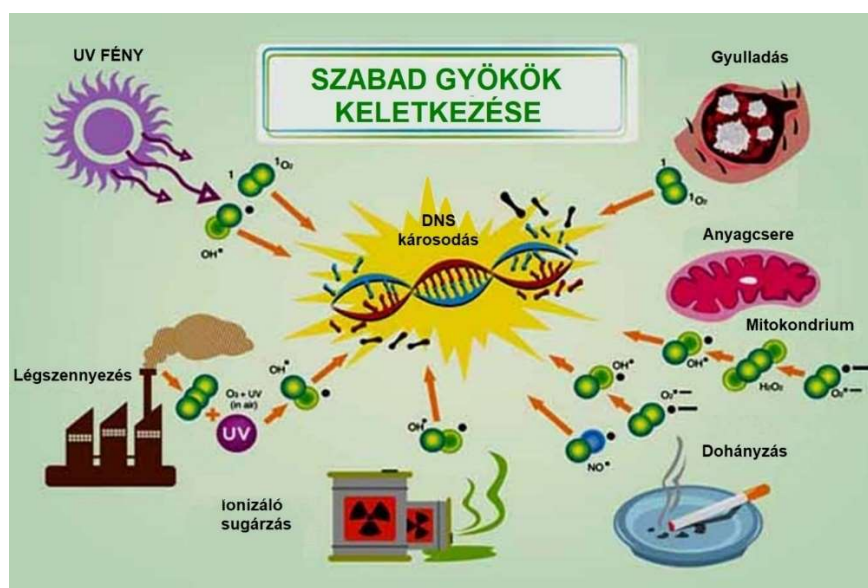
Szabad gyökként definiálható minden olyan molekula, amely önálló létezésre képes, valamint az atomi pályáján párosítatlan elektront tartalmaz [7]. A párosítatlan elektron jelenléte hasonló tulajdonsággal ruhazza fel a legtöbb szabad gyököt. Sok szabad gyökről elmondható, hogy nagyon reaktívak és instabilak. Redukálószerként és oxidálószerként is viselkedhetnek, mivel elektronokat adhatnak más molekuláknak, vagy elektront fogadhatnak el más molekuláktól [8]. Számos betegséget tekintve (pl. különböző légúti, neurodegeneratív és emésztőrendszeri betegségek) a kór okozói oxigén tartalmú szabad gyökök, mint pl. a hidroxilgyök ( $\bullet\text{OH}$  – pl. érelmeszesedés [9]), szuperoxid anion gyök ( $\text{O}_2^{\bullet-}$  - krónikus gyulladás, demencia [10]), hipoklorit ( $\text{HClO}_2^-$  - érelmeszesedés, rheumatoid artritisz [11]) [12]. Ezek a reaktív molekulák képesek a sejtmagban és a sejtek membránjában biológiailag releváns molekulákat például fehérjéket, szénhidrátokat, lipideket vagy akár a DNS-t károsítani [13]. A sejtkárosodás a szervezetben homeosztatis zavarokhoz vezet.

A szabad gyökök, más reaktív oxigén származékok (ROS, Reactive oxygen species) és a reaktív nitrogén fajták (RNS) származhatnak külső és belső forrásokból. Az antioxidánsok például származhatnak feldolgozott élelmiszerekből, légszennyező anyagokból, röntgen sugárzásból, ózomból, elektroszomból, ipari vegyszerekből – [14 - 16]) vagy az emberi szervezetben zajló normál anyagcsere-folyamatokból [6, 17]. A ROS-ok pedig keletkezhetnek endogén vagy exogén forrásokból. A ROS endogén forrásai közé tartoznak a különböző sejtszervek, például a mitokondriumok, a peroxisómák és az endoplazmatikus retikulum, ahol

az oxigénfogyasztás magas. A ROS exogén forrásai közé tartoznak a környezetszennyező anyagok, az alkohol, a dohányfüst, a nehézfémek, az ipari oldószerek, a peszticidek, bizonyos gyógyszerek és a sugárzás [18].

A ROS-ok egyik alosztálya az RNS, például a nitrogén-oxid és a peroxinitrát. Így például a különböző nitrogén-oxidból származó vegyületek, beleértve a nitroxil-aniont, a nitrozónium-kationt, a magasabb nitrogén-oxidokat, az S-nitrozotioleket és a dinitrozilvas-komplexeket [19]. Ezek a molekulák felelősek a nitrozatív stresszhez való hozzájáruláshoz. Az élő szervezetek minden aerob sejtje termeli ezeket a molekulákat [20]. Akkor keletkeznek, amikor az exogén vagy endogén módon előállított nitrogén-oxid kölcsönhatásba lép a reaktív oxigén fajtákkal, például a szuperoxiddal és hidrogén peroxiddal [21]. Alacsony és mérsékelt koncentrációban főszerepet játszanak a fiziológiás sejtfolymatokban, de magas koncentrációban káros hatással vannak a sejtkomponensekre, és fontos szerepet játszanak az időskori betegségekben. Az RNS-nek számos fiziológiai funkciója van, amelyek közé tartozik több jelátviteli útvonal szabályozása, hormonok termelése és az érrendszeri tónus fenntartása [22].

A szabad gyökök képződése enzimatis, valamint nem enzimatis reakciók következtében, folyamatosan megy végbe a sejtekben. A szabad gyökök forrásaként szolgáló enzimreakciók közé tartoznak pl. a fagocitózisban, a prosztaglandin szintézisben és a citokróom P-450 rendszerben részt vevő reakciók [23]. Szabad gyökök keletkezhetnek oxigén és szerves vegyületek nem enzimatis reakcióiban, valamint az ionizáló reakciók során is. A különböző szabadgyök keletkezését, különböző forrásait az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra: A szabad gyökök képződése, forrásai. Sematikus ismertető ábra [24]

### 2.1.2 A szabad gyökök élettani hatása

A szabad gyökök a szervezetben progresszív káros változásokat idéznek elő, amelyek az életkorral felhalmozódnak. Ezeket „normális” változásoknak tekintjük, mivel az életkorral egyre gyakoribbak. Azonban ezeket az általánosnak mondható károsodásokat, olyan genetikai és környezeti sajátosságokból adódó tényezők befolyásolják, amelyek növelhetik a szabad gyökök által okozott károkat. Ezek bizonyos életkorban genetikai és környezeti tényezők által meghatározott betegségeként manifesztálódnak. Napjaink két fő halálozási oka a rák és az érlemezésedés, kiemelt jelentőségű „szabad gyökök” által okozott betegségek.

Az oxidatív stressz kifejezést annak az állapotnak a leírására használják, amely akkor következik be, ha a szervezetben a szabad gyökök képződése és az antioxidáns védekezés közötti kritikus egyensúly felborul [25]. Az oxidatív stressz számos molekula károsodásával jár, beleértve a lipideket, fehérjéket és nukleinsavakat [26]. Rövid távú oxidatív stressz léphet fel többek között fertőzés, leégés, trauma, mérgező anyagok és túlzott testmozgás következtében sérült szövetekben. Ezek a sérült szövetek fokozzák a gyökképző enzimek (pl. lipogénáz, xantin-oxidáz, ciklooxygenáz) aktivitását, amely következtében végső soron jelentős mennyiségű ROS-t termel. A ROS szerepet játszik a diabetes mellitus, az életkorral összefüggő szembetegségek és a neurodegeneratív betegségek, például a Parkinson-kór indukciójában és szövődésében [27].

Fontos azonban megemlíteni, hogy a ROS-oknak nem csak negatív hatásai lehetnek az élő szervezetekre. *Brieger* és társai által publikált tanulmány [28] kifejti, hogy a ROS alacsony és közepes szintjei döntő szerepet játszanak a normális élettani folyamatokban, beleértve a jelátvitelt, a bioszintetikus folyamatokat és az immunműködést. A tanulmány kiemeli a ROS jelentőségét a különböző élettani folyamatokban, például a növekedésben, az apoptózisban, az immunrendszer működésében és a vérnyomás szabályozásában. A legújabb kutatások szerint, mint például *Diano* és társai kutatása [29], amely egy új hipotalamikus mechanizmust tárt fel, ami a melanokortin rendszer peroxiszóma-eredetű ROS-szabályozását foglalja magában. A cikk írója szerint ennek a ROS-függő útvonalnak a megcélzása új terápiás lehetőségeket nyújthat az elhízás kezelésére.

Az oxidatív stressz jelentős mértékben hozzájárul többek között a különböző gyulladásos betegségekhez (pl. ízületi gyulladás, vasculitis - érgyulladás, felnőttkori légúti betegségek) iszkémiás betegségek (szívbetegségek, stroke), hemochromatosis, gyomorfekély, magas vérnyomás, preeclampsia kialakulásához [30]. A túlzott oxidatív stressz hatására a

lipidek és fehérjék oxidálódnak, aminek hatására a szerkezetükben és funkciójukban változás következik be.

Az oxidatív stressz és a biomolekulák oxidatív károsodásához számos fiziológiai folyamat köthető, mint például az öregedés, az érlelmeszedés, a gyulladás és a karcinogenezis. A lipidperoxidáció egy szabad gyökökhöz köthető folyamat, amely során a lipidmolekula alakul át peroxigyökké. Ebből adódóan ez a reakció másodlagos forrás, a keletkező peroxigyök másodlagos hírvivő molekulaként működhet, közvetlenül reagálhat más biomolekulákkal ezáltal fokozza a biokémiai elváltozásokat. A lipidperoxidáció következtében számos vegyület keletkezik, például alkánok, malanoaldehid és izoprotánok. Ezeket a vegyületeket markerként használják lipid-peroxidációs vizsgálatokban, és számos betegségben igazolták meglétüket, mint például a neurodegeneratív betegségek vagy a cukorbetegség [31].

A különböző szívbetegségek továbbra is a legfőbb halálokok között szerepelnek, az összes halálozás körülbelül 50%-áért felelősek. A többszörösen telítetlen zsírsavak a vérben található alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) fő részeként fordulnak elő, és ezen lipid komponensek oxidációja létfontosságú szerepet játszik az érlelmeszedésben [32]. Az antioxidánsok, mint a B-karotin vagy az E-vitamin létfontosságú szerepet játszanak a különböző szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében.

A szabad gyökök által közvetített fehérjemódosítás növeli az enzimproteolízisre való érzékenységet. A különböző fehérjék oxidatív károsodása befolyásolhatja az enzimek, receptorok aktivitását és a membrántranszportot. Különböző kutatások [33, 34] eredményei azt mutatják, hogy a metionin, cisztein, arginin és hisztidin aminosav tartalmú fehérjék a leginkább érzékenyek az oxidációra [35]. A fehérjék oxidációja hatással van többek között a jelátviteli mechanizmusokra, az enzimaktivitásra, a hőstabilitásra, valamint a proteolízis érzékenységre megváltozását okozza, ami öregedéshez vezet.

Az emberi test folyamatosan küzd az öregedés ellen. *Ashbok* és munkatársa (1999) azt sugallják, hogy a sejtek szabadgyök-károsodása az öregedéssel kapcsolatos kóros elváltozásokhoz vezet [36]. Egyre több betegség vagy rendellenesség, valamint maga az öregedési folyamat mutat közvetlen vagy közvetett kapcsolatot ezekkel a reaktív és potenciálisan destruktív molekulákkal [37]. Az öregedés fő mechanizmusa a DNS-nek vagy a sejt- és funkcionális károsodások felhalmozódásának tulajdonítható [38]. A szabad gyökök mennyiségének csökkentése vagy képződési sebességük csökkentése késleltetheti az öregedést. A táplálkozási antioxidánsok egy része késlelteti az öregedési folyamatot és megelőzi a betegségeket. A kutatások azt sugallják [39], hogy a szabad gyökök jelentősen befolyásolják az öregedést, a szabadgyökök által okozott károk megfelelő antioxidáns védekezéssel

kontrollálhatók, és az antioxidáns anyagok optimális bevitele hozzájárulhat az életminőség javulásához. A legújabb kutatások azt mutatják [40], hogy az antioxidánsok akár pozitívan is befolyásolhatják az élettartamot.

### 2.1.3 Az antioxidánsok

Az antioxidáns egy olyan molekula, amely elég stabil ahhoz, hogy elektront adományozzon a tomboló szabad gyököknek, és semlegesítse azokat, így csökkentve azok sejtkárosító képességét. Ezt viccesen próbálja szemléltetni a 2. ábra. Az antioxidánsok képesek késleltetni vagy gátolni a sejtkárosodást elsősorban szabad gyökfogó tulajdonságuk révén [41]. Hatásmechanizmusukat tekintve sokféle módon befolyásolhatják az egészséges sejtek oxidációját, pl. megköthetik a fémionokat, kiolthatják a szingulett oxigént vagy megkötik a szabad gyököket [42]. Az antioxidáns vegyületek többsége az utóbbi hatásmechanizmus alapján működik. Általánosságban elmondható, hogy szerves vegyületek, de találunk közöttük fémeket és fémorganikus komplexeket is. A fentieket figyelembe véve elmondható, hogy az antioxidánsoknak sok különböző fajtája van, valamint ezek általában nem önmagukban, hanem egymással együttműködve fejtik ki redukáló hatásukat.



**2. ábra:** Sematikus ábra, hogyan hatástalanítja az antioxidáns a szabadgyököt, mielőtt az kárt tenne egy sejtben [43]

Fontos megjegyezni, hogy a szervezetünk is képes néhány antioxidáns anyagot előállítani (pl. glutation, az ubiquinol és a húgysav), azonban szükséges, hogy ezeket az anyagokat mi is bevigyük be a szervezetünkbe. Ezek az antioxidánsok együtt már egy igen erős védelmi vonalat képeznek a szervezetünkben. Ilyen anyagok például a: C-vitamin; A-vitamin; flavonoidok; rezveratrol; telítetlen zsírsavak stb. [44,45].

### 2.1.3.1 Az antioxidánsok története

Az antioxidáns kifejezést eredetileg olyan vegyi anyagokra használták, amelyek megakadályozzák az oxigénfogyasztást. A XIX. század végén, a XX. század elején kiterjedt tanulmányokat szenteltek az antioxidánsok ipari folyamatokban való felhasználásának. Vizsgálták a fémkorrózió megelőzésében és az üzemanyagok polimerizációjában betöltött szerepét [39]. Az antioxidánsok biokémiában betöltött szerepével foglalkozó korai kutatások a telítetlen zsírok oxidációjának megelőzésére összpontosítottak, lényegében az avasodás okát kutatták [46]. Az antioxidáns aktivitást egyszerűen úgy lehetett mérni, hogy a zsírt egy zárt edénybe helyezük oxigénnel, és megmérjük az oxigénfogyasztás mértékét. Az A-, C- és E-vitamin antioxidánsként való azonosítása azonban forradalmasította a területet, és elvezetett az antioxidánsok fontosságának felismeréséhez az élő szervezetek biokémiájában [47, 48]. Az antioxidánsok lehetséges hatásmechanizmusait először akkor tárták fel, amikor felismerték, hogy egy antioxidáns hatással rendelkező anyag valószínűleg olyan anyag, amely maga is könnyen oxidálódik [49]. *Wolf* és munkatársai [50] felismerték, hogy az E-vitamin úgy képes megakadályozni a lipid peroxidációt, hogy megköti a ROS-t, mielőtt károsíthatná a sejteket.

### 2.1.3.2 Az antioxidánsok hatásmechanizmusa

Az antioxidánsok esetében két fő hatásmechanizmust különböztetünk meg [51]. Az első egy láncbontó mechanizmus, amellyel az elsődleges antioxidáns egy elektront adományoz a rendszerekben jelen lévő szabad gyököknek. A második mechanizmus során az antioxidáns a láncindító katalizátort oltja ki. Ezen felül az antioxidánsok különböző mechanizmusok révén is kifejthetik hatásukat a biológiai rendszerekre, ide tartozik a fémion-kelátok kialakulásában játszott szerepük, a társantioxidánsok aktiválása vagy a génexpresszió szabályozása [52].

Az első védelmi vonalat a megelőző antioxidánsok jelentik, amelyek elnyomják, megelőzik a szabad gyökök képződését. Bár az *in vivo* gyökképződés pontos mechanizmusa és helye még nem teljesen tisztázott, a hidroperoxidok és a hidrogén-peroxid fémek által indukált bomlása az egyik fontos forrása. Az ilyen reakciók visszaszorítása érdekében egyes antioxidánsok a hidroperoxidokat és a hidrogén-peroxidot előzetesen alkoholokká, illetve vízzé redukálják anélkül, hogy szabad gyökök keletkeznének, és egyes fehérjék fémionokat kötnek meg.

A második védelmi vonalat azok az antioxidánsok jelentik, amelyek megkötik az aktív gyököket, hogy elnyomják a láncindítást és/vagy megtörjék a lánc terjedési reakcióit. Különböfélé



gyökfogyó antioxidánsok ismertek: egyesek hidrofilek, mások lipofilek. A C-vitamin, a hógysav, a bilirubin, az albumin és a tiolok hidrofil gyökfogyó antioxidánsok, míg az E-vitamin és az ubikinol lipofil gyökfogyó antioxidánsok. Az E-vitamint a legerősebb lipofil gyökfogyó antioxidánsnak tartják.

A harmadik védelmi vonal a javító és de novo antioxidánsok. A szervezetben jelenlévő proteolitikus enzimek, proteinázok, proteázok és peptidázok felismerik, lebontják és eltávolítják az oxidatíván módosított fehérjét, és megakadályozzák az oxidált fehérjék felhalmozódását. A DNS-javító rendszerek fontos szerepet játszanak az oxidatív károsodások elleni teljes védekezési rendszerben is. Különböféle enzimek, például glikozilázok és nukleázok helyreállítják a sérült DNS-t.

A negyedik védelmi vonal az adaptáció, amikor a szabad gyökök képződésére és reakcióira vonatkozó jel indukálja a megfelelő antioxidáns képződését és szállítását a megfelelő helyre, hogy ott kifejthesse jótékony hatását [53].

#### *2.1.4 Az antioxidánsok fajtái*

A sejteket antioxidáns enzimek kölcsönhatásba lépő hálózata védi az oxidatív stressz ellen [54]. Az antioxidánsok fajtáit tekintve megkülönböztetünk enzimátikus és nem enzimátikus antioxidánsokat.

##### *2.1.4.1 Enzimátikus antioxidánsok*

A szuperoxid-diszmutáz enzimek (SOD-k), katalizálják a szuperoxid-anion oxigénre és hidrogén-peroxiddá történő lebomlását [55, 56]. A SOD enzimek szinte minden aerob sejtben és extracelluláris folyadékban jelen vannak [57]. A szuperoxid-diszmutáznak három nagy családjá van a fém kofaktorától függően: Cu/Zn (amely megköti a rézet és a cinket is), a Fe és Mn típusok (amelyek megkötik a vasat vagy a mangánt), végül a Ni-típus, amely megköti a nikkelt [58].

A kataláz enzim szinte minden élő szervezetben megtalálható, a hidrogén-peroxid vízzé és oxigénné történő bomlását katalizálja [59]. A hidrogén-peroxid számos normál anyagcsere-folyamat káros mellékterméke: a károsodás megelőzése érdekében gyorsan át kell alakítani más, kevésbé veszélyes anyagokká. Ebből a célból a sejtek gyakran használják a katalázt a hidrogén-peroxid kevésbé reakcióképes oxigén- és vízmolekulákká történő bomlásának gyors katalizálására [60, 61].

A glutation rendszer magában foglalja a glutationt, a glutation-reduktázt, a glutation-peroxidázokat és a glutation S-transzferázokat. Ez a rendszer állatokban, növényekben és mikroorganizmusokban található [62]. A glutation-peroxidáz négy szelén-kofaktort tartalmazó enzim, amelyek katalizálják a hidrogén-peroxid és a szerves hidroperoxidok lebomlását [63]. Ezek az enzimek különösen magas szinten vannak a májban, és a méregtelenítő anyagcserében is szerepet játszanak [64].

#### 2.1.4.2 Nem enzimátikus antioxidánsok

Az aszkorbinsav vagy „C-vitamin” egy monoszacharid antioxidáns, amely állatokban és növényekben egyaránt megtalálható. A C-vitamin egy esszenciális vitamin, mivel az emberi szervezet nem képes szintetizálni, a táplálékkal kell bevinni [65, 66]. Az aszkorbinsav redukálószer, és képes redukálni és ezáltal semlegesíteni a ROS-t, például a hidrogén-peroxidot [67]. Közvetlen antioxidáns hatásai mellett az aszkorbinsav az aszkorbát-peroxidáz antioxidáns enzim szubsztrátja is, amely funkció különösen fontos a növények stresszrezisztenciájában [68].

A melatonin (más néven N-acetil-5-metoxi-triptamin) [69], egy természetesen előforduló hormon, amely állatokban és néhány más élő szervezetben, köztük az algákban is megtalálható [70]. A melatonin egy erős antioxidáns, amely könnyen átjut a sejtmembránokon és a vér-agy gáton [71]. Más antioxidánsokkal ellentétben a melatonin nem megy át redox cikluson, ami a molekula azon képessége, hogy ismételt redukción és oxidáción menjen keresztül. Az oxidált melatonin nem redukálható vissza korábbi állapotába, mert a szabad gyökökkel reagálva több stabil végterméket képez. Ezért terminális vagy öngyilkos antioxidánsként emlegetik [72].

Az E-vitamin a nyolc rokon tokoferolból és tokotrienolból álló csoport gyűjtőneve, amelyek antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező zsírban oldódó vitaminok [73]. Ezek közül az  $\alpha$ -tokoferolt tanulmányozták a legtöbbet, mivel ennek a legmagasabb a biológiai hozzáférhetősége, és a szervezet elsősorban ezt a formát szívja fel és metabolizálja [74]. *Traber* és munkatársai (1999) kutatásai alapján az  $\alpha$ -tokoferol forma a legfontosabb lipid oldható antioxidáns, és megvédi a membránokat az oxidációtól azáltal, hogy reagál a lipidperoxidációs láncreakcióban keletkező lipid gyökökkel [75]. Ez eltávolítja a szabadgyök intermediereket, és megakadályozza a terjedési reakció folytatását. Ez a reakció oxidált  $\alpha$ -tokoferoxil-gyököket hoz létre, amelyek más antioxidánsok, például aszkorbát, retinol vagy ubikinol redukálásával visszaforgathatók az aktív redukált formába [76].

A Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karbonsav) az  $\alpha$ -tokoferol hidrofíli analógja, a tokoferolok legaktívabb és leggyakoribb formája az emberi szervezetben. A Trolox az  $\alpha$ -tokoferollal azonos antioxidáns hatást mutat [77], de a lipidben oldódó  $\alpha$ -tokoferolhoz képest hiányzik belőle a fitilfarok, jobban oldódik vízben, és előnye, hogy a sejtek víz- és lipid kompartmentjébe is eljut [78 - 80]. A Trolox a peroxil és alkoxil gyökök magas gyökfogó aktivitásukról ismertek [81], és mint ilyenek, gyakran használják őket referenciaként számos biokémiai vizsgálatban, amelyekben a vizsgált vegyületek gyökfogó aktivitását Trolox ekvivalensekben fejezik ki. Kimutatták, hogy erős antioxidánsként működik számos sejtmodell rendszerben [82 - 85]. Bár a Trolox erős antioxidáns hatással rendelkezik, bizonyos körülmények között prooxidáns (szabadgyök jellegű) tulajdonságokat is mutathat, amint azt más antioxidáns vegyületeknél is megfigyelték, beleértve az  $\alpha$ -tokoferolt [86, 87]. Az  $\alpha$ -tokoferolhoz hasonlóan a Trolox antioxidáns aktivitása abból fakad, hogy a kromanol gyűrű hidroxil csoportjából [88] hidrogént képes átadni reaktív anyagoknak. Ez viszont a fenoxilgyök (PhO) képződését idézi elő, amely az aszkorbátot és más biomolekulákat gyökökké oxidálhat [89]. Számos tanulmány kimutatta, hogy a Trolox prooxidáns tulajdonságokkal rendelkezik szabad fémionok jelenlétében [89, 90].

A galluszsav (GA) és származékai, például a lauril-gallát, propil-gallát, oktil-gallát, tetradecil-gallát és hexadecil-gallát a növényi metabolitok fenolos savai, amelyek széles körben elterjedtek a növényvilágban [91]. Számos polifenol közül a GA egy kis molekulatömegű trifenolos vegyület, kiváló gyulladásgátló és antioxidáns hatással [92]. Ezen kívül a GA-nak számos nyilvánvaló farmakológiai hatása is van, beleértve a daganatellenes, antibakteriális, antimikrobiális hatással, valamint cukorbetegség és elhízás ellen is hatékony [93 - 97]. Hatásmechanizmusát tekintve, csökkenti az oxidatív stressz káros következményeit oly módon, hogy az enzimikus antioxidánsok aktivitását növeli és/vagy a nemenzimikus antioxidánsok szerepe (pl. a C-vitamin, az E-vitamin) szintjét emeli [98, 99].

#### *2.1.5. A növények, mint az antioxidáns molekulák forrásai*

A növények védekező rendszerként kifejlesztették azt a tulajdonságot, hogy antioxidánsokat termelnek. Ennek az az oka, hogy biotikus és abiotikus stressz hatására megnő a ROS termelés a növényekben, felborul az antioxidáns – szabad gyök egyensúly, oxidatív stressz áll fenn. Az oxidatív stressz hatására a növényekben különböző antioxidánsok (pl. C-vitamin, E-vitamin, fenolsav stb.) másodlagos metabolitjainak termelése és felhalmozódása indul meg. Alapvetően két fő oka van annak, hogy a növények szintetizálják és felhalmozzák

ezeket a nem enzimes antioxidánsokat. Az első fő ok a már említett válaszreakció a környezeti stresszviszonyokra. A második fő ok, hogy ezek a másodlagos metabolitok a növények normál élettani funkcióik ellátásához szükséges kémiai anyagok metabolitjai is, általában ezek szükségesek, hogy megvédjék magukat a mikrobiális kórokozóktól, állatoktól és más növényevőktől [100, 101].

A növények fenolos vegyületeket is felhalmoznak. A fenolok erős gyökfogó képességük révén védelmet nyújtanak az UV-sugárzás ellen is. Ezen túlmenően enzim inhibitoroként is funkcionálnak, miközben képesek távol tartani a növényevőket, valamint rezisztenciát biztosítanak a kórokozókkal szemben [102]. Ismeretes, hogy a flavonoidok szintézisét UV-stressz vagy alacsony hőmérséklet és alacsony tápanyagkörülmények indukálják, ami az UV-elnyelő, gyökfogó képességüknek tudható be [103 - 105]. Azt is megfigyelték, hogy a trópusi és/vagy magas tengerszint feletti magasságban termő növények nagyobb arányban tartalmaznak flavonoidokat, mint a mérsékelt égövi körülmények között, a túlzott fény- vagy UV-sugárzás miatt [106].

Tekintettel a különféle halálos betegségek kockázati tényezőinek növekedésére, globális tendencia figyelhető meg a gyógynövényekben és az étrendben előforduló természetes anyagok terápiás antioxidánsként történő felhasználása felé. Beszámoltak arról, hogy fordított összefüggés van az antioxidánsokban gazdag élelmiszerek és gyógynövények étrendi bevitele és az emberi betegségek előfordulása között. *Furuta* és munkatársai (1997) számos zöldség, például burgonya, spenót, paradicsom és hüvelyesek antioxidáns potenciálját tanulmányozták [107], míg *Wang* és munkatársai különböző gyümölcsök (bogyós gyümölcsök, cseresznye, citrusfélék, aszalt szilva, olajbogyó) esetében mutioxidáns hatást mutattak ki [108]. *Lin* és munkatársai a zöld és fekete teák antioxidáns tulajdonságait tanulmányozták, arra jutottak, hogy a száraz tömegük akár 30%-át is tartalmazhatják fenolos vegyületként, ebből adódóan kiemelkedő antioxidáns hatással rendelkeznek [109].

### 2.1.6 Antioxidáns-kapacitás mérő módszerek

Az antioxidáns kapacitás a vizsgált rendszerre vonatkozó összes antioxidáns vegyület együttes szabadgyökfogó aktivitását jelenti. Napjainkban ennek pontos meghatározására, számszerűsítésére egy nagyobb az igény, így számos analitikai eljárást, mérés technikát dolgoztak ki. Ezen módszerek módosítása, finomítása folyamatosan zajlik, így napjainkra az alkalmazott módszerek száma már meghaladja a százat. A legtöbb irodalom nemcsak egy, hanem többféle módszert használ az antioxidáns kapacitás meghatározására [110].

Antioxidáns kapacitás mérése során két fő mérési módszer típust különböztetünk meg. Mind a két méréstípus antioxidáns kapacitást határoz meg, viszont a kapott eredményeknek nem kell szükségszerűen egymással korrelálni, hiszen egy minta redukálóképessége nem feltétlen függ össze a gyökbefogó képességével.

Az elektronátmenettel járó reakciók színváltozással járnak, ennek mértékéből lehet az antioxidáns kapacitásra következtetni. A módszerek lényege, hogy létrehoznak egy szabad gyököt egy reakción keresztül. Ehhez a szabad gyökhöz adják hozzá az antioxidánst különböző hígítások mellett, a reakció színváltozással jár, amit pl. spektrofotométer segítségével könnyedén nyomon követünk. A kapott eredményekből kiszámoljuk a vizsgált anyag antioxidáns kapacitását.

A hidrogén átmenettel járó módszerek a reakció kinetikán alapszanak. A tesztek azt mérik, hogy egy adott szabadgyökkel szemben milyen a vizsgált anyag szabadgyökbefogó képessége.

A humuszanyagok (HSs) antioxidáns hatásának vizsgálata során több, különböző módszerrel vizsgáltam a frakciókat, hogy a mért eredmények jobban összehasonlíthatóak legyenek az irodalmi adatokkal, valamint pontosabb képet fessenek a HSs antioxidáns tulajdonságairól.

### **Legelterjedtebb antioxidáns kapacitás mérési módszerek**

Elektron átmeneten alapuló antioxidáns mérési módszerek

- Vasredukáló képesség meghatározása (FRAP)
- Összes polifenol meghatározás (TPC)
- Rézion redukálóképesség meghatározása (CUPRAC)
- Troloxra vonatkoztatott kapacitás meghatározása (TEAC)
- DPPH gyökfogó aktivitásán alapuló vizsgálat

Hidrogén átvitelén alapuló, antioxidáns kapacitást mérő módszerek.

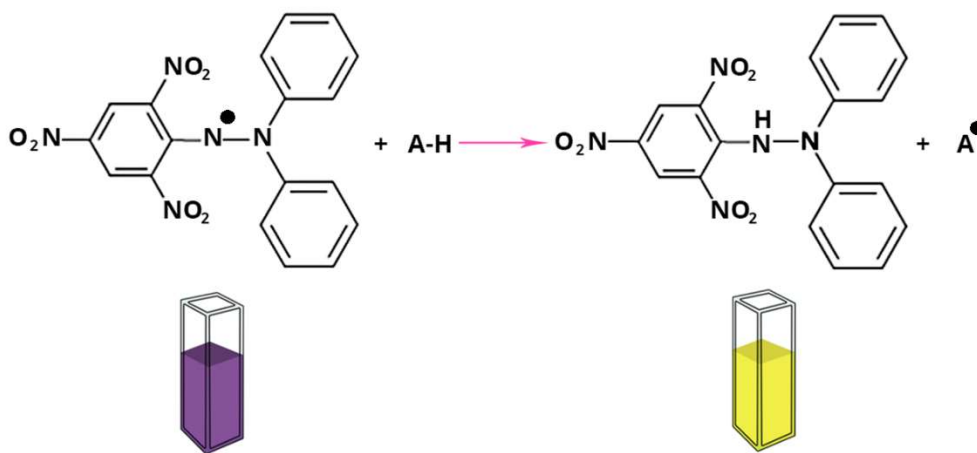
- Oxigéngyök abszorpciós kapacitása (ORAC)
- Összes peroxilgyök mérés (TRAP)
- Kemilumineszcencián alapuló módszerek (CL)
- Fotokemilumineszcenciás mérések (PCL)
- Elszíneződésen alapuló módszerek

### 2.1.7. Elektron átmeneten alapuló (ET) módszerek

Az elektronátmenettel (Electron Transfer) járó reakciók színváltozással járnak, ennek mértékéből lehet a tesztelendő anyag antioxidáns kapacitására következtetni. A legtöbb módszer lényege, hogy létrehoznak egy labilis szabad gyököt, ehhez a szabad gyökhöz adják hozzá a gyök bomlását gátló antioxidáns molekulát, kölcsönhatásuk az időbeni színváltozás sebességének megváltozásával jár, amit egy műszer segítségével nyomon követünk és utána a kapott eredményekből kiszámoljuk a vizsgált anyag antioxidáns kapacitását.

#### 2.1.7.1 DPPH módszer

A DPPH (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil-gyök) módszer egy spektrofotometriás technika, ahol a 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. Ezt a folyamatot a 3. ábra szemlélteti. A DPPH molekula egy stabil gyök, amely korlátozott mértékben képes a kivonatok antioxidáns aktivitásának mérésére.



3. ábra. A DPPH módszer sematikus szemléltetett ábrája [111]

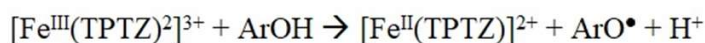
Széles körben alkalmazzák ezt a módszert, mert a DPPH gyök kereskedelmi forgalomban kapható, stabil, kevésbé reakcióképes és kevésbé agresszív, ami a lezajló reakciók során hasznosnak bizonyul (bomlás, érzékenység nem jelent problémát, mint egyéb módszereknél), valamint a mérés kivitelezése egyszerű. Hátránya, hogy nem a sejten belül normál anyagcsere során keletkező gyököt használ, valamint a szterikus hatások miatt alábecsüli a nagy molekulájú antioxidánsokat, a kis reaktív vegyületeket azonban felerősíti [112]. Bár a DPPH

gyök kiválóan oldódik szerves oldószerekben (különösen alkoholokban), nagyon gyengén oldódik poláris oldószerekben, ami létfontosságú hátrány, amikor a hidrofíl antioxidánsok hatékonyságát próbáljuk értelmezni. A szterikus hozzáférhetőség jelentős szerepet játszik a reakcióban, és a kis molekulájú vegyületek jobban hozzáférhetnek a gyök helyéhez, ami nyilvánvalóan magasabb antioxidáns aktivitást eredményez a nagy molekulájú vegyületekhez képest. Ezt a módszert alkalmazva nem lehet képet kapni arról, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak [113, 114].

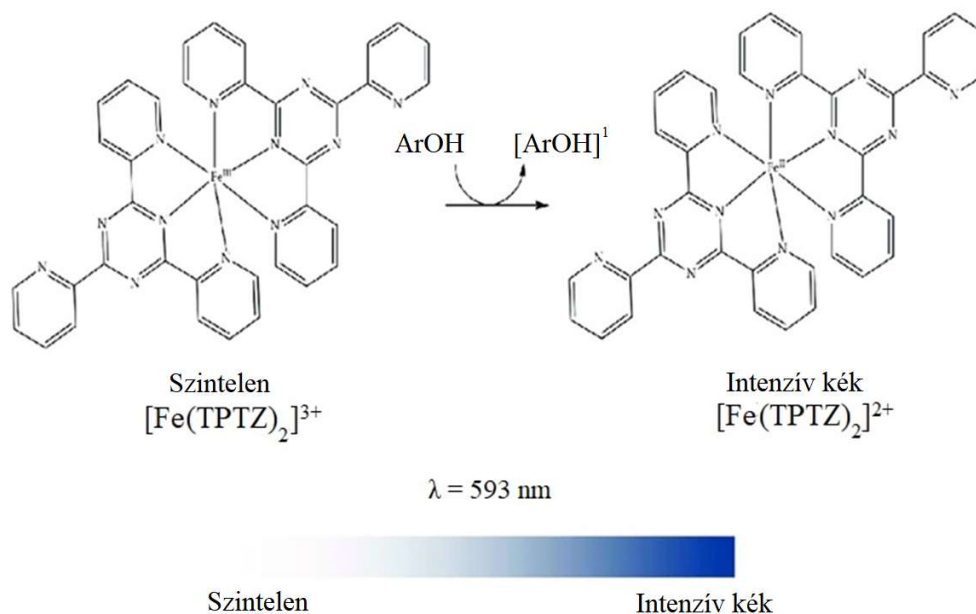
#### 2.1.7.2 FRAP módszer (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

A FRAP módszer egy elektron átvitelre alapuló módszer. A FRAP értékek meghatározása *Benzie* és *Strain* módszere [115] alapján történt. A FRAP módszer lényege, hogy a ferri- $(\text{Fe}^{3+})$ -ionok az antioxidáns aktivitású vegyületek hatására ferro- $(\text{Fe}^{2+})$ -ionokká redukálódnak, melyek alacsony pH-n a tripiridil-triazinnal (TPTZ= 2,4,6 tripiridil-S-triazin) komplexet képezve színes termékeket adnak (ferro-tripiridil triazin). Ezt a folyamatot hivatott bemutatni a 4. ábra.

Kémiai reakció:



Reakció mechanizmus



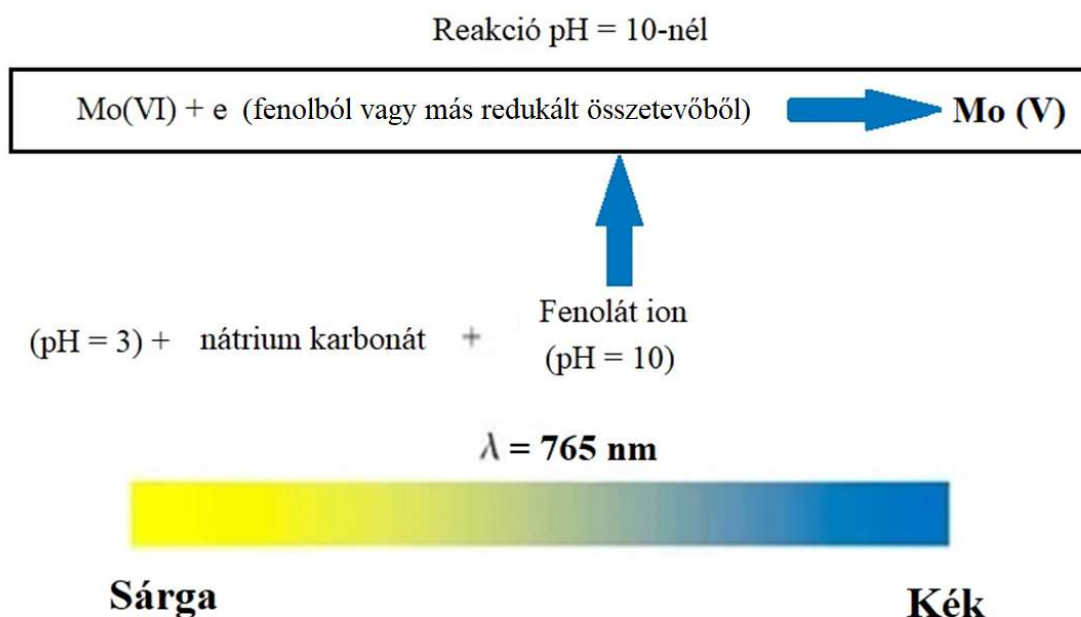
**4. ábra.** A FRAP módszer szemléltetett ábrája [116]

A HSs vizsgálata során a FRAP módszer azért tűnt megfelelőnek, mivel könnyedén nyomon követhető, egyszerűen reprodukálható, valamint gyakran használják különböző növények, növényi metabolitok antioxidáns tulajdonságának vizsgálatára [117, 118]. A módszer hátránya, hogy nem képes kimutatni a lassan reagáló polifenol vegyületeket és tiolokat. Hamis pozitív eredményeket indukálhat, mivel még a  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -nál alacsonyabb redoxpotenciálú nem oxidáló vegyületek is hozzájárulhatnak a FRAP érték növekedéséhez [119].

### 2.1.7.3 TPC módszer (Total Phenolic Contents)

Egy adott minta összes fenol tartalma jó közelítést ad arról a tényről, hogy az adott minta mennyire jó antioxidáns. Az összes fenol tartalom meghatározása többféleképpen lehetséges, a HSs vizsgálata során a *Vattem* és *Shetty* (2003) által kidolgozott módszer [3] bizonyult a legjobbnak, mivel kísérleteik során tőzegáfonyából kivont ellagsavat vizsgáltak, ami egy bioaktív polifenol vegyület, amely másodlagos metabolitként a természetben számos növényi taxonban fordul elő [120]. A módszer lényege, hogy a reakció elegyben használt Folin – Ciocalteu reagens (Folin reagens) változtatja a színét a reakció lejátszódása során. Sárga színből kék színűvé válik. Ennek oka, hogy Folin reagensben a molibdén oxidációs száma 6, azonban a reakció lejátszódás után a molibdén redukálódik és 5-ös oxidációs száma lesz, ami az említett színváltozással jár. Azonban, ha fenol tartalmú vegyületet (antioxidánst) adunk a reakció elegyhez, az beindítja ezt a folyamatot. Ezt a színváltoztatást nyomon követve és mérve következtethetünk, arra, hogy mennyi fenol csoport van a vizsgált anyagban, ezt a folyamatot az 5. ábra mutatja be. A módszer előnyei közé tartozik, hogy ez egy egyszerű és könnyen reprodukálható módszer, azonban számos hátránya van, érzékeny a pH- és hőmérsékletváltozásokra, és az esetleges interferencia zavarhatja a mérést. A módszer hátránya továbbá, hogy nem specifikus a fenolos vegyületekre, mivel reakcióba lép, a redukáló cukrokkal, az aszkorbinsavval, egyes átmeneti fémekkel, ami torzítja a mintában lévő TPC valós értékét. A módszer előnye továbbá, hogy sok irodalmi adat áll rendelkezésre, amivel összehasonlíthatóak saját eredményeink.





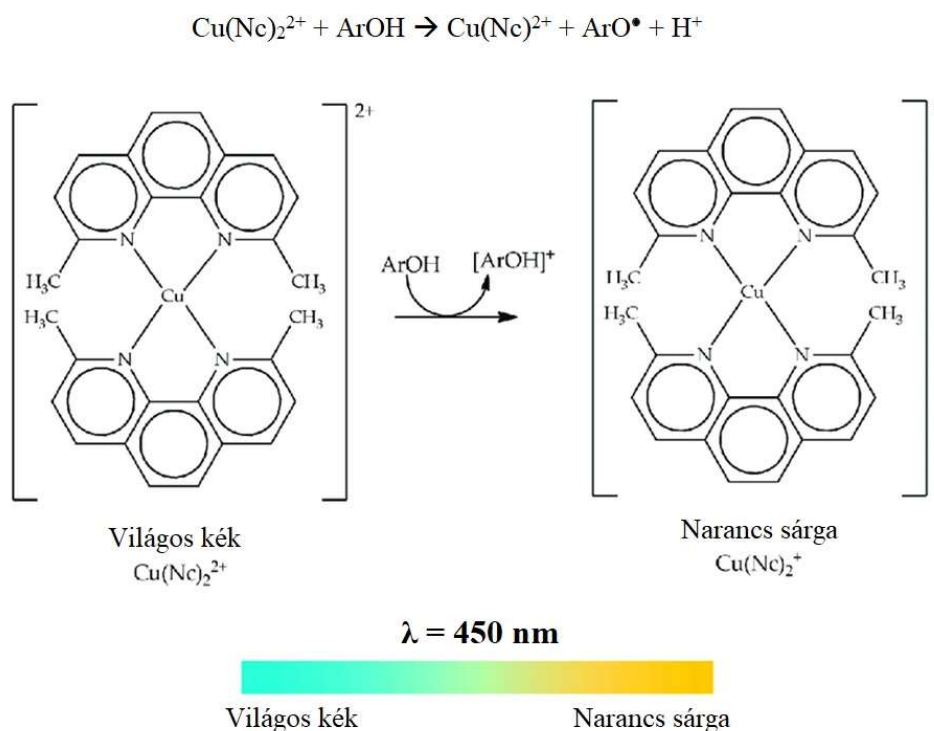
5. ábra. A TPC módszer sematikus szemléltetett ábrája [116]

#### 2.1.7.4 CUPRAC módszer (Cupric ion reducing antioxidant capacity)

A CUPRAC módszer kifejlesztése *Karadirek* és munkatársai [121] nevéhez fűződik, eredetileg az élelmiszerekre alkalmazták (sárgabarack, gyógyteák, vad ehető növények, füves sajt stb.), de mára számos módosított változata létezik, köztük egy, ami kifejezetten a HSs mérésére lett kifejlesztve. A módszer lényegében redukálóképességet határoz meg 7-es pH-n 450 nm-en. Lényege, hogy a réz(II)-neocuproine kelát az antioxidánssal történő redukciója során réz(I)-neocuproine keláttá redukálódik, ami közben kékről, narancssárgára változik a színe. Ez a színváltozás nyomon követhető 450 nm-en és a mért értékekből következtetni lehet arra, hogy a vizsgált anyag mennyire „jó” antioxidáns. Ezt a reakciót és a hozzátartozó színváltozást a 6. ábra szemlélteti.

A módszer hátránya, hogy olyan vegyületek esetében, mint az E-vitamin, C-vitamin, a GA, néhány percet vesz igénybe a reakció, míg összetett szerkezeteknél 30-60 percet vesz igénybe. Emiatt gondot okozhat komplex vegyületek esetén, hogy a megfelelő végpontot kell kiválasztani a reakció befejeződéséhez, különben megtévesztő eredményeket kaphatunk. Más elektrontranszfer alapú antioxidáns vizsgálatokkal (például TEAC, DPPH, FRAP) szemben a CUPRAC kiemelkedő előnye a fiziológiás pH-hoz közeli reális pH-értéke, a kedvező redoxpotenciál, a reagensek hozzáférhetősége és stabilitása, rugalmassága, egyszerűsége. A módszer alacsony költségű és alkalmazható lipofil antioxidánsokra, valamint hidrofilekre [122,

123]. A CUPRAC módszer ezen felül alkalmazható az antioxidánsok viszonylag széles koncentrációtartományában [124].



**6. ábra.** A CUPRAC módszer szemléltetett ábrája [116]

#### 2.1.7.5 Módosított CUPRAC módszer

Érdemes megjegyezni, hogy a CUPRAC módszer nem pusztán egy antioxidáns minta teljes antioxidáns kapacitását méri, hanem számos más módosított gyökfogó vagy aktivitás/kapacitás mérési tesztet is eredményez, amelyek hasznosak lehetnek az antioxidánsok kutatásában [125 - 129]. A huminsavakra (HAs) módosított QUENCHER-CUPRAC módszert is ugyanezen kutatócsoport alkotta meg [130], a lényeges különbség az eredeti CUPRAC és ezen módosított módszer között, hogy utóbbi szilárd mintát mér be, míg előbbi egy folyadék mintát. Így kiküszöbölhető a HAs oldatok koncentráció különbsége, ez által az oldat színe okozta zavarás.

#### 2.1.8 Hidrogén átvitelén alapuló (HAT, Hidrogen Atom Transfer) módszerek

Hidrogén átmenettel járó módszerek a reakció kinetikán alapszanak. A tesztek azt mérik, hogy egy adott szabadgyökkel szemben a minta mennyire hatásos, milyen a szabadgyök

befogóképessége. Ilyen módszer például az összes peroxilgyök mérésének (TRAP) módszere, amelyet *Wayner* és munkatársai [131] fejlesztették ki. Peroxilgyök generálóként ABAP-ot (2,2'-azobis-2-amidinopropán) használtak. A szabadgyökök oxidáló hatását az antioxidánsok késleltetni tudják, az oxidáció pedig az oxigénfogyással nyomon követhető. A mérés során ún. lag görbe figyelhető meg, ennek az indukciós időnek a hosszát (lag fázis hossza) ismert koncentrációjú Trolox oldat lag fázis hosszával hasonlítják össze, amelyből az antioxidáns kapacitásra lehet következtetni. Az elmúlt 20 évben ez a módszer volt a legelterjedtebb, majd rámutattak arra, hogy az oxigénelektrod a megkövetelt időtartam alatt instabil, ezért a végpontjelzés pontatlan. Ennél a módszernél lag fázis figyelhető meg, de lefutásának jellege eltérő a különböző minták esetében, ami problémát okozhat az antioxidáns kapacitás meghatározásánál, illetve összehasonlításánál. A módszer lassú, időigényes, valamint nagymértékű hígítás szükséges a megfelelő lag fázis alak eléréséhez, ezzel viszont nő a hibalehetőség. Emellett a nagy hígulás miatt fizikailag nehézkessé válik a zsírsavak közötti láncreakciók lezajlása. A méréseknél a fehérjék jelenléte is interferenciát okozhat, hiszen például a fehérjék szulfhidril csoportjai részt vesznek a redox egyensúlyban és módosítani képesek az eredményeket [110].

#### 2.1.8.1 ORAC

Az ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) módszert 1993-ban *Cao* és munkatársai fejlesztettek ki a másodlagos antioxidánsok teljes antioxidáns kapacitásának mérésére [132]. A módszer lényegében a *DeLange* és *Glaze* által 1989-ben kifejlesztett peroxigyökök fluoreszcencia módszerén alapul [133], és ez az egyik leggyakrabban használt antioxidáns aktivitási vizsgálat a kutatásban és az élelmiszeriparban [134]. A módszer sematikus szemléltetése a 7. ábrán látható. Ebben a vizsgálatban a B-fikoeritrin (B-PE), a Porphyridium cruentumból, egy vörös algafajból izolált fehérje volt a kiválasztott fluoreszcens próba. A B-PE fluoreszcenciájának csökkenése a peroxilgyökkel való reakciójából eredő károsodás mértékét jelzi. Az antioxidáns védőhatását úgy mérjük, hogy a minta fluoreszcencia-bomlási görbéje (AUC) alatti területet értékeljük a vakpróbaéhoz képest, amelyben nincs antioxidáns.

A teszt azon az elképzelésen alapul, hogy egy oxigényököket termelő vegyület (2,2'-azobisz(2-amidinopropan) -dihidroklorid) ROS-t termel, amely képes a fluoreszcéint oxidálni. Ez egy erősen fluoreszkáló vegyület, míg oxidációs terméke nagyon gyenge fluoreszcenciával rendelkezik. Emiatt az oldat fluoreszcenciája idővel csökken, mivel a ROS oxidálja a

fluoreszceint. Ha antioxidánst adunk a vizsgálathoz, az antioxidáns reakcióba lép a ROS-okkal, ami ezért késlelteti a fluoreszcein oxidációját az antioxidáns felhasználásáig (7. ábra).

Előnyei közé tartozik, hogy sokoldalú technika, hasznos összetett mátrixokban, valamint reprezentatív szabad gyököt használ. A hátránya azonban az, hogy ehhez fluorométerekre van szükség, amelyek nem biztos, hogy rutinszerűen elérhetők az analitikai laboratóriumokban, valamint érzékeny a hőmérsékletváltozásokra, ami csökkenti a reprodukálhatóságot [135]. Hátrányai közé tartozik még, hogy a B-PE nem fotostabil, így gerjesztő fénysugárzás hatására is elbomolhat, valamint reakcióba is léphet különböző polifenollokkal a nem specifikus fehérjekötés miatt.

A fenti hátrányokat figyelembe véve a HSs antioxidáns kapacitásának meghatározása *Ou* és munkatársai által leírt módszerrel történt [136], ők ugyanis egy stabilabb fluoreszcens próbát javasoltak, a fluorescein molekulát. Így az általam javasolt módszer más népszerű antioxidáns aktivitási módszerekkel ellentétben közvetlenül méri a hidrofil láncbontó antioxidáns kapacitást a peroxigyökkel szemben. Az AOC érték a fluoreszcein kioltási görbéje alatti nettó védőterületre vonatkozott antioxidáns jelenlétében, amely az alábbi képlet (1) alapján számolható:

$$AOC = \frac{AUC_{HS} - AUC_{Control}}{AUC_{Trolox} - AUC_{Control}} * [Trolox] \quad (1)$$

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{35}/f_0 \quad (2)$$

*Ahol:*

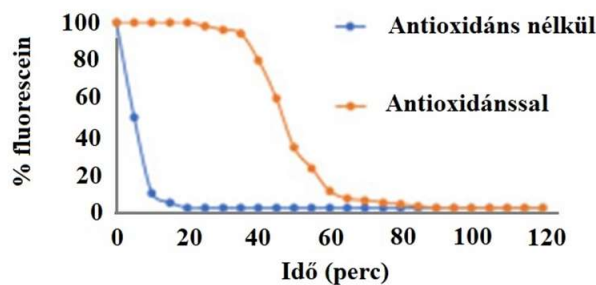
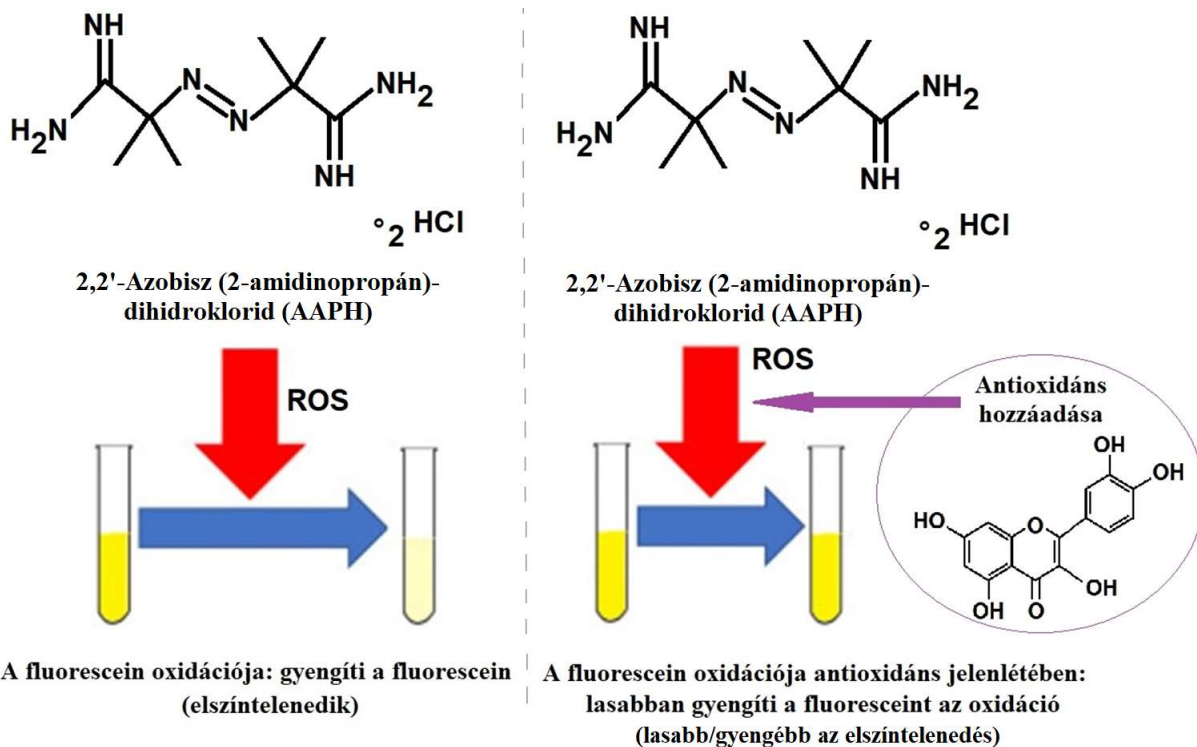
*AOC*                      *Antioxidáns kapacitás*

*AUC HS*                *A minta görbe alatti területe*

*AUC Control*    *A referencia/kontroll vegyület görbe alatti területe*

*AUC Trolox*    *A Trolox görbe alatti területe*

*A Trolox koncentrációja micromol-ban van megadva.*



7. ábra: ORAC módszer sematikus ábrája [137]

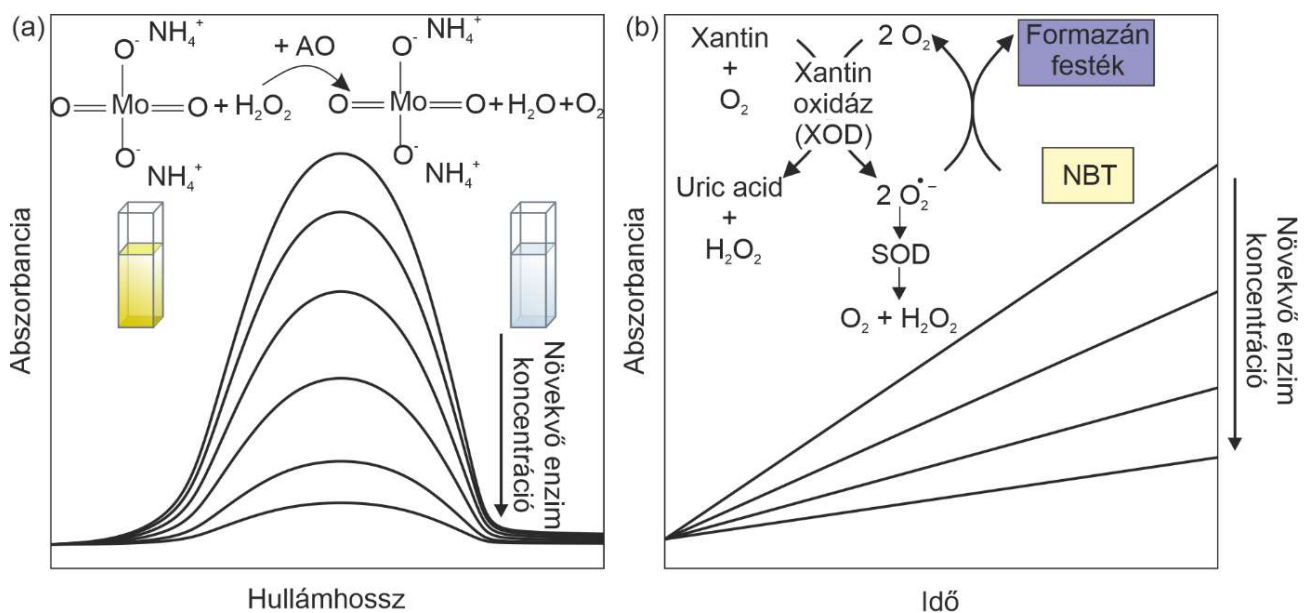
### 2.1.9. ESR (Electron Spin Resonance) módszerek

Az ESR spektroszkópia, amelyet elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópiának is neveznek, és amely a párosítatlan elektronok mágneses térbeli átmeneteinek mérésén alapul. Nagy előnye, hogy az egyetlen technika, amely képes közvetlenül kimutatni a szabad gyököket, valamint más paramágneses származékokat, például az átmenetifém-ionokat [138 - 140]. Hátránya viszont, hogy drága és nehezen hozzáférhető berendezés szükséges a mérésekhez. Az ESR módszert eddig sikeresen alkalmazták különféle élelmiszerek antioxidáns kapacitásának meghatározására [141], beleértve a borokat [142, 143], söröket [144], különböző gyümölcsöket [145], gyógynövénykivonatokat [146], és teakomponenseket [147].

### 2.1.10 Antioxidánsok aktivitásának vizsgálata enzimekkel

Komplex szerves anyagok enzimatiskus aktivitásának vizsgálatára *Hadwan* és munkatársai [148] által kifejlesztett, színváltozáson alapuló módszer jól használható. A kataláz aktivitást egy, az ammónium-molibdát és hidrogén-peroxid között lejátszódó reakció segítségével követhető nyomon. Az ammónium-molibdát a hidrogén-peroxiddal reagálva sárga komplex kialakulását eredményezi, azonban, ha a kataláz elbontja az oldatban lévő hidrogén-peroxidot, a komplex nem tud kialakulni, aminek következtében az oldat szintelen marad. Az enzim koncentrációjának növelésével az oldatban lévő hidrogén-peroxid koncentráció, ezáltal az oldat abszorbanciája is csökken (8. ábra (a)).

A szuperoxid-dizmutáz enzim a szuperoxid gyök lebontásáért felelős, reakciójuk során molekuláris oxigén és hidrogén-peroxid képződik. Az enzimatiskus aktivitás méréséhez a xantin és xantin-oxidáz reakcióján alapuló módszer használható, ami *Beauchamp* és munkatársai nevéhez fűződik [149]. A reakcióban keletkező szuperoxid gyök anion az oldatban jelenlévő nitrokék-tetrazóliummal (NBT) reagálva színváltozást okoz, a kezdetben halványsárga oldat kék színűvé változik. Amennyiben a szuperoxid gyök anion elreagál a szuperoxid dizmutáz enzimmal (vagy más szuperoxid-dizmutáz aktivitással rendelkező anyaggal) az oldat színe kisebb mértékben, vagy nem változik meg. A színváltozás mértéke az enzim koncentrációjától és aktivitásától függ (8. ábra (b)).



**8. ábra:** Kataláz (a) és szuperoxid-dizmutáz (b) aktivitás mérésére szolgáló tesztek sematikus ábrája

### 2.1.11 Elektrokémia mérések

Az elektrokémiai módszerek az antioxidáns kapacitás értékelésének legfontosabb megközelítései közé tartoznak, mivel ugyanazon elvi alapon állnak, mint az antioxidánsok *in vitro* rendszerek. Ezek a módszerek azonban lehetőséget kínálnak az oxidációs/redukációs reakciók közvetlen mérésére, színes reagensek használata, valamint a minta zavarossága és a mintában jelen lévő egyéb anyagok által okozott interferencia nélkül. Az elektrokémiai módszerek előnyei közé tartozik az érzékenység, az egyszerűség és az antioxidáns által átadott elektronok számának közvetlen mérése, ami előnyt jelent a hagyományos spektrofotometriás vizsgálatokkal szemben [150].

Az elektrokémiai módszerek, mint például a ciklikus voltammetria (CV), számos előnyt kínálnak a hagyományos spektrofotometriás vizsgálatokkal szemben. Ezek a módszerek eredendően szelektívek az antioxidánsok redoxállapotára, gyors válaszidővel rendelkeznek, és könnyen miniaturizálhatók. A voltammetriás módszerek információt szolgáltatnak az antioxidánsok elektrokémiai viselkedéséről, beleértve a redoxpotenciáljukat és az oxidáció során kicserélt elektronok számát. Ez a kategória magában foglalja a ciklikus voltammetriát (CV), a differenciálimpulzus voltammetriát (DPV) és a négyzethullámú voltammetriát (SWV). Ezeket a módszereket biológiai minták [151] és élelmiszer-kivonatok [152] antioxidáns tulajdonságainak elemzésére alkalmazták.

Az egyszeri elektrontranszfer (SET) vizsgálaton alapuló tesztek mérik az antioxidánsok elektrondonor képességét. A spektrofotometriás detektorokkal a SET-alapú vizsgálatok kromatikus szondákat használnak, amelyek redox állapotuktól függően változtatják abszorbanciájukat. Így az erősebb SET kapacitást azok az antioxidánsok érik el, amelyek alacsonyabb redukációs potenciállal rendelkeznek, mint a szondáé. Hangsúlyozni kell azonban, hogy számos antioxidáns redoxpotenciálja az oldószer pH-jától és így a sav-bázis egyensúlytól is függ [153].

A hidrogénatom-transzfer (HAT) alapú vizsgálatokat, például az oxigéngyök-abszorpciós kapacitást (ORAC) is adaptálták elektrokémiai formátumokhoz. Ezek a módszerek az antioxidánsok azon képességét mérik, hogy gátolják egy próbamolekula szabad gyökök általi oxidációját. Az elektrokémiai ORAC- és a krócinfehérítési próbák lehetővé teszik az antioxidáns-gyök reakciók közvetlen nyomon követését, ami a hagyományos spektrofotometriás változatokhoz képest jobb érzékenységet és mechanisztikus betekintést biztosít.

Az elektrokémiai módszer kiválasztásakor figyelembe kell venni az adott antioxidánsokat, a reakciómechanizmusokat és az élelmiszermatrix összetettségét. A nem specifikus elektrokémiai mérések és az elválasztási technikák, például a coulometrikus tömbös detektorok kombinálása átfogóbb képet adhat az antioxidánsok összetételéről és aktivitásáról az összetett élelmiszermintákban.

## 2.2. Humuszanyagok

*“Humic substances may not be beautiful, but they do beautiful things.” – Fritz H. Frimmel  
[154]*

A humuszanyagok (HSs) már régóta kutatott anyagok, bár meglehetősen kevés ismeretük, mechanizmusainak megértése és a társadalommal való széles megismertetése még várat magára. Reményeink szerint eme disszertáció össze tudja foglalni az eddig tudományos eredményeket, új tudományos eredményekkel szolgálhat és segít ezen anyagok széles megismertetésével a társadalomban.

Kevesen tudják, hogy a HSs-at egészen a kémia, mint tudományág megalakulása óta kutatják. A XVIII. században, pontosabban 1786-ban Franz Carl Achard francia-német kémikus volt az első, aki először humisavakat (HAS) extrahált a németországi tőzeglápokból. Gyakorlatilag ezen felfedezésével indult útra a HSs tudománya [155]. Berzelius a modern vegyészet atyja is kutatta ezen anyagokat [156]. Míg a nyugati világban épp csak elkezdték kutatni a HSs-at, addig a keleti világban már évezredek óta tekintett vissza ezen anyagok alkalmazására. Ázsiában és az ayurvédikus gyógyászatban több ezer éve használják a mumijo és shilajitot (fulvosavat) [157].

Magyarországon a II. világháború után kezdődtek először kutatások, de a kezdetekor még nem önálló tudományágként, hanem az agrokémia, a talajtan és a szénkémia keretein belül. Az 1975-ig elért kutatási eredményeket az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság (OMFB) támogatásával összefoglalták „A szén huminsav tartalmának hasznosítási lehetőségei” c. elemző tanulmányba [158]. E tanulmányról méltán elmondhatjuk, hogy korát messze meghaladó színvonalat képviselt. Mégis rengeteg tévhit és hibás teória kering róluk a mai napig.

A kis történelmi kitekintés után visszatérve a HSs-okhoz elmondható róluk, hogy természetes anyagok, amelyek folyamatosan képződnek a növényi maradványok bomlásából. Mára már kialakult az az általánosan elfogadott egyezés a nevezéktanban, hogy ezen anyagok gyűjtőneve a HSs, amik további alfrakciókra bonthatóak oldhatóságuk szerint (humin anyagok,



huminsav (HA), fulvosav (FA) és himatomelánsav (HY)), de ennek ellenére a mai napig általános, hogy „huminsavak” gyűjtőnéven emlegetik ezen anyagokat.

Érdekességképpen megemlíteném, hogy vannak olyan felhasználási területek, ahol már használják a HSs, ilyen például a mezőgazdaság, takarmányozás és a étrend-kiegészítők. Ázsiában és az ayurvédikus gyógyászatban több ezer éve használt mumijo és shilajit nem más, mint fulvosav. Úgy tartják, hogy a Shilajit jótékony hatással van az Alzheimer-kórra, az alacsony tesztoszteronszintre, a krónikus fáradtság szindrómára, az öregedésre, a magaslati betegségre, a vashiányos vérszegénységre, a meddőségre, a szív egészségére. Európában iszap- és balneoterápiaként is használták [159]. A ma is iszapterápiaként használt HS-ek és jótékony tulajdonságaik jól ismertek [160]. A legelső hivatalos tudományos jelentés Magyarországgal kapcsolatos 1957-ből, ahol a HS-eket terápiás szerként használták [161, 162]. Számos kutatás alapján a HS-ek vírusellenes, gyulladásgátló, nehézfém-kelátképző, mutagén, daganatellenes és fényvédő tulajdonságokkal rendelkeznek [163]. *Tiwari* és munkatársai kutatása alapján [164] a koronavírusos betegségek kialakulásának megelőzésében is jótékony hatást fejthetnek ki, *Köntös* tudományos munkája [165] során azt publikálta, hogy a fulvosav-jód komplex jelentősen csökkenti a SARS CoV-2 vírus virulenciáját.

A tanulmányok azt mutatják, hogy a HS-ek használata a mezőgazdaságban serkentheti a növények növekedését és oxigénszállítását, felgyorsíthatja a légzést és a magok csírázását, valamint elősegítheti a tápanyagok hatékony felszívódását a növényekben. A HS-ek talajkémiai előnyei abban rejlenek, hogy képesek különféle kationokat komplexálni (pszeudokelát), és a talajban lévő többértékű kationok elnyelőjeként szolgálnak. Negatív felületi töltéssel rendelkeznek minden pH-értéken, ahol a terméshnövekedés megtörténik.

A HS-ek állattenyésztésben való felhasználása számos előnnyel jár, javíthatja a tápanyag felszívódását, felgyorsíthatja az emésztési funkciókat, amelyek szabályozhatják a növekedést, befolyásolhatják az anyagcserét, vírusellenes vagy antibakteriális hatást eredményezve. Számos tanulmány kimutatta, hogy a HS-ek képesek megakadályozni a gyulladást, serkentik az immunrendszert és kiürítik a mérgező anyagokat [166].

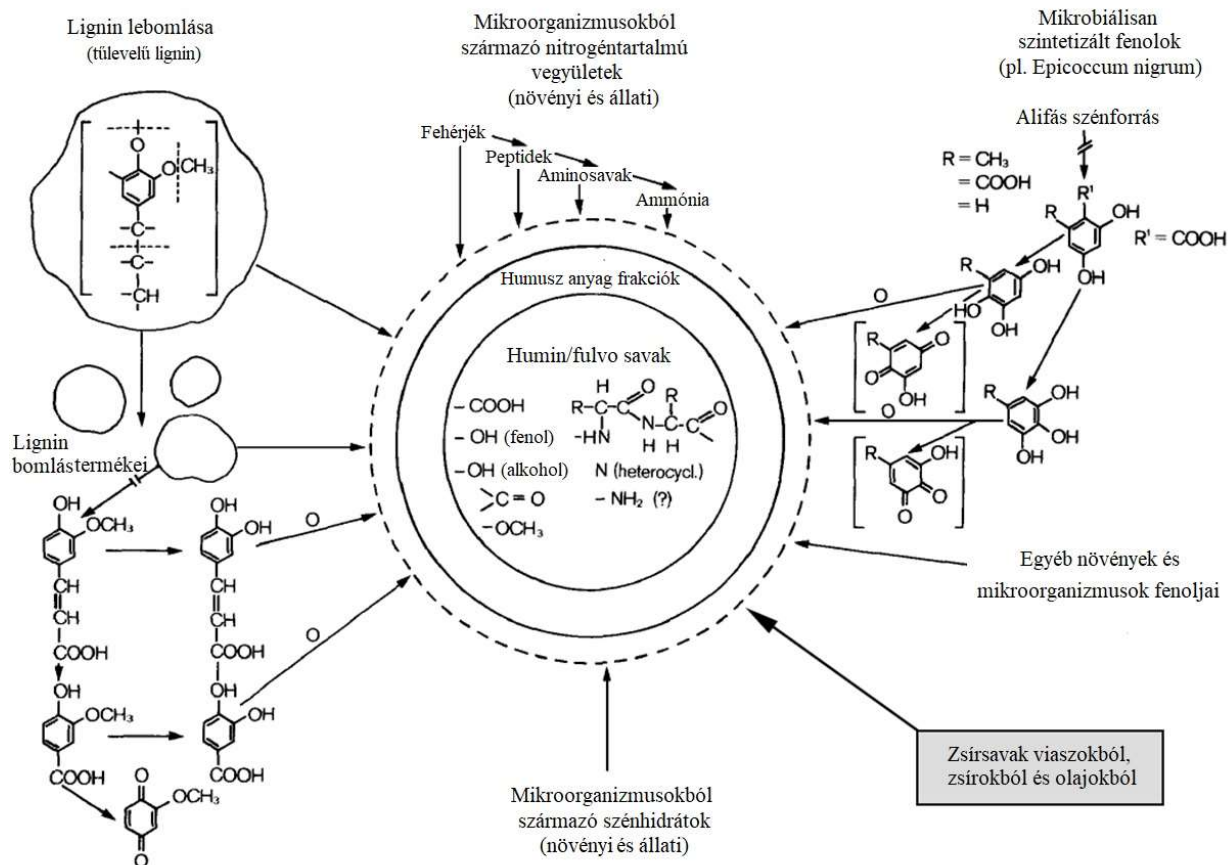
### 2.2.1 A humuszanyagok

A Nemzetközi Humuszanyag társaság (IHSS) megfogalmazása [167] szerint a HSs polidiszperz anyagok összetett és heterogén keverékei, amelyek talajban, üledékekben és természetes vizekben képződnek biokémiai és kémiai reakciók során. Növényi maradványok, mikrobiális bomlása és átalakulása közben ezt a folyamatot úgy nevezünk, hogy humifikáció.

A HSs a természetes szerves anyag (NOM) fő összetevője a talajban és a vízben. A kémiai degradációval szemben azonban viszonylag ellenállóak, így a természet legelterjedtebb nem élő szerves anyagai. Megtalálhatók a talajokban, tőzegben, felszíni és felszín alatti vizekben, fiatalabb szekben és a legújabb kutatások szerint a légköri aeroszolokban is [168]. A legtöbb természetes HA az idősebb tőzgekben, a lignitekben és a fiatalokú barnaszekben található. Ipari termék előállítás szempontjából legnagyobb jelentősége az ún. leonarditnak van, aminek HA-tartalma elérheti a 70%-ot is. (megj.: A leonardit lágú viaszos, fekete vagy barna, fényes, üveges mineraloid, amely lúgos oldatokban könnyen oldódik. Nevét A. G. Leonardról, az Észak-Dakotai Geológiai Szolgálat első igazgatójáról kapta, az ezeken a lelőhelyeken végzett munkája elismeréseként [169].)

A talajba, természetes vizekbe, üledékekbe kerülő szerves anyagok (alapvetően növényi maradványok) kétféleképpen bomlanak le a természetben. Az egyik a degradáció, a másik a humifikáció. Ez a két folyamat ellentétes irányú, de felcserélhető. A humifikáció számos hipotézise (pl. növény átalakulási, kémiai polimerizációs, sejt autolízis) közül a legvalószínűbb a kémiai polimerizációs vagy szintézises közelítés, amely a biopolimerek mikrobiológiai és enzimikus degradációjával és átalakulásával képződött kis molekulák oxidációs és polikondenzációs kémiai folyamatokat magában foglaló polimerizációját tételezi fel [170].

A szerves maradványok kisebb molekulákká bomlanak le, amelyek humifikációval HSs-eket építhetnek fel. Ezek a maradékok makromolekulákká is kombinálhatók, hogy HS-okat képezzenek, bizonyos körülmények között ezek a makromolekulák kis molekulákká bomlanak le. A polimerizáció monomerjeinek, a valószínű prekursoroknak sokféleségét jól szemlélteti az 9. ábrán bemutatott *Flaig* [171] által javasolt séma.

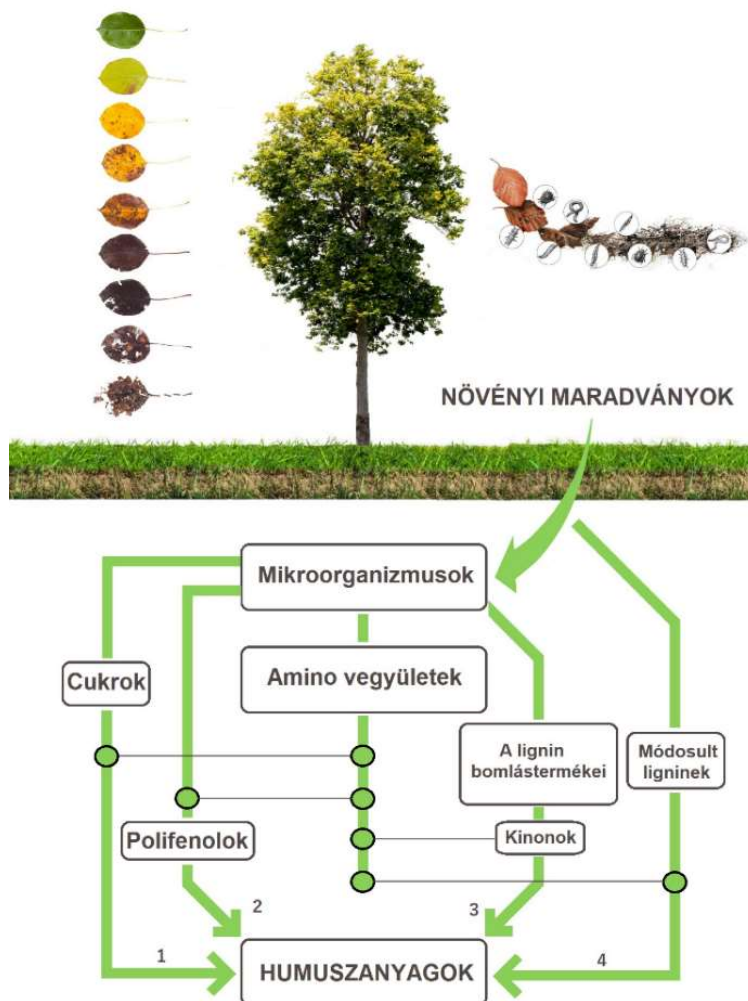


9. ábra: Humuszanyagok képződése a valószínű prekursorokból Flaig [171] szerint, E. Tombácz kiegészítéseivel [172]

A humifikáció klasszikus elméletei szerint vagy tisztán biológiai folyamatként írható le, vagy olyan biológiai folyamatként, amelyet kémiai folyamatok követnek. Napjainkban a huminanyagok képződésének négy javasolt módja van [173], amit a 10. ábrán vizuálisan is ábrázoltam:

Az első lehetséges út a kémiai reakción alapul, és Maillard-reakcióként ismert. Ami a cukrok és az aminosav vegyületek kondenzációját jelenti, ami végül barna melanoidokhoz vezethet. A második lehetséges reakcióút a cellulózból vagy más lignittermékekből polifenolok képződésére összpontosít. A polifenolok kinonokká történő oxidációját polimerizáció követi, így HSs-ok keletkeznek. Egy harmadik lehetséges út feltételezi, hogy a lignin mikrobiális lebontása során keletkező fenolsavak és aldehidek enzimek hatására kinonokká alakulnak. Ezeket a kinonokat ezután aminovegyületekkel vagy anélkül polimerizálják, és így HS-ek keletkeznek. A negyedik lehetséges útvonalat lingo-protein elméletnek nevezik, amelyet Maheshwari és munkatársai [174] írnak le. Az elmélet lényege, hogy a mikroorganizmusok amino vegyületei reakcióba lépnek a módosított ligninnekkel. A ligninnek nem teljesen bomlanak

le, ami metoxil- (OCH<sub>3</sub>) csoportok elvesztését, O-hidroxi-fenol képződését és az alifás anyagok oxidációját okozza, ami COOH-csoportok kialakulásához vezet [175].



10. ábra: Humifikáció négy útjának sematikus ábrája [170]

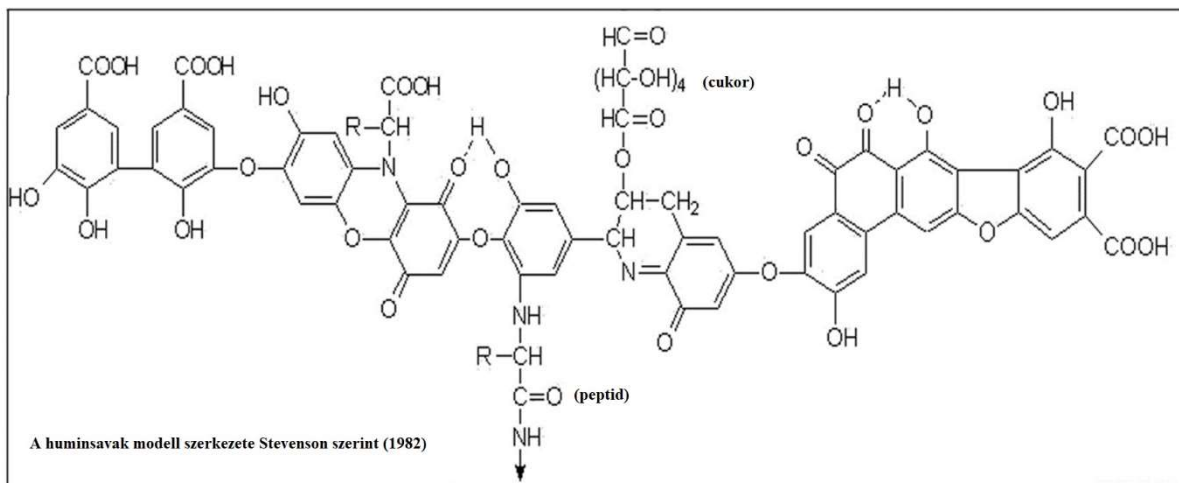
A HSs pontos kémiai szerkezetét a mai napig sem sikerült felderíteni. Ennek egyik alapvető oka az, hogy igen változatos méretű és különböző szerkezetű molekulákból, összetett anyagcsoportokból állnak. Azonban több publikációban is megjelent már a HSs-ok elméleti molekula modelljéről. A 11. ábrán *Stevenson* híres huminsav molekula modellje látható [176]. A HSs kémiai szerkezetének felderítésére [177] roncsolásos technikákat alkalmaztak (pirolízis, hidrolízis, oxidáció, redukció stb.). Az így nyert molekulatöredékek ezreit kémiai módon azonosították, ezek alapján felépítették [178, 179] a “humuszmolekula” egyik elméleti képletét, amely a 12. ábra bal oldalán látható. Ebből a modellből alkotta meg *Johnston & Tombácz* [180], a molekula 3D-s szimulációval felépített konformációs állapotát, amely a 12. ábra jobb oldalán látható. Illetve a 13. ábrán látható *Buffle* által publikált [181] és azóta általánosan elfogadott

molekula szerkezeti képlet a fulvosavak ábrázolására, hazai vonatkozásban pedig a 14. ábrán látható *Jurcsik* által publikált [182] ábrázolás az általa „humusz molekula monomernek” hívott molekuláról.

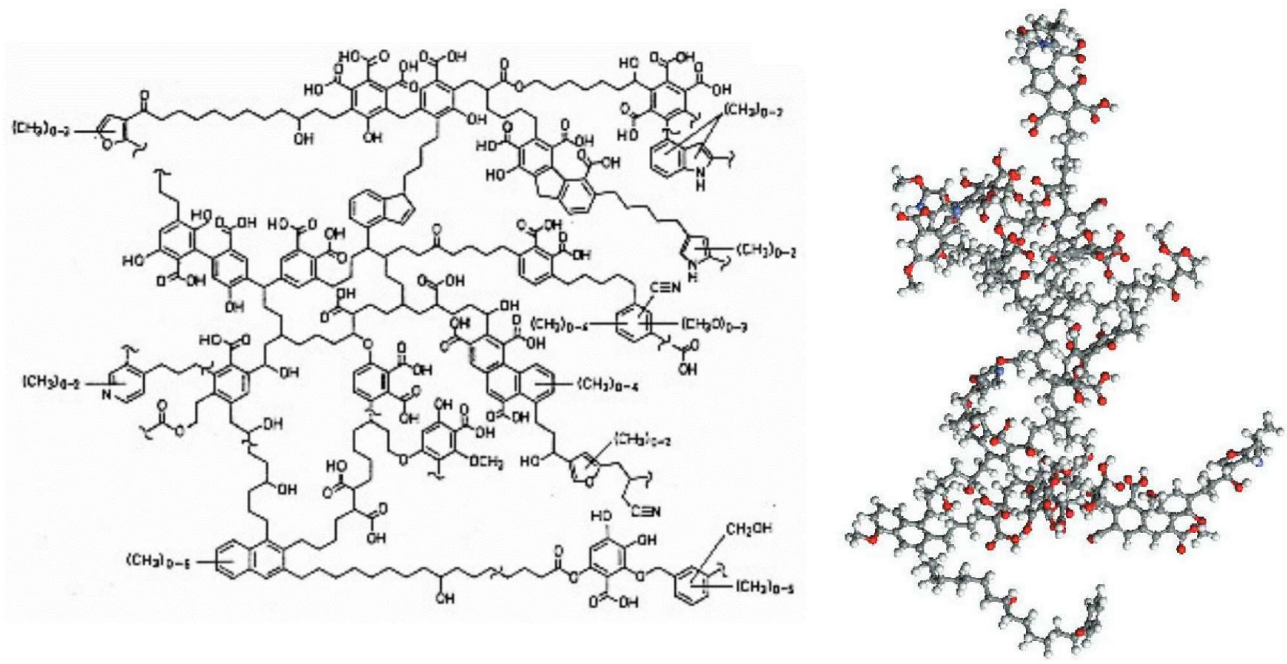
További nehézséget jelent az, hogy a HSs a külső behatásokra igen érzékenyek, s így a lúgos kioldás, illetve az egyes frakciók különválasztására alkalmazott eljárások legtöbbször kisebb-nagyobb szerkezetváltozást okoznak. Azonban elemi összetételük, aromásságuk, funkciós csoportjaik és a molekulaméretük csak szűk tartományban változik.

Kémiai szerkezetüket tekintve a HAs kinon- és szemikinon csoportokkal rendelkező polihidroxi-karbonsavak. Bizonyos szempontból olyanok, mint a flavonoid fenolok, amelyekben az ún. flavon vázat hidroxilcsoportok többszörösen helyettesítik. Ugyanakkor van egy kinoid szerkezetük is, amelyről ismert, hogy felelős az antioxidáns tulajdonságokért.

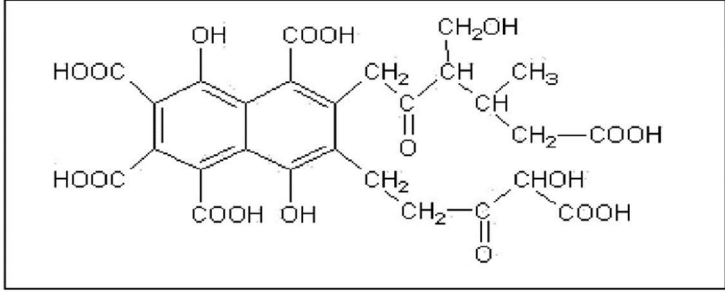
Fontos megjegyezni, hogy a HSs-ok pontos összetétele származásuk (talaj, tőzeg, leonardit, víz, levegő), elhelyezkedésük és a kinyerési technológia típusa szerint eltérőek lehetnek. Az eltérő összetételük miatt eltérőek lehetnek a frakciók tulajdonságai, mivel eltérő funkciós csoportokat tartalmazhatnak, vagy eltérő arányban tartalmazhatnak hasonló funkciós csoportokat.



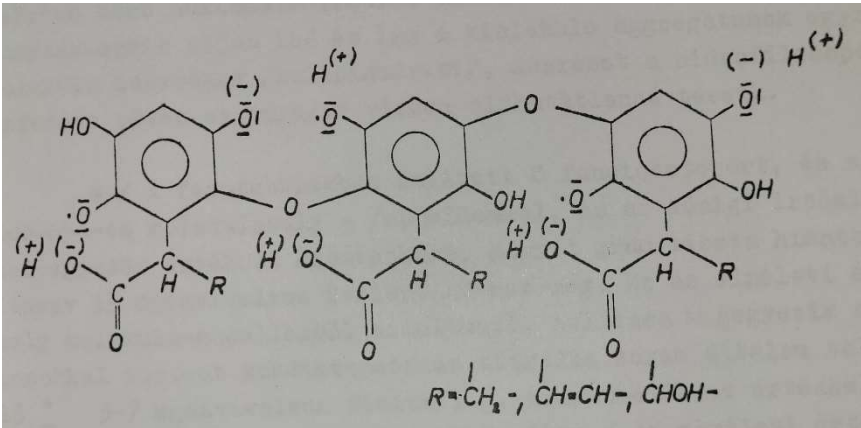
**11. ábra:** *Stevenson* által publikált és azóta általánosan elfogadott molekula szerkezeti képlet a HAs ábrázolására [177]



12. . ábra: Egy humuszmolekula valószínűsített szerkezete két- [178, 179] illetve háromdimenziós ábrázolásban [180]



13. ábra: Buffle által publikált és azóta általánosan elfogadott molekula szerkezeti képlet a fulvosavak ábrázolására [181]



14. ábra: A himatomelánsav modell molekulája Jurcsik szerint [182]

### 2.2.2 Humuszanyag frakciók kinyerése

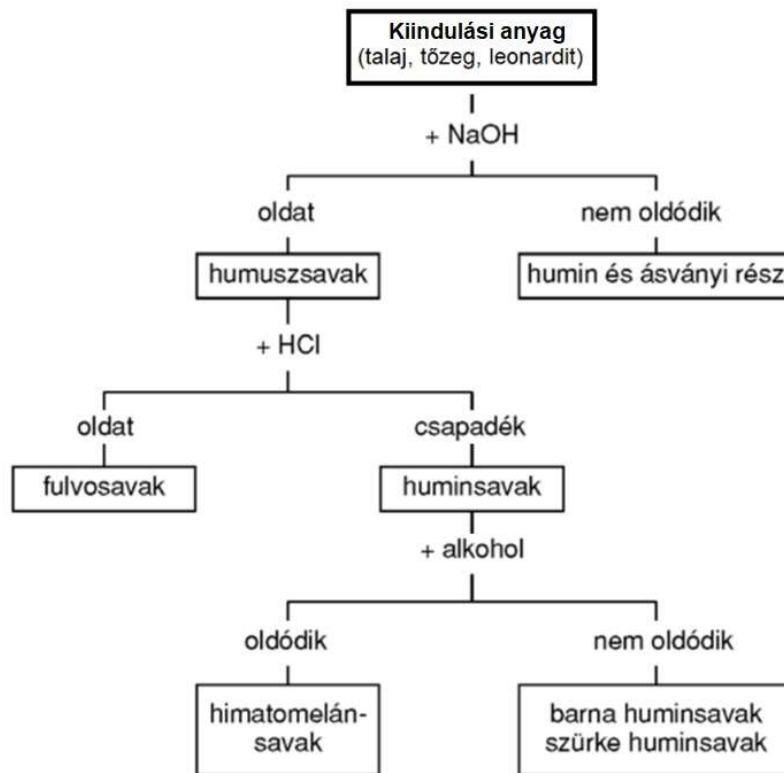
A HSs kémiaiilag nem egységesek, változatos összetételű molekulák keverékei, amelyek hasonló oldhatóságú molekulacsoportokat tartalmaznak, amik az oldási körülmények változtatásával elkülöníthetők egymástól. Az egyes frakciók különböző tulajdonságokkal rendelkeznek. Az oldhatóság szerint elválasztható frakciók nevezéktana a Nemzetközi Humuszanyag Társaság (International Humic Substances Society, IHSS) iránymutatása szerint [183] (lásd 1. táblázat).

A HSs összetett jellegéből és a természetes forrásaikból történő kinyeréssel kapcsolatos nehézségekből adódóan különböző típusú HSs vagy HS frakciók műveleti definícióját vezették be sok évvel ezelőtt. A leginkább elfogadott a savas és lúgos oldatokban való oldhatóság szerinti megkülönböztetés. Oldhatóság különbség alapján az alábbi, Flaig által javasolt [171] HS frakciókat különbözteti meg általában az irodalom:

**1. táblázat:** A humuszanyag frakciók csoportosítása oldhatóságuk szerint

Név	Lúgos oldat	Savas oldat	Alkohol
Fulvosav	oldható	oldható	-
Huminsav	oldható	oldhatatlan	oldhatatlan
Himatomelánsav	oldható	oldhatatlan	oldható
Humin	oldhatatlan	oldhatatlan	oldhatatlan

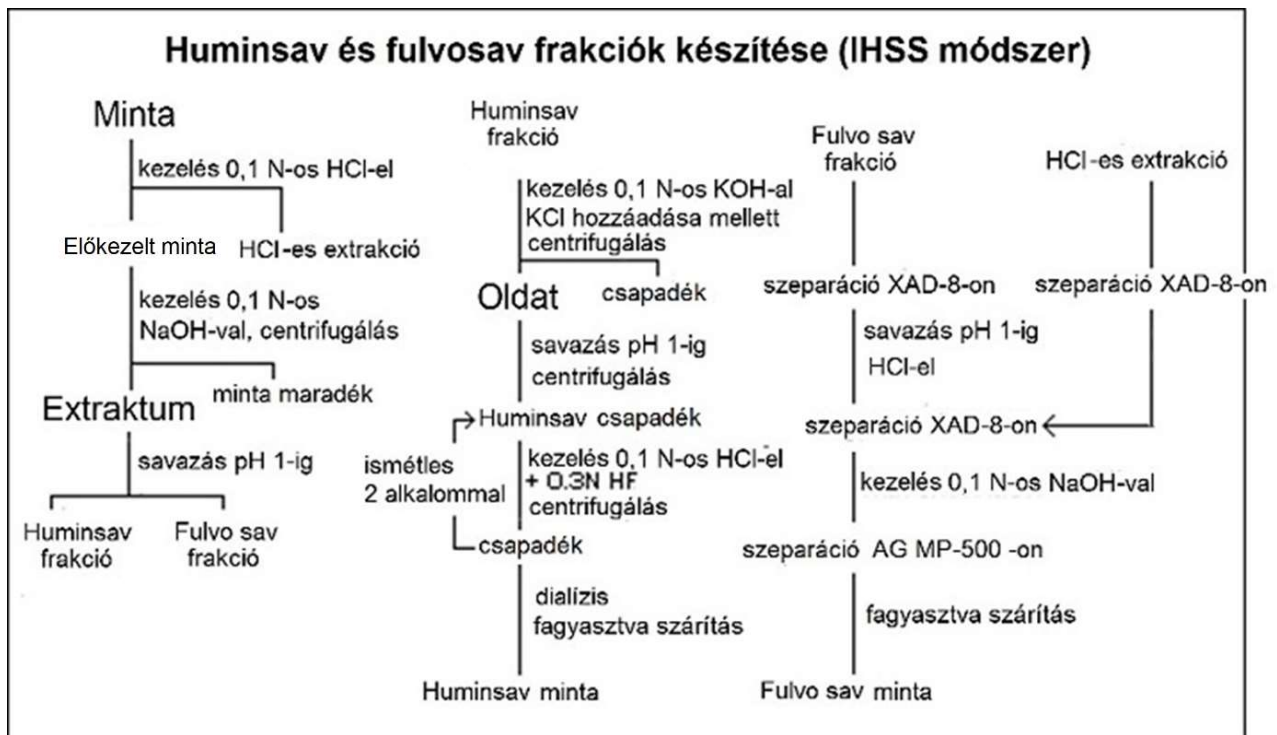
A HSs kinyerésére és a frakciók elválasztására számos különböző séma található az irodalomban, legelterjedtebbek a talajokból történő kinyerésre vonatkozóak [184, 185], de a vízben oldott HSs-ra is találhatunk irodalmat [186]. Talajok esetén a legelterjedtebb kinyerés a tradicionális módszernek nevezett 0,1 vagy 0,5 M NaOH oldatot használó lúgos extrakció, amit a 15. ábra szemléltet. Az irodalomban korábban meglévő viták és a műveleti eltérésekből adódó hibák miatt az IHSS standardizálta a kinyerési és frakcionálási eljárást, az eljárást a 16. ábra tartalmazza. Az IHSS honlapján (<https://humic-substances.org/>) a “Products/Order IHSS Products” címszó alatt mindenki számára hozzáférhető a talajokból és vizekből történő HA és FA kinyerés leírása. A HSs jellemzésére ma már széles körben alkalmazott nagyműszeres módszerek az oldhatósági különbségek alapján kinyerhető klasszikus frakciók további frakcionálását igénylik.



**15. ábra:** A híg lúggal kevert talajból kioldódó humuszfrakciók sematikus folyamat ábrája

Mivel az egyes alapanyagok között lényeges eltérés lehet, ezért az egyik módszer alapján nem biztos, hogy ugyanannyi HA-t vagy FA-t ki tudunk nyerni, mint egy másik módszer alapján, másrészt az alapanyagtól is függ az eljárás. Továbbá az egyes módszerekben az elválasztás lépéseinek a száma is eltérhet, e szerint vannak nagyon hosszú és rövidebb módszerek is az extrakcióra. A HAs ipari előállítása során leggyakrabban az ún. lúgos extrakciót alkalmazzák, aminek során az alapanyagból kioldják a HA-t és a FA-t. Amennyiben további frakcionálás szükséges, akkor savas lecsapással elválasztják egymástól a HA-t és a FA-t [186].





**16. ábra:** A humuszanyag szilárd forrásanyagból való kinyerésének metodikája az IHSS szerint [183]

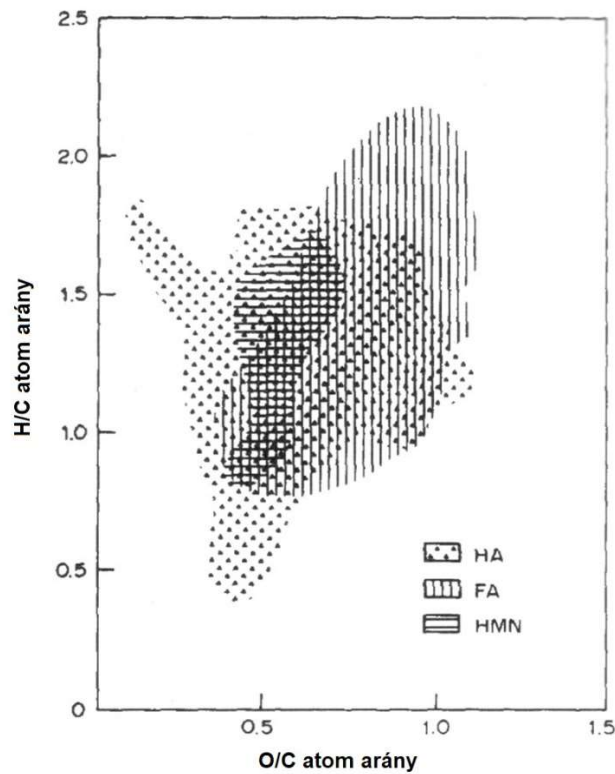
### 2.2.3 A humuszanyag frakciók jellemzése

#### 2.2.3.1 Elem analízis és atom arányok

Az elemanalízis a kémiában alkalmazott analitikai technika, kémiai vegyületek és kompozitjaik elemi összetételének meghatározására. Ezzel a módszerrel meghatározható, hogy mely elemek vannak jelen, és az egyes kémiai elemek hány tömegszázalékot tartalmaznak a vizsgált anyagban, így például megállapítható az empirikus képlete a sztöchiometrikus vegyületeknek.

Az elemanalízis hasznos és gyakran alkalmazott módszer a nem sztöchiometrikus keverékek, például a HSs jellemzésére [187 - 189]. Ennek megfelelően célszerű lefolytatni ezeknek a tulajdonságoknak a statisztikai értékelését, a különbségeiknek és tendenciáiknak megállapítását. *Van Krevelen* [190] grafikus módszert dolgozott ki a koalizációs folyamat vizsgálatára, amelyben az atomi H/C arányt az atomi O/C arány függvényében ábrázolják (17. ábra). Ez a fajta ábrázolás, amelyet ma általánosságban elfogadott van Krevelen diagramként vált ismertté. A van Krevelen diagram gyakori alkalmazása az elemi összetétel változásainak szemléltetésére, amelyek a szerves geokémiai anyagok geológiai környezetben történő

átalakulása során következnek be. Továbbá a H/C arány nagyságrendje az anyag aromáságának, telítettségének (kis érték) vagy alifáságának (nagy érték) jelzésére is használták [190]. A H/C arány tehát minőségileg hasznos paraméternek tűnik a HSs aromáságának összehasonlítására.



**17. ábra:** Van Krevelen munkája során megalkotott diagramja, amelyben összes 650 humuszanyag frakció adatait ábrázolja [190]

#### 2.2.3.2. FT-IR spektroszkópai elemzés.

A Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR) az infravörös spektroszkópia egy olyan típusa, amely egyidejűleg széles spektrumú, nagy spektrális felbontású adatokat gyűjt. Az infravörös spektrumok az infravörös sugárzás anyaggal való kölcsönhatása által okozott hullámszámoktól (hullámhosszoktól) függő elnyelt infravörös sugárzás diagramját szemléltetik. Az infravörös spektrum tükrözi a teljes minta kémiai összetételét. A spektrumok elemzése során a vizsgált minta szerkezetétől függően a különböző funkciós csoportok különböző frekvenciájú hőt nyelnek el. Az így kapott rezgésspektrum jól használható a funkciós csoportok azonosítására, valamint a funkciós csoportok alapján különböző, komplex összetételű minták összehasonlítására, azonosítására.

A FTIR is egy gyakran alkalmazott módszer a HA-ak és FA-ak karakterizálása során [191 – 198]. A szakirodalomban található adatokat elemezve az alábbi sávokban látható hasonlóságok, valamint eltérések alapján jellemezhetőek a különböző frakciók funkciós csoportjaik alapján (lásd 2. táblázat).

**2. táblázat:** A szakirodalomban található sávokhoz tartozó funkciós csoportok [191]

Sávok	Funkciós csoportok
3500-3000 cm <sup>-1</sup>	hidrogénkötésű hidroxilcsoportok és N-H
3000-2800 cm <sup>-1</sup>	alifás C-H csoportok
1725-1600 cm <sup>-1</sup>	C=O csoport
1620-1600 cm <sup>-1</sup>	C=C kötés
1460-1450 cm <sup>-1</sup>	alifás C-H csoportok
1400-1390 cm <sup>-1</sup>	O-H, COO- és C–O csoportok
1320–1200 cm <sup>-1</sup>	COOH C–O és O–H
1180–1000 cm <sup>-1</sup>	alkohol, éter, észter, poliszacharid csoportok

Az FTIR-t széles körben használják számos iparágban, és szerves és szervetlen vegyületek elemzésére egyaránt használják. Megerősítheti mind a szilárd anyagok, a folyadékok és a gázok összetételét.

### 2.2.3.3 Potenciometriás sav-bázis titrálás

A HSs szerkezetében a funkciós csoportok száma fontos jellemző, amely meghatározza reakciókészségüket és fizikai-kémiai tulajdonságaikat. A HAs teljes savasságának meghatározására szolgáló szabványos eljárással kapcsolatban azonban nincs egyetértés a szakirodalomban. A potenciometriás titrálás a legelterjedtebb módszer a HSs savcsoportjainak meghatározására. Egyes esetekben meghatározott koncentrációjú lúgos (NaOH) oldatot adtak szilárd HSs-minta vizes szuszpenziójához [199 - 201]. Más kísérletekben [202 – 205] a savas csoportok mennyiségét az előzetesen lúgban oldott minták meghatározott koncentrációjú sav (HCl) oldat hozzáadásával határozták meg. Általában a 8,0-s pH-t a karboxil csoportok titrálásának végének, a 10,0 – 10,5-ös pH értéket pedig az összes savcsoport titrálásának végének tekintik [206 - 208]. *Ritchie* és munkatársai több alkalommal vizsgáltak HSs mintákat

potenciometriás titrálással [209, 210], többek között az IHSS referencia minták vizsgálatát végezték el és eredményeiket összehasonlították más laborokban kapott eredményekkel.

#### 2.2.3.4 UV-VIS spektroszkópai elemzés.

A HSs összetevők általában erős abszorbanciát mutatnak az UV–VIS tartományban (190–800 nm), különösen az UV tartományban, az aromás kromoforok és/vagy szerves összetevők jelenléte miatt [211]. Az UV-Vis spektrumot gyakran használják a szervesanyag minőségi és aromásanyag-tartalmának különböző empirikus paramétereinek meghatározására [211]. A HSs fény kölcsönhatása összetett, az elnyelt fény energia részben fluoreszcenciás emissziót gerjeszt. A polidiszperz anyagban a nagyobb molekulák és/vagy részecskék pedig észlelhetően szórják a fényt, azaz fény abszorpció, fluoreszcencia és fényszórás egyaránt jellemző a HSs oldatokra [212].

Ezek egyike az E4/E6 arány (más néven "színarány"). Az E4/E6 arány nemzetközileg elfogadott, a humuszminőségre jellemző változó paraméter. Az E4/E6 arány a humuszminőség meghatározására alkalmazott nemzetközileg elfogadott vizsgálati módszer. Az E4/E6 arány meghatározása gyors és egyszerű analitikai folyamat, amely nem igényel komplex felszerelést és fejlett technikai szaktudást, de mégis értékes információt ad. A vizsgálat a humuszkivonatok fényelnyelésében tapasztalható eltéréseket határozza meg, melyek alapján egyszerűen kimutathatóak a HSs között fennálló minőségbeli eltérések.

Ez az extinkció (E4/E6) aránya 465 és 665 nm hullámhosszon mérve. Ha az E4/E6 magas (7-8 vagy magasabb), akkor a viszonylag kis molekulájú, kevésbé stabil FA és HA dominál, de ha az arány 3 és 5 között van, akkor a nagyobb molekulájú, jobb minőségű, HA dominál [213]. Az E4/E6 érték a HS-ek molekulaméretével függ össze [214]. Ez az arány független a mintakonzentrációtól, de jól jellemzi a szervesanyag-frakciók és a különböző eredetű humuszkomponensek közötti különbséget. A kondenzációs lánc hosszának és a molekulaméretnek növekedésével az abszorpció jel magasabb hullámhosszok felé tolódik el (batokróm eltolódás) [215, 216]. A HA és FA E4/E6 aránya kiszámítható az (3) -es egyenlettel.

$$E4/E6 = \frac{\text{Abs. (465 nm)}}{\text{Abs. (665 nm)}} \quad (3)$$

Meghatároztam az E2/E3 arányt is, ami a 250 és 365 nm-n mért abszorbanciák aránya kiszámolható a (4) -es egyenlet segítségével. Az arány alapján következtethetünk az oldott

szerves anyag (DOM) molekulaméretére és polimerizációs fokára. Az E2/E3 értékek fordítottan arányosak a polimerizációval és a molekulatömeggel.

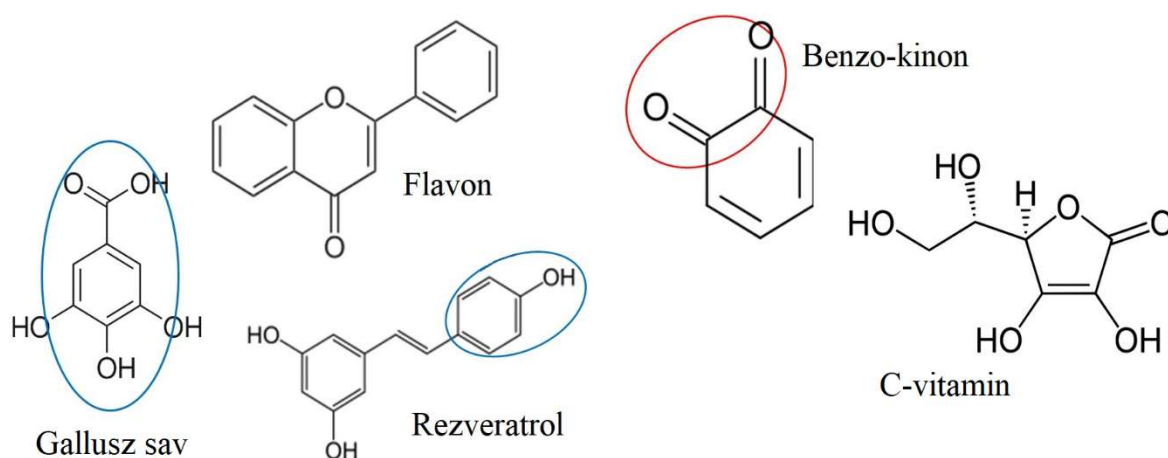
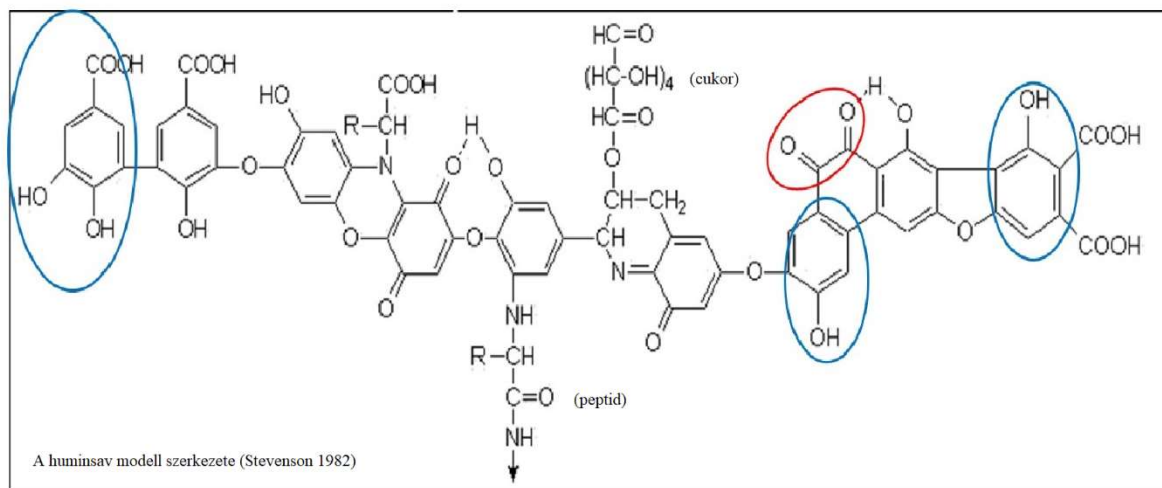
$$E4/E6 = \frac{\text{Abs. (250 nm)}}{\text{Abs. (365 nm)}} \quad (4)$$

A harmadik arány az UV-abszorbancia-index (URI/UV-abszorpciós arány) arány, amely az UV-elnyelő funkciós csoportok és a telítetlen csoportok arányát mutatja. Ebből következtethetünk a funkciós csoportok sűrűségére; minél nagyobb a sűrűség, annál nagyobb az URI értéke. Pontosabban, a HA bír a legalacsonyabb URI-értékkel (1,59 egy HA-hoz, a legmagasabb aromás), az FA-é közepes (1,88 egy FA-hoz, közepes aromás), és a legalacsonyabb aromás vegyületek (pl. fehérjék) a maximális értékkel rendelkeznek (13,50 a BSA esetében, legalacsonyabb aromás) [217]. Az URI arány a (5) -es képlet segítségével kiszámítható.

$$\text{URI} = \frac{\text{Abs. (210 nm)}}{\text{Abs. (254 nm)}} \quad (5)$$

#### 2.2.4 A humuszanyagok, mint antioxidánsok

Felmerülhet a kérdés, miért és milyenek lennének a HSs, mint antioxidánsok? A HAS kémia értelemben nagyon bonyolult és komplex molekulák. Sok szempontból hasonlóak a flavonoid fenolokhoz, amelyekben az ún. flaván váz többszörösen szubsztituált a hidroxicsoportok által. Ugyanakkor kinoidális struktúrával is rendelkeznek, ami közismerten felelős az antioxidáns tulajdonságokért. A HAS ezen tulajdonságait mind klasszikus analitikai módszerekkel (redoxi titrálások), mind műszeres analitikai mérésekkel (ESR) számos tudományos publikációban már bizonyították [218 - 220].



**18. ábra:** A huminsavak és ismert antioxidánsok azonos molekula csoportjai

A 18. ábrán a HAS általános szerkezete látható és néhány már jól ismert antioxidáns molekula képlete. A képen jól látható, hogy a HAS több olyan csoportot is tartalmaznak, mint a már jól ismert antioxidánsok. Ebből is lehet következtetni arra, hogy rendelkezni fognak kimagaslóan nagy antioxidáns értékekkel [221].

*Klein* és munkatársai [219] kutatásuk során eltérő szerkezetű HSs antioxidáns kapacitását vizsgálták többféle módszerrel. Vizsgálataikban 25 talaj-, tőzeg-, szén- és vízi eredetű HA, FA és humuszszerű anyagmintát jellemeztek elemanalízissel és NMR-rel. A Folin–Ciocalteu módszert alkalmazták a minták összes fenoltartalmának (TPC) mennyiségi meghatározására, valamint az ORAC módszert az antioxidáns tulajdonság jellemzésére. Kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a mért ORAC és a TEAC értékek között nem tudnak egyenes arányosságot levonni. *Hu* és társszerzői arról számoltak be, hogy a monoszacharidok, oligoszacharidok és komplex szénhidrátok ORAC-értékeket mutattak, de TEAC-értékeket nem [222]. A fenolos antioxidánsok, az oxiresveratrol, a resveratrol, a pinosylvin és a pterostilbene

esetében az ORAC-értékekhez képest alacsonyabb TEAC-értékekről számoltak be [223]. Ez az inkonzisztencia összefügghet a HSs összetettebb antioxidáns viselkedésével, mint az egyes antioxidáns vegyületek. Ezen túlmenően szignifikáns korrelációt találtak az AOC értékek és a HSs szerkezeti jellemzői között. Az AOC és a TP közötti kapcsolat azzal magyarázható, hogy a gyenge X-H kötések (ahol X = O, N vagy S) a formális H atom adományozás a peroxilgyökök kioltásának fő mechanizmusa. Ez a mechanizmus bizonyos antioxidánsok (láncbontó antioxidánsok) azon képességén alapul, hogy H-eket adnak a ROO•-nak [224]. Ez a hatásmechanizmus a fenoloknál és a fenolokkal szerkezetileg rokon antioxidáns vegyületeknél jelentkezik, mint például az aromás aminok, fenotiazinok, piridinolok, pirimidinolok és tiolok [224]. Azt találták, hogy a HS AOC értékéhez leginkább hozzájáruló négy szerkezeti paraméter a C/N arány, a C<sub>CHO</sub>, a C<sub>CH3O</sub> és a TP. A C/N, C<sub>CHO</sub> és TP növekedése az AOC növekedéséhez, míg a C<sub>CH3O</sub> tartalom növekedése az AOC csökkenéséhez vezetett.

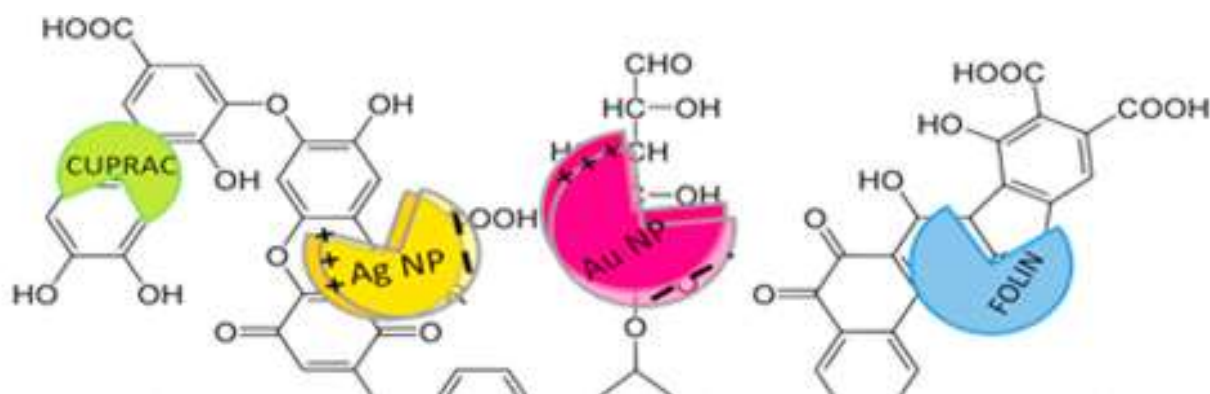
*Aeschbacher* és munkatársai [225] különböző HSs elektron donor képességét (EDC) számszerűsítették elektrokémiai oxidáció segítségével széles pH tartományt figyelembe véve. Kutatásuk azt mutatja, hogy az általuk vizsgált különböző eredetű HA-ak és FA-ak fenolos elektron donor csoportokat tartalmaznak, amelyek antioxidánsként működhetnek, és ezáltal befolyásolhatják a biogeokémiai és szennyező redox reakciókat mind a természetes, mind a mesterséges rendszerekben. Munkájuk alátámasztja azt a hipotézist [226, 227], miszerint az antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező fenolos csoportok lelassítják a HSs-ben lévő többi molekularész oxidatív átalakulását, és ezáltal növelik a jelenlétük idejét toxikus környezetben.

*Zykova* és munkatársai [228] saját kinyerésű HA minták antioxidáns hatását vizsgálták ESR, valamint voltammetriás módszerrel. A kísérleteik során minden HA mintát tözegtől nyertek ki, kétféle módszerrel, egy lúgos (NaOH) extrakcióval, valamint egy pirofoszfát (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) alapú extrakcióval. Az elektrokémiai O<sub>2</sub> redukció a higanyfilm elektródán a katódon több lépcsőben megy végbe, O<sub>2</sub><sup>-</sup> és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> képződésével. A voltammetriás módszer lehetővé teszi a természetes vegyületek antioxidáns aktivitásának értékelését, illetve a HA minták és a ROS közötti kölcsönhatás mechanizmusaira utalhat modellrendszerekben [229]. Kísérleteikben megállapították, hogy a pirofoszfátos extrakcióval kinyert HA antioxidáns aktivitása magasabb volt, mint a lúgos frakcióké. A minták EPR analízise során azt találták, hogy az összes HA-frakció elektronparamágneses rezonancia (EPR) jele egyetlen vonalat mutatott, ami összhangban van a szemikinon típusú gyökök jelenlétével [230]. Ez alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a HA-k antioxidáns aktivitása a szerkezetükben található szemikinon típusú gyököknek köszönhető [231], és ezen gyökök stabilitását a HA-ban kondenzált aromás szerkezetek tartják fenn [232].

*Efimova* és munkatársai [233] barnaszénből extrahált HY antioxidáns hatását DPPH reakcióval vizsgálták. A HY-at egyszerű alkoholos extrakcióval nyerték ki az alapanyagból. Vizsgálataik során sajnos a kinyert anyagot más módszerrel nem jellemezték, így nem tudhatjuk biztosan, hogy a kinyert anyag funkciós csoportjai, elemanalitikai összetétele alapján milyen kapcsolatban áll a szakirodalmi adatokkal. Kísérleteik során azonban kimutatták a HY-ak kifejezett antioxidáns hatását, valamint azt találták, hogy az antioxidáns aktivitás a HY koncentrációjával nőtt.

A fenti antioxidáns módszerek közül a HAs tesztelésére kiválasztok módszereket, amikkel mind a HA frakciókat, mind a már jól ismert antioxidánsokat is lehet mérni. A kapott eredményekből ki fog derülni, hogy a HA-akat be lehet-e vezetni az élelmiszer- és kozmetika iparba, úgy, mint jelentős antioxidáns kapacitással rendelkező hatóanyagok.

Mivel mindegyik antioxidáns mérő módszer más fajta gyököt használ a hatás mérésére, ezért nem várható el, hogy mindegyik ugyan olyan jó vagy rossz eredményt adjon. A HSs összetett szerkezete miatt meg kell említeni a sztereokémiai gátlást, amely hatására nem egyformán hozzáférhetőek a gyökök (lásd 11. ábra). Míg egy GA jó hozzáférhetőségű, mert egy kicsi szimmetrikus molekuláról beszélünk addig a HSs-ok frakciói nagy és szerteágazó molekulákból állnak. Tehát a mért hatás ebből adódóan eltérhet. Éppen ezért többfajta antioxidáns mérő módszert választottam a mintáink mérésére, hogy ezáltal jobb képet kaphassunk mintáink antioxidáns hatásáról. Ezt a hatást, gátlást próbáltam szemléltetni a 19-es ábrán is.



**19. ábra:** Sematikus bemutató ábra, szemlélteti, hogy a különböző antioxidáns mérő módszerek hatóanyagai mely részekhez férnek hozzá a huminsav modell molekulán



### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori kutatásom célja a téma irodalmi háttérének kritikai feltárása, az alkalmazott eljárások módszerek áttekintése; a HA frakciók kinyerése, tisztítása és fracionálása, az általam előállított frakciók általános jellemzése és összehasonlítása az IHSS referencia mintákkal (elemi összetétel, molekulaméret eloszlás, funkciós csoportok stb.). Továbbá az általam előállított frakciók antioxidáns tulajdonságaik vizsgálata különböző antioxidáns mérő módszerekkel. (ESR, DPPH, CUPRAC, TPC stb.)

PhD munkám során a következő részcélokat valósítom meg

**C1.)** *A téma irodalmi háttérének kritikai feltárása, az alkalmazott eljárások módszerek áttekintése.*

A HSs frakciók kinyerési módszerének áttekintése és értelmezése. Melyik módszer lesz eredményesebb az antioxidáns hatású HSs frakciók kinyerésére, miközben a módszer ipari mértékben is gazdaságosan megvalósítható.

**C2.)** *A HSs frakciók összehasonlítása a referencia mintákkal fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján. (elemi összetétel, molekulaméret eloszlás, funkciós csoportok stb.)*

A cél, hogy bizonyítani tudjam, hogy a megfelelő frakciókat állítom elő. Továbbá, hogy ezek az általam kinyert frakciók milyen hasonlóságokat és különbségeket mutatnak fizikai-kémiai szempontokból a referencia mintákhoz képest.

**C3.)** *A HSs frakciók összehasonlítása egymással, a referencia mintákkal és más irodalmi értékekkel antioxidáns hatásuk szempontjából. A HSs frakciók és a referencia minták antioxidáns tulajdonságainak vizsgálata különböző módszerekkel (TPC, DPPH, ORAC, CUPRAC, ESR)*

Az általam elérhető antioxidáns mérő módszerekkel tervezem vizsgálni mind a saját kinyerésű mintákat, mind a referencia mintákat, hogy össze tudjam vetni az antioxidáns tulajdonságaikat egymással és más irodalmi értékekkel.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Ahogy az irodalmi áttekintésben részletes bemutatásra került, különféle módszerek léteznek a HS-ek kinyerésére különböző nyersanyagokból, például tőzegből és leonarditból [180, 181]. Mint fentebb említettem, nagyobb, ipari méretekben kinyerhető frakciókat kívántam előállítani. Szintén szeretem volna látni a lúgos és savas extrakciós HS-frakciók közötti különbségeket.

Azért is szükségesnek éreztem a két különböző kivonási módszer alkalmazását, hogy láthassam, hogy mely módszer alkalmasabb az antioxidáns célú HSs előállítására, kinyerésére. Hiába kapok azonos frakciókat a két kinyerési módszer eredményeként, mivel más sorrendben és más anyagokkal végeztem az extrakciót, ezért elképzelés szerint a különböző képen kinyert frakciók különböző mértékben fognak antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezni. Másrészt tekintettel arra, hogy a HSs nem kémiai, hanem csak műveletileg vannak definiálva, összehasonlításra nemzetközileg elismert és a tudományos közösség által elfogadott HSs mintákat -IHSS FA és HA standardokat- szereztem be.

**3. táblázat:** A humuszanyag minták nevei, rövid nevei, extrakció módja és a minta alapanyaga

A frakció neve	Rövidített név (kód)	Extrakciós módszer	Alapanyag
IHSS Huminsav	IHSS HAP (1S103H)	IHSS	Tőzeg
IHSS Huminsav	IHSS HAL (1S104H)	IHSS	Leonardite
IHSS Fulvosav	IHSS FAP (2S103F)	IHSS	Tőzeg
Huminsav	al-HA	Lúgos	Leonardite
Fulvosav	al-FA	Lúgos	Leonardite
Himatomelánsav	al-HY	Lúgos	Leonardite
Huminsav	ac-HA	Savas	Leonardite
Fulvosav	ac-FA	Savas	Leonardite
Himatomelánsav	ac-HY	Savas	Leonardite

## 4.1 IHSS humuszanyag minták

Az IHSS több különböző alapanyagból von ki humuszanyafrakciókat, ilyen például az Észak-Dakotai Gascoyne-bányából származó leonardit, Suwanee folyóból szűrt és elválasztott frakciók, a Pahokee tőzezből kinyert frakciók és az Eliot talajból kinyert frakciók. Ezek a különböző alapanyagokból kivont frakciók eltérnek egymástól, mivel más humifikációs indexel rendelkeznek és más vidékről származnak, ezért én a saját kivonású mintáimhoz legközelebb álló (hasonló humifikációt elért minták) frakciókat szereztem be. Tehát vásároltam IHSS HA-t, amely tőzezből (IHSS HAP, 1S103H) és leonarditból (IHSS HAL, 1S104H) származik. Ezen kívül megvásároltam az IHSS FA-t (IHSS FAP, 2S103F), amelyet tőzezből nyernek ki.

Mivel én a saját frakcióimat a dudari leonarditból nyertem, ki ezért megpróbáltam az IHSS-től csak leonardiból kinyert frakciókat vásárolni, azonban ők FA frakciót nem nyernek ki leonarditból, ezért több FS (tőzezből és folyóból kinyert) frakciót is szereztem be tőlük [234].

## 4.2 Saját előállítású humuszanyag minták

A mérésekhez saját kivonású HSs mintákat is állítottam elő, használtam. Két különböző: egy lúgos és egy savas feltárási módot alkalmaztam a frakciók elkészítése során. Erre a fent említett okok mellett azért is volt szükség, mert van egy olyan frakciója a HSs-nak, melyet az IHSS még nem standardizált így nem beszerezhető. Ez az alkoholban oldódó HS frakció a HY. Másik ok, hogy össze lehessen hasonlítani, hogy az eltérő kivonási módszer milyen hatással van a frakciók antioxidáns tulajdonságára.

### 4.2.1. Leonardit minta fizikai előkészítése

A hazai leonardit kiindulás „alapanyag” mintánkat a Magyarországi dudari szénbányában gyűjtöttem nagy mennyiségben. A kísérleti munkához körülbelül 5 kg leonarditot gyűjtöttem. Először megszáritottam a leonardit mintákat, megőröltem és szitáltam, hogy 0,5 és 3 mm közötti frakciókat kapjak. Az elkészített mintákat felhasználásig műanyag zacskókba tároltam.

Az extrakciókhoz szükséges oldatokat frissen készítettem el naponta. Laboratóriumi minőségű, tömény HCl-t (Merck, Kenilworth, NJ, USA) használtam 20%-os (w/w%) HCl oldat elkészítéséhez. A KOH oldatok 98%-os analitikai tisztaságú KOH-ból (Merck, Kenilworth, NJ, USA) készültek 2,5%-os (w/w%) koncentrációban. 96%-os (V/V) koncentrációjú etanolt is

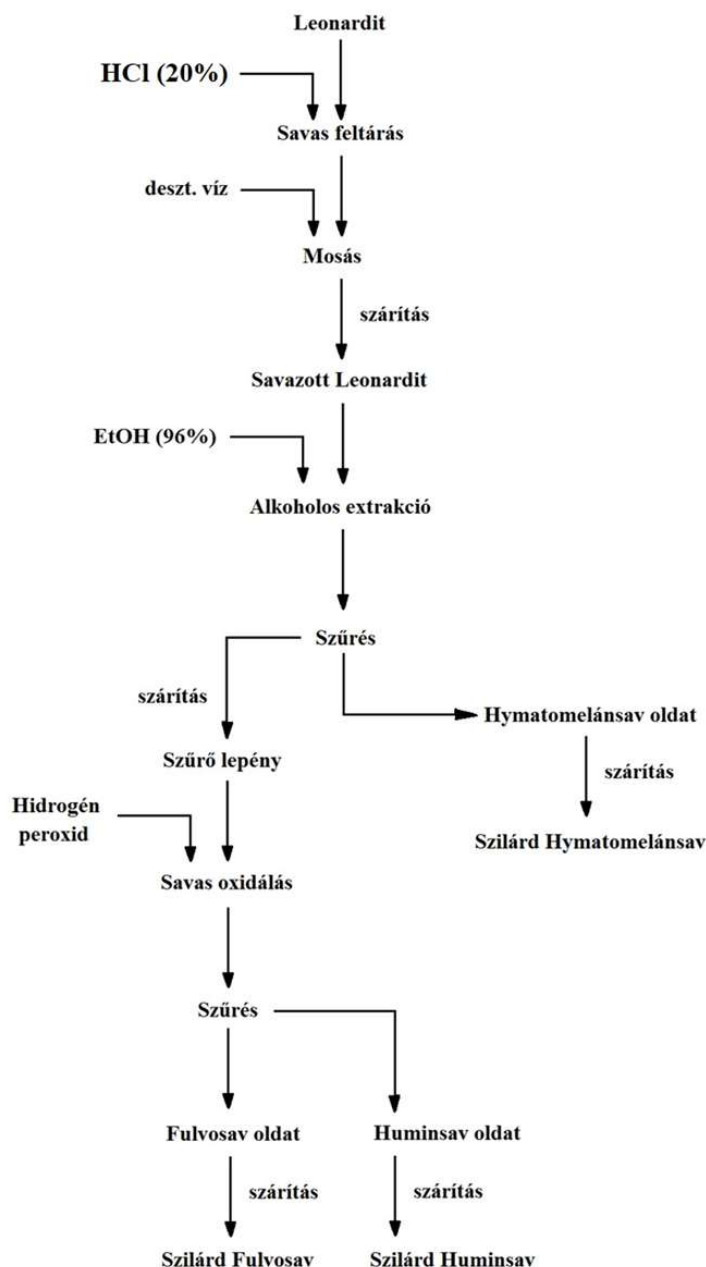
használtam (Merck, Kenilworth, NJ, USA). Laboratóriumi minőségű tömény  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -et (Merck, Kenilworth, NJ, USA) használtam a 10%-os (w/w%) oldatának elkészítéséhez. A  $\text{H}_2\text{O}_2$ -oldatot 35%-os koncentrációban (w/w%) a Mercktől (Kenilworth, NJ, USA) vásároltam.

#### 4.2.2. Savas feltársú minták készítése

A leonarditot először sósavval tártam fel, hogy a Ca-hoz kötött szerves anyagok felszabaduljanak. 1000 g megőrölt, szitált dudaritot összekevertem 5000 ml 20%-os HCl-oldattal egy gömblombikban. A lombik tartalmát 2 órán át óvatosan kevertem 30-40 °C-on visszafolyós hűtővel. Ezután a tartalmát leszűrtem és mostam, hogy eltávolítsam az el nem reagált savat. Ezt követően szárítószekrényben 40 °C-on szárítottam, és a további lépésekig tároltam az így keletkezett anyagot.

Az előkezelt szárított mintát ezután 96%-os EtOH-al extraháltam 1:9 arányban. Az EtOH-os extrakciót egy szűrési lépés követte. A szűrletben maradt az ac-HY frakció, amit kíméletesen szárítottam és további felhasználásig félretettem. Ezt követően a szűrőleplenyből dolgoztam tovább.

A szűrőleplenyt ezután hidrogén-peroxiddal oxidáltam. 400 g szárított mintából 10%-os szuszpenziót készítettem, majd 1:1 arányban (400 g)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -oldattal (35 w/w%) összekevertem (pH = 2). Az alacsony pH hatására a HA frakció kicsapódik. A következő lépés a centrifugálás (4000 ford./perc 5 percig) és 8-12  $\mu\text{m}$ -es szűrőpapírral történő szűrés volt. Az ac-FA frakciót a szűrletből nyertem ki, míg a fent maradt iszaptól az ac-HA frakciót. Végül az összes frakciót 40 °C-on szárítottam, és további felhasználásig tároltam. A folyamat ábrát a 20. ábrán mutatom be.



**20. ábra:** A savas feltárású minták kinyerésének folyamat ábrája

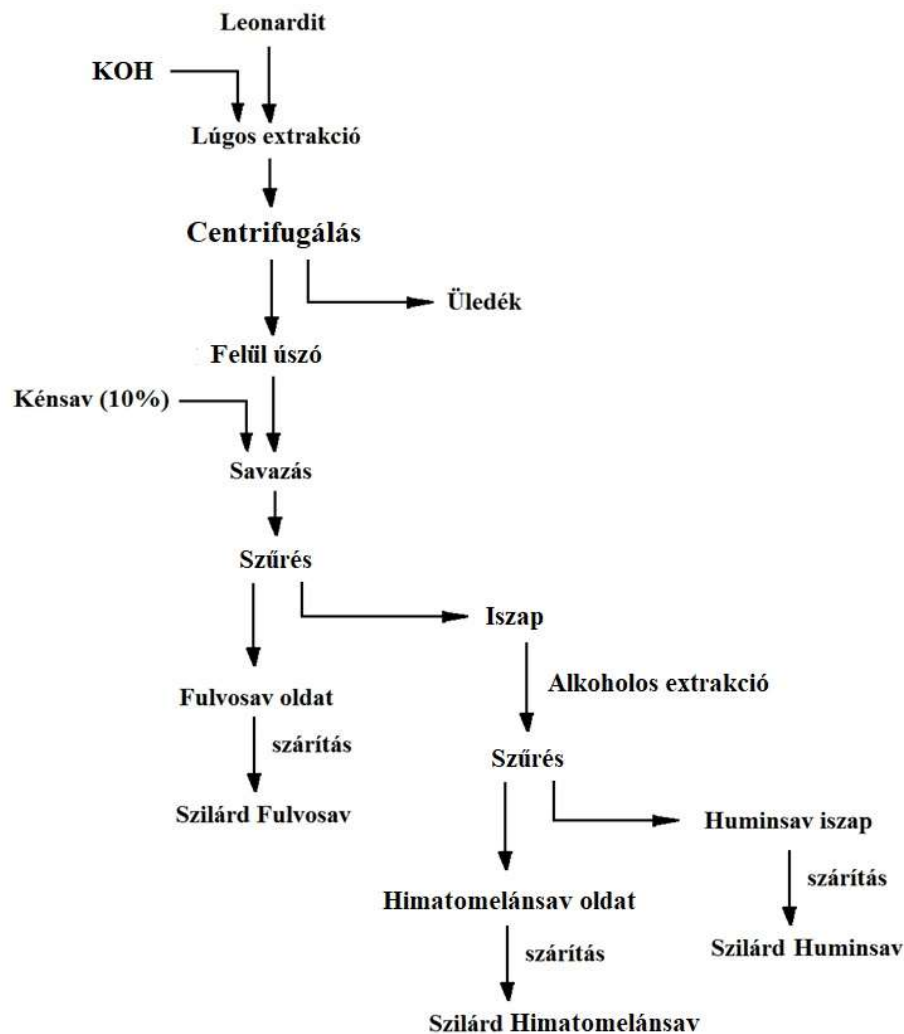
#### 4.2.3. Lúgos feltárású minták készítése

A leonarditot először 2,5%-os KOH-oldattal kezeltem. 500 g leonarditot 1500 ml 2,5%-os KOH-oldattal kevertem össze egy üvegreaktorban. A szuszpenziót 2 órán át 30-40 °C-on kevertem, a folyadékveszteség elkerülése érdekében visszafolyató hűtőt használtam. Ezután a tartalmat centrifugáltam (4000 ford./perc 5 percig), hogy az iszapot az oldattól elválasszam.

Az előző pontban keletkezett felülúszót megsavanyítottam kénsav hozzáadásával azért, hogy az al-FA és az al-HA frakciókat elkülöníthessem. A sav hatására a HA frakció összeáll,

iszapos, tixotróp szerű anyaggá, mivel csak lúgos oldatokban oldható, így könnyen elválasztható a FA frakciótól. 500 g felülúszóhoz hozzáadtam 100 g 10 (w/w) %-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-at. A pH jelentős csökkenése miatt az al-HA kicsapódott. A megsavanyított szuszpenziót leszűrtem. Az al-FA-frakciót a szűrletből, az al-HA-frakciót az iszapból kaptam alkoholos extrakció után.

A szűrt iszapot 96%-os etanollal extraháltam az al-HA és az al-HY elválasztására. Ezután az iszapot 1:9 arányban extraháltam 96%-os EtOH-al egy órán keresztül. Az extrakciót ülepítés és szűrés követte. A szilárd rész az al-HA, a szűrlet pedig az al-HY. Végül az összes frakciót kemencében 40 °C-on szárítottam, és további felhasználásig tároltam. A lúgos kinyerés folyamat ábráját a 21. ábrán mutatom be.



21. ábra: A lúgos feltárású minták kinyerésének folyamat ábrája

## 4.3 Fizikai kémiai vizsgálatok

### 4.3.1 Elemanalízis

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. Körülbelül 2-5 mg mintát precíziós mérlegen mértem és oxidálószerrel (vanádium-pentoxid [ $V_2O_5$ ]) kevertem össze ónkapszulában. A tartályt és a mintát  $1000\text{ }^\circ\text{C}$ -os reaktorban égették el, és az óntartály megolvadás után heves reakciót vált ki az oxigéndús légkörben. Ennek a reakciónak a termékeit ( $CO_2$ ,  $SO_2$ ,  $NO_2$ ) a hordozógáz (hélium) viszi a töltött oszlopokba. A gázáramot hővezetőképesség-detektorral mértem és kalibráció alapján számszerűsítettem a mennyiségeket, a minta elemtartalmát pedig tömegszázalékban számítottam ki. A mért adatokat nedvesség- és hamutartalomra korrigáltam, oxigéntartalmat számoltam [235].

### 4.3.2 UV-VIS spektroszkópai elemzés.

Az UV-Vis spektrumokat SP-UV1100, DLAB spektrofotométeren (DLAB Scientific Co., Ltd. Beijing, Kína) segítségével vettem fel, amely 190 és 800 nm közötti abszorpciós spektrumot vett fel. A mintákból hígítási sort készítettem [ $1 \cdot 10^{-3}\text{ g/cm}^3 - 1 \cdot 10^{-5}\text{ g/cm}^3$ ] intervallumban, úgy, hogy legalább 5 mintából álljon a sorozat. (Erre azért volt szükség, mert a különböző minták színintenzitása eltérő és csak azok kerültek bemutatásra melyeknek összehasonlítható a spektruma. A különböző minta koncentrációkhoz tartozó ábrákat a F1-es ábra tartalmazza). A minták hígított oldatát 1 cm-es kvarc küvettában mértem. Az (3)-es, (4)-es, (5)-es egyenletek alapján kiszámoltam a spektroszkópai indexeket.

### 4.3.3 FT-IR spektroszkópia elemzés

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. A KBr-nak és a mintáknak tökéletesen száraznak kell lenniük (mivel a víz infravörös mérésével is mérhető, és akkor hamis csúcsokat

kapnánk, amelyek elfedhetik más funkciós csoportok csúcsait), ezért 105 °C-on kell szárítani. A homogén halványzürke mintákat és a tiszta KBr-t a mintatartóba helyeztem, majd a készülékbe helyeztem. Először a KBr spektrumát mértem, majd az adott mintát pásztáztam. Minden spektrumot a 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  tartományban vettem fel 1  $\text{cm}^{-1}$  felbontás mellett.

#### 4.3.4. Potenciometriás sav-bázis titrálás

A potenciometriás sav-bázis titrálások elvégzéséhez a GIMET1 automata titrálóberendezést használtam, amelyet a Szegedi Tudományegyetem Kolloidkémia Tanszék munkatársai fejlesztettek ki. Felépítését tekintve kettő 665 Dosimat (Metrohm) burettából és egy hozzá kapcsolódó potenciométerből áll. Továbbá hozzá kapcsolódik egy gázáramlást szabályozó szelep, valamint egy pH szenzor (Radelkis OP-0808 P típusú kombinált üvegelektrod). A készülék működését, illetve a mérés lefutását, valamint az adatok rögzítését a szintén a tanszék által kifejlesztett AUTOTITR szoftver biztosítja. A titrálások elvégzéséhez szükséges  $\text{CO}_2$  mentes atmoszférát  $\text{N}_2$  gáz áramoltatásával, az oldatok homogenitását mágneses keveréssel biztosítottuk. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük, a titráló oldatokat a mérés megkezdése előtt  $\text{N}_2$  gázzal átbuborékolattuk, majd a berendezéshez zárt csőrendszeren át csatlakozó edényben tároltuk. Háttérelktroltként 0,005 M KCl oldatot használtunk, így biztosítottuk az állandó ionerősséget. Minden mérés előtt pH kalibrációt végeztünk, háromféle, ismert pH-ju pufferoldattal (Radelkis standard).

A mérések elvégzése során ~10 mg HS mintát 50 ml térfogatú, 0,005 M koncentrációjú KCl oldatban titráltunk, 3 – 10 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 háttérelktrolitot (0,005 KCl) tartalmazó oldatok titrálásával valósítottunk meg. A minták titrálása során egyensúlyi módot, a háttérelktrolitok titrálása során lineáris módot alkalmaztunk.

A mért értékek anyagmérleg alapján történő kiértékelésével, a szilárd anyag egységnyi tömegére vonatkoztatott  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  fogyasztást számoltuk, amiből az esetleg jelenlévő sav/bázis szennyezők korrekciójával a nettó felületi protontöbblet pH-függvényeket kapunk [236]. A negatív nettó felületi protontöbblet a protonok adott mennyiségének a felületi hiányát jelentik. Ez alapján ez a mennyiség éppen a disszociált savas funkciós csoportok mennyiségével egyenlő, azonban ellentétes előjellel. A disszociáció két lépcsőben megy végbe, egy gyengébb



és egy erősebb savas funkciós csoporthoz rendelve. Ezek azonosíthatók a fenolos és a hidroxil csoportok disszociációjával [237].

Az eredmények kiértékelése során a töltéssel rendelkező funkciós csoportok mennyiségét a minták össztömegére vonatkoztattuk, így a kapott töltéssűrűség mmol/g. Az adott pH értékre jellemző töltéssűrűség értékéből disszociációs funkciós csoportok száma megbecsülhető. Az általánosan elfogadott tapasztalati módszer szerint a töltéssűrűség pH 8-as értéken karboxil csoport, 8 és 10-es pH érték közötti töltéssűrűség változás duplája a fenolos hidroxil csoportok mennyiségével tehető egyenlővé [209].

#### 4.4 Antioxidáns hatást mérő módszerek

Az antioxidáns kapacitás a vizsgált rendszerre vonatkozó összes antioxidáns vegyület együttes szabadgyökfogó hatását jelenti. Ennek pontos, számszerű meghatározására egyre nagyobb igény jelentkezik, így számos analitikai eljárást, mérőrendszert fejlesztettek ki. Folyamatos a metodikák módosítása, finomítása, így napjainkra az alkalmazott módszerek száma már meghaladja a százat. A legtöbb irodalom nemcsak egy, hanem többféle módszert használ az antioxidáns kapacitás meghatározására [110].

##### 4.4.1 Összes fenol tartalom – TPC módszer

Az összes fenol tartalom meghatározást a *Vattem* és *Shetty* [3] által kidolgozott módszere alapján végeztem. 1 ml mintát 5 ml desztillált vizet és 1 ml 95%-os etanolt összemértem egy kémcsőbe, majd minden mintához 0,5 ml 50%-os Folin-Ciocalteu (FC) reagenst adtam (fele arányban deszt. víz fele arányban FC reagens). 5 perc keverés után 1 ml 5%-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  -ot adtam a reakció elegyhez majd 1 órán át állni hagytam.

Az egy óra várakozás után megmértem a minták abszorbancia értékeit 725 nm-en. A spektrofotometriai mérésekhez egy SP-UV1100, DLAB spektrofotométert (DLAB Scientific Co., Ltd. Peking, Kína) használtam, 1 cm-es kvarc küvettával) Ezt követően ezeket az abszorbancia értékeket átszámoltam  $\mu\text{g}$  GA ekvivalens értékre. A kalibráló egyenest különböző koncentrációjú GA mintákkal vettem fel, amiket etanolban oldottam fel.

Minta sorozatok mérése után pedig kiszámoltam a kalibráló egyenesből a mintákhoz tartozó összes fenol tartalmat GAE értékben. A minták háttérét és koncentrációját a 4.5.7-es fejezetben leírtak szerint korrigáltam, az ott leírtak szerint jártam el.

#### 4.4.2 FRAP módszer

A FRAP értékek meghatározása *Benzie és Strain* [115] módosított változatát használtam, 2,2'-dipiridil reagenssel, tripiridil triazine helyett.

Első lépésként elkészítettem a méréshez szükséges oldatokat. Az acetát puffer oldatot 300mM-os koncentrációban és 3,6 pH-n (3,1 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ; 16 ml ecetsav). A dipiridil reagenst 40mM-os HCl oldatban oldottam fel (500 mg 2,2' dipiridil 100 ml 40mM-os HCl-ban). Ezt követte a 20mM-os Fe(III) reagens elkészítése. Kimértem 54 mg a  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -ot és feloldottam 10 ml desztillált vízben.

Az oldatok elkészítése után kimértem 17,5 mg aszkorbinsavat (ASC) és feloldottam 100 ml 96% EtOH-ban (ún. aszkorbinsav törzsoldat), majd hígítási sort készítettem belőle, hogy feltudjam venni a kalibráló egyenest. Az oldatok és az ASC hígítás elkészítése után a mintáinkból is hígítási sort készítettem, mindegyik hígított mintából legalább három párhuzamos mérést végeztem. A minták hígítási koncentrációjuk intervalluma [ $1 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$  –  $1 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$ ] között mozgott.

Mindegyik hígított minta 2 ml-hez adtam a 6 ml 96%-os puffer oldatot, 1 ml dipiridil reagens. Ezután közvetlenül a mérés előtt hozzáadtam az elegyhez 1 ml Fe(III) reagenst. Kettő perc várakozás után egyből lemértem a minták abszorbanciáját 520 nm-en. Az eredményeket aszkorbinsavval készített kalibrációs görbe segítségével értékeltem ki, így azokat mg aszkorbinsav/g szárazanyagban adtam meg.

#### 4.4.3 DPPH módszer

A mérést a DPPH törzsoldat elkészítésével kezdtem, 39,5 mg DPPH-át kimértem és feloldottam 10 ml 96%-os EtOH-ban. Addig kevertetem sötétben amíg maradéktalanul fel nem oldódik a DPPH az EtOH-ban (kb 30 perc). A DPPH törzsoldatból DPPH munka oldatot készítettem (naponta). A DPPH törzsoldatból kivettem 1 ml-t és hozzáadtam 99 ml 96%-os EtOH-t (mérőlombik). A mintákból hígítási sort készítettem, mindegyik hígított mintából legalább 3 párhuzamos mérést végeztem. A minták hígítási koncentrációjuk intervalluma [ $50 \mu\text{g/ml}$  –  $500 \mu\text{g/ml}$ ] között mozgott.

A mérés során a minták 1 ml-hez hozzáadtam 6 ml DPPH munka oldatot (0,1 mg/ml), vortex-el összekevertem őket, 30 percig sötétben tároltam, amíg lejátszódott a színreakció. A 30 perc letelte után megmértem az abszorbanciákat 517 nm-en. A mérés előtt a spektrométert EtOH-ra nulláztam. Illetve mérés előtt mindig megmértem a használt DPPH munka oldat

abszorbanciáját is. A mért értékekből korrekció után kiszámítottam a gátlási %-okat (Inhibition %, Inhib. %) illetve az 50%-os gátláshoz tartozó értéket (IC50 érték).

$$\text{Inhibition \% (IC50)} = \frac{Abs_{kontroll}^{517\text{ nm}} - Abs_{minta}^{517\text{ nm}}}{Abs_{kontroll}^{517\text{ nm}}} * 100 \quad (6)$$

A mérés során hasonlóan jártam el, mint a többi mérésnél (4.4.10-es fejezetben leírtak szerint), ismert koncentrációjú mintából készítettem hígítási sort, és nem csak a reakció elegy abszorbanciáját hanem a minták saját háttérét is megmértem az adott koncentrációban. A mért abszorbanciákból a háttérrel való korrekciót követően kiszámoltam a minták gátlási %-át (Inhibition %, Inhib. %) és ezeket a gátlási %-okat ábrázoltam a koncentráció függvényében, hogy megtudjam határozni a minták 50%-os gátláshoz tartozó értéket (IC50 érték).

#### 4.4.4 CUPRAC módszer

A módszer *Karadirek* és munkatársai [121] nevéhez fűződik. A mérést az oldatok készítésével és a hígítási sorok készítésével kezdtem. A szilárd mintákból először 0,01 (m/m) %-os oldatot készítettem (*megjegyzés: a HA-ak oldásához 0,01 M-os NaOH-ot használtam, a HY-ok oldásához pedig EtOH-t*). Az elkészített oldatokat 15 órán át kevertetjük. Ezt követően leszűrtem az oldatokat egy 0,45 µm-es szűrőn szűrtem és a szűrletből dolgoztam tovább. Ennél a mérésnél nem készítettem hígítási sort a mintákból.

Cuprac módszernek megfelelően elkészítettem a következő oldatokat a méréshez. 10 mM-os CuCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (Cu(II)) és 1 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO törzsoldatokat készítettem tiszta desztillált vízben. Naponta friss 7,5 mM koncentrációjú neokuprein (Nc) oldatot készítettem 95 (V/V) % EtOH-ban. 1 ml Cu(II), 1 ml Nc és 1 ml NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO oldat összekeverése után 0,5 ml előzetesen elkészített és szűrt HS-mintát adtam ehhez a keverékhez. A végső térfogatot 4,1 ml-re egészítettem ki tiszta desztillált vízzel. Miután az oldatot állni hagytam és az elérte az egyensúlyt (30 perc) megmértem a minták abszorbanciáját 450 nm-en. Vak próbát is végeztem, amelyet 1 ml Cu(II), 1 ml Nc, 1 ml NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO oldatból és 1,1 ml tiszta desztillált vízből készítettem.

#### 4.4.5 Módosított CUPRAC módszer

Első lépésként 10 mM-os Cu(II) oldatot készítettem úgy, hogy megfelelő mennyiségű  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ -t oldottam fel 50 ml DMSO:H<sub>2</sub>O 1:3 arányú elegyében. Ezután 1 M-os NH<sub>4</sub>Ac (pH=7) oldatot és 7,5 mM-os Nc oldatot is készítettem szintén 50 ml 1:3 arányú DMSO:H<sub>2</sub>O elegyben feloldva. (megjegyzés: A [110] módszer szerint az 1:3 arányú DMSO:H<sub>2</sub>O keverék oldószerként való használata mellett érhető el a legmagasabb TAC-érték a HSs mintákra.). Miután a leírtak szerint elkészítettem oldatainkat a DMSO:H<sub>2</sub>O elegyben, 5 mg porított HS-mintát mértem be egy kémcsőbe. Ezután 1-1 ml Cu(II), Nc és NH<sub>4</sub>Ac oldatot adtam a mintákhoz, és végül 1,1 ml 1:3 arányú DMSO:H<sub>2</sub>O oldószert pipettáztam az elegyhez, szintén azért, hogy a végtérfogat 4,1 ml legyen.

A szuszpenziót ezután forgató gépre helyeztem 30 percre 150 rpm-re, ezt követően pedig lecentrifugáltam 4500 -as fordulatszámom 3 percen keresztül. Az így elválasztott felülúszót ezután szűrtem 0,2 µm-es cellulóz acetát membránon keresztül. Végül a spektrofotometriás méréseket 450 nm-en végeztem UV-Vis spektrofotométerrel.

#### 4.4.6 ORAC módszer

A HSs ORAC-értékét *Ou* és társszerzői által leírtak szerint határoztam meg [136]. A méréshez, 2,2'-azobisz (2-amidino-propán) dihidroklorid (AAPH), fluoreszcein és Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metil-kromán-2-karbonsavat) oldatokat készítettem el 7,4-es pH-jú 75 mM foszfát pufferben (megjegyzés: a foszfát puffer megjelölés egy konkrét, kettő foszfát vegyületből álló oldatot jelöl, melyek helyes arányai ebben az esetben: 15,161 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  + 2,545 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  1 liter desztillált vízben). A mérésekhez AAPH oldatot naponta frissen készítettem el 600 mM-os koncentrációban. Nátrium-fluoreszcein törzsoldatot (4 µM) nem szükséges naponta frissen elkészíteni tárolhatjuk 5°C-on zárt, alufóliába csomagolt üvegcsében. Közvetlenül a felhasználás előtt a nátrium-fluoreszcein törzsoldatot foszfátpufferrel hígítjuk 0,08 µM-os végkoncentrációra. A Trolox koncentrációja 15 µM volt.

A mérések elvégzéséhez Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) készüléket használtam és minden kísérleti lyukba/helybe 115 µl munka oldatot adtam (nátrium-fluoreszcein oldat foszfát pufferrel hígított 0,08 µM-os). A kontroll lyukakba 15 µl foszfát puffert, míg a standardok 15 µl Trolox hígítást kaptak, a minták pedig 15 µL HS oldatot 10 mg/l koncentrációban. A lemezt ezután 30 percig

37°C-on inkubáltam, az egyensúly elérésig. A reakciókat 15 µL AAPH hozzáadásával indítottam el. A fluoreszcenciát ezután kinetikusán követtem, percenként vett adatokkal 1 órán keresztül. A vizsgálat során 485 nm gerjesztési és 528 nm emissziós hullámhosszt használtam. Az AOC érték a fluoreszcencia kioltási görbéje alatti nettó védőterületre vonatkozott antioxidáns jelenlétében. Kiszámoltam a standard (Trolox) és a HS görbe alatti nettó területét (AUC) a (2) -es egyenlet alapján, az AUC értékekből pedig kiszámoltam az AOC értékeket az (1) -es egyenlet segítségével.

#### *4.4.7 ESR módszer*

A mérést 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.

A minta kis mennyiségét Eppendorf-csővekbe helyezték (körülbelül 3 mg-ot), és az összes mintát 1 ml vízzel hígították, kivéve a HY-t, amelyhez EtOH-t használtak. Mivel a HA minták nem oldódtak tiszta vízben, ezért egy csepp 1 M NaOH-t adtak ezekhez a mintákhoz. Mindegyik mintából 150 µl-t keverték össze 850 µl Tempol standarddal (35 µM vízben). A mintákat fecskendővel egy 1,7 mm-es EPR csőbe vitték át. A mérést a minták összekeverése után azonnal megkezdték.

A műszert ismert Tempol koncentrációkkal kalibrálták. Ez lehetővé teszi a gyökök koncentrációjának automatikus kiszámítását a jel intenzitásából. A mintákat 60 percig szobahőmérsékleten mérték a microESR-ben automatizáltan. Egy spektrumot 7,5 percenként vettek fel. Az ESR jelintenzitást automatikusan elemeztük, és a gyökkoncentrációkat az idő függvényében ábrázoltuk. A vizsgálatot megismételtük két frissen kevert mintával.

#### *4.4.8 Antioxidáns aktivitás vizsgálata enzimekkel*

A tesztek során használt hidrogén peroxidot (30 %), ammónium-molibdát (para) tetrahidrátot, a vízmentes dinátrium-foszfátot, nátrium-dihidrogén-foszfátot, xantint, nitrokék-tetrazóliumot (NBT) a VWR-től, míg a xantin-oxidázt a Sigma Aldrich-től szerezték be, analitikai tisztaságban. A kísérletek során egy ADRONA B30 típusú víztisztító készülékből nyert tisztított vizet használtak.

#### 4.4.8.1 Kataláz teszt

A kataláz teszt egy színváltozáson alapuló reakció, mely spektrofotometriás mérésekkel követhető. A reakcióelegy teljes térfogata 1,55 mL volt, mely 4,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t 24,1 mM ammónium-molibdátot és 1-200 mg/L HA mintát tartalmazott. A mérés során a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldatot összemérték a HA mintákkal, majd 3 perc után leállították a reakciót az ammónium-molibdát oldat hozzáadásával. Ennek eredményeként a reakcióelegyben megmaradt (el nem reagált) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> komplexet képez az ammónium-molibdáttal, mely komplex kialakulása sárga szín megjelenését eredményezi. A színváltozás 350 nm hullámhosszon mérhető. Az abszorbancia mérésével az oldatban maradt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyisége (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%)) az alábbi módon számítható ki:

$$H_2O_2(\%) = \frac{A_s}{A_0} \times 100 \quad (7)$$

*Ahol:*

*A<sub>s</sub> a reakció lejátszódását követően mért abszorbancia*

*A<sub>0</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és az ammónium-molibdát által kialakított komplex abszorbanciája.*

#### 4.4.8.2 Szuperoxid-dizmutáz teszt

A szuperoxid-dizmutáz aktivitás megállapításához a színváltozáson alapuló Fridovich-tesztet használtak. A reakcióelegy 0,2 mM xantint, 0,1 mM nitrokék-tetrazóliumot (NBT) és 0,3 g/L xantin-oxidázt tartalmazott, melyeket foszfát pufferben (1 mM, pH = 7) oldották fel. A reakcióelegyekben a HAS koncentrációját 1-100 mg/L koncentrációtartományban változtatták. A komponensek összemérése után az abszorbanciát 565 nm-en, 6 percig követték. Az inhibíció az abszorbancia változásából számítható ki:

$$I = \frac{\Delta A - \Delta A_0}{\Delta A_0} \quad (8)$$

*Ahol:*

*ΔA az abszorbancia változása a huminsav hozzáadásakor*

*ΔA<sub>0</sub> az abszorbancia változása a huminsav hozzáadása nélkül.*

#### 4.4.9 Elektrokémiai módszer

Az elektrokémiai méréseket *Muthuri* és munkatársai [238] munkája alapján végeztük. A mintaoldat antioxidáns aktivitásának becslésére az általuk javasolt kronopotenciometrikus módszer egy nagyon vékony filmmel kémiaileg módosított munkaelektrod alkalmazásán alapul, amely reverzibilis vagy kvázi reverzibilis redox rendszerként működik. Az alapelektrodon lévő felületi film elektroncsere-egyensúlyban van az elektrod vezető felületével. Potenciosztatikus vezérléssel dominánssá teszi a film oxidált állapotát. Ezt követően amennyiben az elektrod érintkezik a mintával, akkor a mintában lévő antioxidáns tulajdonságú molekulák elkezdik redukálni a filmréteget. A nyitott cellapotenciál (OCP) változása jelzi az antioxidáns aktivitási arány változását. A magasabb antioxidáns aktivitás várhatóan magasabb redoxpotenciál-idő görbe meredekséget eredményez.

$$\left(\frac{dE}{dt}\right) = f(a_{antiox.}) \quad (9)$$

Az elektrokémiai mérések részben PINEResearch WaveDriver200 bipotenciosztát/galvanosztát segítségével, AfterMath 1.5.9644 szoftverrel (Durham, NC, USA) vezérelt EIS elektrokémiai munkaállomással, részben GEPES 4.9.00 szoftverrel (Hollandia) vezérelt Autolab 12 munkaállomással történtek.

A kísérletekhez használt minden vegyszer analitikai minőségű volt. A 7-dimetilamino-1,2 benzofenoxazin (Meldola Blue) elektrokatalizátort az Aldrichtól, míg az L-aszkorbinsavat (AA) a Szkarabeustól (Magyarország) vásároltuk. A foszfátpuffer háttélektrolit komponenseit a Reanal (Magyarország) állította elő. A munkában használt összes vizes oldat elkészítéséhez  $6 \times 10^{-7}$  S/cm-nél kisebb fajlagos vezetőképességű, kettős ioncserélt vizet használtunk.

A kísérletek elvégzéséhez házi gyártású munkaelektrodákat alkalmaztunk. Üveges szénből (Alfa Aesar, GmbH, Németország) kb. 10 mm hosszú hengereket vágunk ki (5 mm átmérőjű). Az így kapott hengeres elektródatestet (átmérője 10 mm, hossza 10 cm) vagy kemény PVC-ből vagy teflonból készült forgó elektródacsúcsba ágyasztuk be. Háromelektrodos mérőcellákként hagyományos főzőpoharakat (50 és 100 cm<sup>3</sup> térfogatú) használtunk, telített KCl-oldattal töltött Ag/AgCl referenciaelektrodot (Radelkis, Magyarország) és ellenelektrodaként körülbelül 1 cm<sup>2</sup> felületű platinalemezt használtunk.

#### 4.4.10 A mérések nehézségei, korrigálásai.

Azoknál a méréseknél, ahol *UV-Vis* készülékkel mértem, korrigálni kellett a minták saját fényelnyelésével és fényszórásával. Amikor egy fénysugár a vizes oldatban oldott vagy diszpergált HSs szemcséit éri, a fényenergia egy része elnyelődik a kromofórok/fluorofórok gerjesztése miatt, az utóbbiak magasabb hullámhosszon fluoreszkáló fényt bocsátanak ki, más része pedig a beeső fényével megegyező hullámhosszon szóródik, kölcsönhatásba lép a HSs részecskék elektronfelhőjével. Az abszorpciós, fluoreszcencia és szórási jelenségek mindig jelen vannak a HS oldatok fényelnyelésével való kölcsönhatásában, de mindegyik relatív jelentősége erősen függ a beeső fotonok energiájától és a HS természetétől. A polidiszperz HSs-aknál a nagyobb molekulák/részecskék fényszórása probléma ilyen jellegű mérések esetén, az aromás jellegű mintáknál a fluoreszcencia okozhat gondot.

A saját kinyerésű és a nemzetközi HA minták színesek (barnás – sötét barna színűek), mert elnyelik a fényt általában a teszt módszerek jellemző hullámhossz tartományában. Ezért korrigálni kellett a mért abszorbancia értékeket a minták saját fényelnyelésével. (Ezeket a módszereket általában növényi anyagok, extraktumok mérésére találták ki. Ugyan, ott is színes anyagokkal dolgozunk, de azok koncentrációja kicsi az adott a növény és/vagy az extrakció minőségétől függően. Mi esetünkben azonban a száraz „tisza” frakció adott, amelyből változatos mennyiségeket kell feloldani az antioxidáns tesztekben.) Ezért ismert tömegű mintákból készítettem hígítási sorozatokat, és megmértem az adott hígításban a saját elnyelésüket.

A minta sorozatok koncentrációját úgy állítottam be, hogy az egy körüli abszorbancia elnyelés bele essen. Erre azért volt szükség, hogy össze tudjam hasonlítani a mintákat, mivel a három különböző frakciónak más-más koncentráció értékénél volt egy az abszorbanciája a reakció lejátszódása után. Másrészt a módszert alapvetően növényi extraktumokból kivont, kinyert hatóanyagok mérésére használják, ahol nem ismert a mért mintában lévő pontos anyag mennyiség, ezért az én méréseimnél kicsit más megközelítést kellett választani.

#### 4.5 Kísérletek, mérések helye

A saját minták kivonását, extrakcióját a munkahelyem laboratóriumában a Hymato Products Kft Szentkirályszabadjai telephelyén végeztem el. Az analitikai vizsgálatok egy részét itt, illetve a Szegedi Tudomány Egyetem Mérnöki Karának Élelmiszermérnöki Intézetében, valamint a Természettudományi és Informatikai Karának Fizikai Kémiai és Anyagtudományi



Tanszékén történtek. Az elemanalízist a Nápolyi Federico II. Egyetemen Olaszországban végeztem. Voltak olyan mérések, melyeket független laborban végeztek el.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS

A saját kinyerésű HSs frakciókat összehasonlítottam egymással és a referencia mintákkal egyrészt fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján. (elemi összetétel, molekulaméret eloszlás, funkciós csoportok stb.) Valamint antioxidáns tulajdonságaikat is összehasonlítottam egymással és más irodalmi értékekkel.

Az általam alkalmazott kétfajta kinyerési módszert kihozatal szempontjából is összehasonlítottam. A különböző frakciók mennyiségét mértem és a kiindulási anyaghoz képest számoltam ki a kinyert frakció mennyiségét (w/w)%-os arányban. A kinyerési %-okat a 4. táblázat tartalmazza.

Az adatok alapján kimondható, hogy a savas feltársú minták kihozatala jobb, nagyobb mennyiség nyerhető ki az egyes frakciókból, a humin frakcióból és a HA frakcióból. Viszont a FA és a HY frakció kihozatalát tekintve a lúgos kinyerés jobban teljesít.

**4. táblázat:** Az egyes frakciók kihozatal tömeg %-os összetételben

Rövidített név (kód)	Frakció	Kinyerési % (w/w) %	Kinyerési módszer
-	Humin	15	Lúgos
al-HA	Huminsav	51	Lúgos
al-FA	Fulvosav	30	Lúgos
al-HY	Himatomelánsav	4	Lúgos
-	Humin	20	Savas
ac-HA	Huminsav	60	Savas
ac-FA	Fulvosav	18	Savas
ac-HY	Himatomelánsav	2	Savas

### 5.1 A frakciók fizikai kémiai jellemzése

#### 5.1.1 Elem analízis eredményei

Az elemösszetétel adatait a 5. táblázat foglalja össze, illetve ábrázoltam mérésből kinyert adatokat is a 22. ábrán. Eredményeinket *Rice és MacCarthy* [239] munkájával hasonlítottam össze, akik több száz, HA- és FA-minta elemi összetételét határozta meg. Ebből

az összehasonlításból az az alábbiakat vonhatjuk le következtetés képpen. A saját kinyerésű HA és FA mintáinkban mért C, H, N, S és O mennyiségek hasonlóak az IHSS standardekknél megadott értékekhez. A minták O-tartalma a meghatározott tartományon belül van (HA-frakcióknál: 7,9-56,6 tömeg %, FA-nál pedig: 16,9-55,8 tömeg %. Ugyanezt elmondhatjuk a 5. táblázat atomarány adatairól is, hiszen a HA H/C aránya 0,08 és 1,85, a FA-é 0,77 és 2,13 között van; és a HA O/C aránya 0,08 és 1,2, az FA-é 0,17 és 1,19 között van.

Az eredmények általános tendenciája, hogy a HA, FA és HY frakciók széntartalma csökken, oxigéntartalma pedig nő. Ez a tendencia jól látható az IHSS minták esetében is. Mindazonáltal különbségek láthatók a saját kinyerésű minták és az IHSS minták összehasonlításakor. A saját kinyerésű mintáknál a C tartalom valamivel alacsonyabb, míg a H-tartalom néhány százalékkal magasabb. Az N és S százalékos aránya nagyjából azonos. Frakcióink oxigéntartalma magasabb, mint az IHSS mintáké, és a lúgos extrakcióból származó minták ezen értékei magasabbak, mint a savas extrakciós mintáké.

Az al-HA és az al-HY hasonló mennyiségű C-t tartalmaznak, de az O mennyisége nagyobb az al-HY-ben. Az al-FA kevesebb C-t tartalmaz, de O-tartalma a legmagasabb. Az ac-HA valamivel magasabb C-tartalommal rendelkezik, mint az ac-FA vagy az ac-HY, de O-tartalma lényegesen alacsonyabb. Ezek az eredmények összhangban vannak *Stevenson* és munkatársai munkájával [176]. Ezenkívül az al-HA kevesebb O-t tartalmaz, mint az ac-HA, de ez nem meglepő, mivel az oxigénezett csoportok kiemelkedő szerepet játszanak a fémek koordinációjában [176, 240].

Az elemanalízis eredményei azt mutatják, hogy a savasan feltárt frakcióknak magasabb a nitrogén tartalma (0,96 és 4,02% közötti), mint a lúgos eljárással feltárt minták nitrogén tartalma (ami 0,7 és 1,78% közötti).

A minták C/N arányának alakulását is összevettem és az alábbiakra jutottam. A Leonarditból kinyert, HA-ak C/N aránya (mind a lúgos és savas feltárású, HA-k; 34,71 és 68,35) még a tőzegből kivont IHSS HAP mintájénál is magasabb (17,82). Ez azt jelenti, hogy azok a frakciók, amiket tőzegből vonnak ki általánosságban sokkal több nitrogént tartalmaznak. A FA-frakciókat tekintve a legtöbb szakirodalom azt sugallja, hogy ennek a frakciónak a C/N aránya magasabb, mint a HA-é, ami az alacsony nitrogén tartalom és a viszonylag magas C-tartalom miatt következik be [241 - 243]. Ez az összefüggés a tőzegből kivont minták (két IHSS minta) esetében figyelhető meg; ez azonban nem vonatkozik a leonarditból kivont mintákra. Ez az arány a leonarditból kivont mintáknál megfordult.

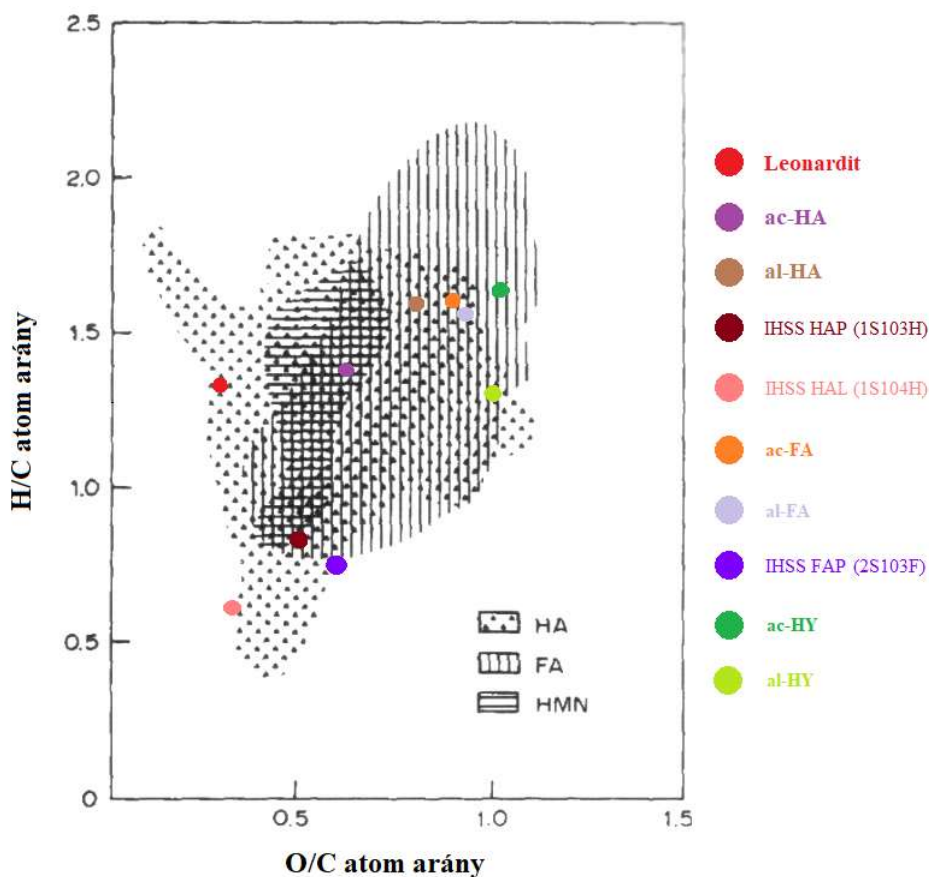
Mindegyik FA frakció magasabb O/C arányt mutat, mint a hozzá tartozó, HA frakció O/C aránya, ami megerősíti a *Stevenson* és munkatársai által megfigyelt tendenciát [176]. A

lúgos kivonású al-HA O/C aránya magasabb, mint savas társaiké. A HY-frakciók a legmagasabb O-tartalmat és a legalacsonyabb C-tartalmat mutatják. Ezért O/C arányuk magasabb, mint a HA- és FA-frakcióké.

Figyelembe véve a lúgos extrakciós frakciók H/C arányait, ezek általában magasabbak, mint a savas extrahálású mintáké. Mindkét extrakcióból származó minták esetében azonban a H/C arány magasabb, mint az IHSS standard mintáé. A H/C arányokat figyelembe véve a HY-frakciók érik el a legmagasabb értéket (mindkét extrakciós módszer esetében).

**5. táblázat:** A minták elemanalízisének eredményei, ahol bemutatom a C, H, N, O és S elemek tömegeit, és a különböző atomarányait

Minta	Elem összetétel (w/w) %					Atom arányok		
	C	H	N	S	O <sub>diff</sub>	H/C	O/C	C/N
Leonardite	61,79 ± 0,15	6,95 ± 0,02	1,68 ± 0,04	1,22 ± 0,03	28,38	1,34	0,34	42,89
ac-HA	49,11 ± 1,41	5,61 ± 0,12	1,65 ± 0,04	0,85 ± 0,06	42,78	1,36	0,65	34,71
ac-FA	40,19 ± 0,12	5,38 ± 0,09	4,02 ± 0,01	2,97 ± 0,01	47,44	1,60	0,89	11,66
ac-HY	38,21 ± 1,23	5,20 ± 0,2	0,96 ± 0,06	1,11 ± 0,58	54,52	1,62	1,07	46,42
al-HA	45,03 ± 1,33	6,17 ± 0,19	0,70 ± 0,03	0,38 ± 0,03	47,72	1,63	0,80	75,02
al-FA	40,70 ± 1,17	5,37 ± 0,03	0,98 ± 0,05	1,30 ± 0,56	51,65	1,57	0,95	48,43
al-HY	38,43 ± 0,97	4,2 ± 0,5	1,78 ± 0,09	2,31 ± 1,01	53,28	1,30	1,04	25,18
IHSS HAP	56,37	3,82	3,69	0,71	37,34	0,81	0,50	17,82
IHSS HAL	63,81	3,7	1,23	0,76	31,27	0,69	0,37	60,50
IHSS FAP	51,31	3,53	2,34	0,76	43,32	0,82	0,63	25,57



**22. ábra:** Az irodalmi adatokban fellelhető korábbi kutatások összefoglaló diagrammja, amely ábrázolja a HA-ak és FA-ak O/C atom arányt a H/C atom arány függvényében. Színes körök mutatják, hogy ezen belül hol helyezkednek el saját mintáink [239]

### 5.1.2. FT-IR Spektroszkópia eredményei

A minták FT-IR spektrumait a 23. ábra mutatja be és az irodalmi adatok alapján értelmezhetőek [241]. Mindegyik saját kinyerésű minta spektruma, tartalmaz egy éles és intenzív sávot  $1040\text{ cm}^{-1}$  körül. Ez a sáv a poliszacharidok, poliszacharid szerű anyagok és/vagy szilikát szennyeződések Si-O kötéseinek C-O vegyérték rezgéséhez rendelhető. A C-O kötéshez rendelt  $1218\text{ cm}^{-1}$  sáv az aril-éterek és fenolok rezgéséhez rendelhető. Az  $1420\text{ cm}^{-1}$ -nél jelentkező csúcs az O-H kötés deformációs szakasza és a C-O kötések, csoportok deformációs rezgése, ami fenolos OH csoportok deformációs rezgéséből származik. Az aromás gyűrűkben lévő C=C kötésekhez egy  $1610\text{ cm}^{-1}$ -es csúcs rendelhető, bár a konjugált karbonil csoportok C=O rezgései  $1600\text{ cm}^{-1}$ -nél nem zárhatók ki teljesen. Az  $1710\text{ cm}^{-1}$ -nél lévő sáv a karbonil csoportok C=O rezgésének felel meg.

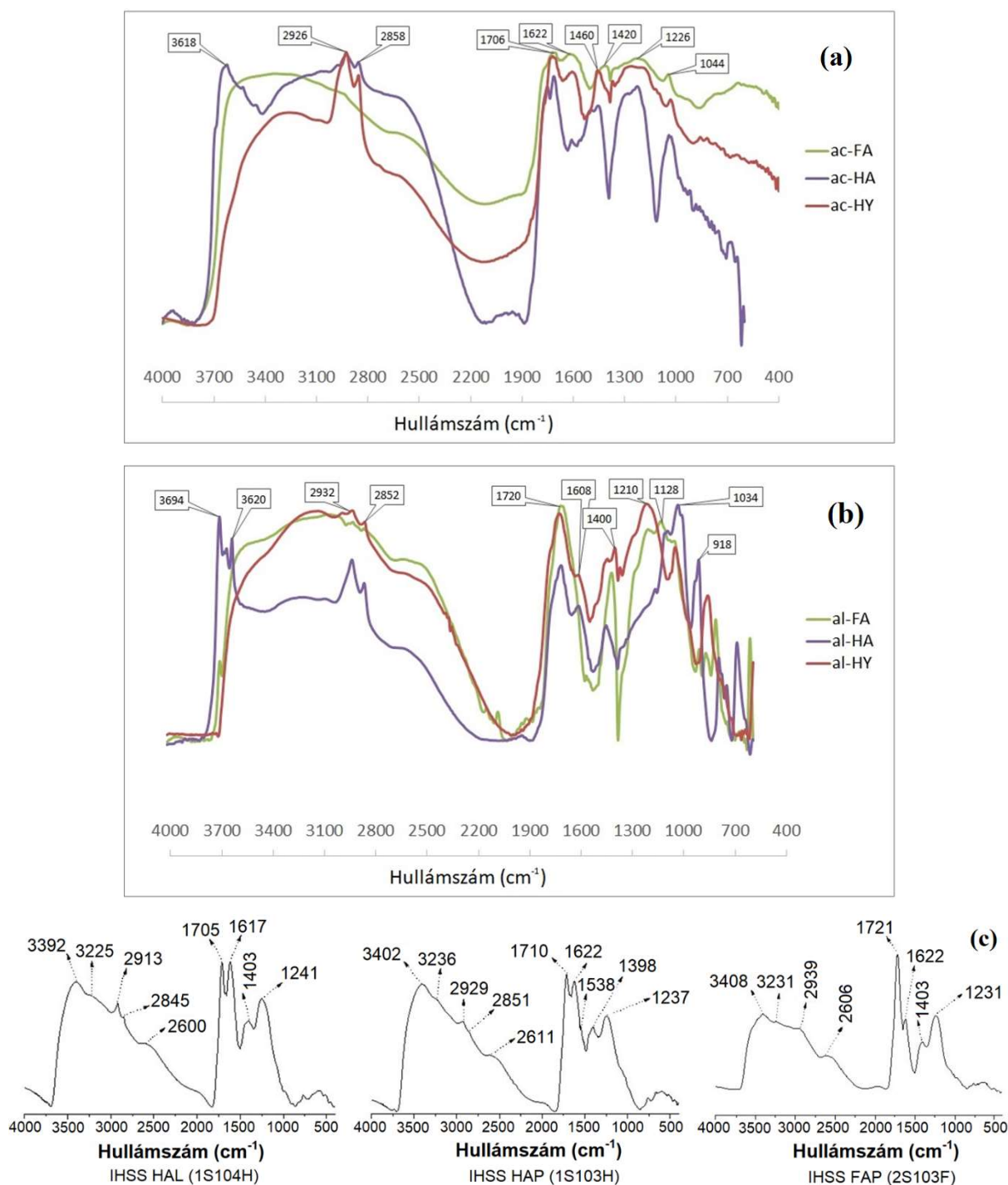
Mindhárom frakciónál továbbá megfigyelhetőek csúcsok 2850 és 2930  $\text{cm}^{-1}$  körül, amik egyrészt az OH csoportok rezgése és a COOH csoportok hidrogénkötéséből származnak. Az FT-IR spektrumok azt mutatják, hogy az itt vizsgált minták főként a szervesetlen összetevők tartalmában térnek el egymástól.

A saját kinyerésű minták spektrumaiban nincs túl nagy eltérés a deformációs rezgések tekintetében. A fő különbségek az ujjlenyomat régióban [600 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ ] vannak. Ebben a tartományban fellelhetőek egyes szervesetlen komponensekhez köthető rezgések, mint például a magnetit (Fe-O) rezgése 585  $\text{cm}^{-1}$ -nél, alumínium szilikátok (Si-O-Al) 693  $\text{cm}^{-1}$ -nél és a szilikátok (Si-O-Si) rezgése 1033  $\text{cm}^{-1}$ -nél. A deformációs rezgések nem fedik egymást teljesen, de tartozhatnak azonos vagy nagyon hasonló deformációs rezgésekhez. Például a 918  $\text{cm}^{-1}$ -nél jelentkező csúcs egyrészt a kaolinit deformációs sávjára jellemző, illetve a bennük található Al-O-H rezgésére. Továbbá a lúgos kinyerésű mintáknál megjelenik az 1034  $\text{cm}^{-1}$ -nél lévő sáv, de a savas kinyerésű mintáknál ez a sáv 1044  $\text{cm}^{-1}$ -re tolódik el. A C-O deformációs rezgéshez rendelt minden sáv a poliszacharidokhoz vagy a poliszacharid szerű anyagokhoz és/vagy szilikátszennyeződések Si-O kötéséhez tartozik. Ugyanez igaz az 1400-1420  $\text{cm}^{-1}$ , 1608-1622  $\text{cm}^{-1}$  és 1706-1720  $\text{cm}^{-1}$  sávokra is; a savas és lúgos frakciók esetében különböznek egymástól.

A különbségek egy, két egyedi spektrumban találhatóak. A 920  $\text{cm}^{-1}$ -nél lévő sáv csak az al-HA-nál látható; poliszacharidok C-O deformációjához van rendelve. Az 1128  $\text{cm}^{-1}$ -nél lévő sáv csak az al-FA frakció spektrumában látható, ami a szekunder alkoholok és/vagy éterek savval extrahált mintáira jellemző C-O kötés deformációja. Az 1214  $\text{cm}^{-1}$ -nél lévő sáv csak az al-HY és az al-FA frakciókban volt megfigyelhető. A 2850 és 2930  $\text{cm}^{-1}$  csúcsok nem jellemzőek az FA-ra, de a többi frakcióra igen. A HA-k egyedi sávja 3620  $\text{cm}^{-1}$ , amely kaolinit jelenlétét mutatja. A 700  $\text{cm}^{-1}$ -nél kisebb hullámszámú csúcsok és sávok az ásványi anyagoknak tulajdoníthatók.

A fő különbség az IHSS és a mi mintáink között, hogy az IHSS minták spektruma sokkal tisztább, mint a saját kinyerésű minták. Az ujjlenyomat intervallumban fedezhető fel a fő különbség, az IHSS mintáknál sok kis csúcsból áll, míg a saját kinyerésű minták esetében sok nagy csúcs, „zajos” jel figyelhető meg. Az ujjlenyomat régió (600 - 1400  $\text{cm}^{-1}$  hullámszám tartomány) leginkább arról ad információt, hogy milyen ásványi anyagokat tartalmaz egy minta. Az IHSS minták ezen tartománya arra utal, hogy kevesebb ásványianyagot tartalmaznak, mint a saját kinyerésű minták. Ennek oka lehet, hogy az IHSS kinyerési eljárása során több szeparációs és hamu mentesítési eljárást alkalmaznak. A másik különbség a 3230  $\text{cm}^{-1}$ , 3400  $\text{cm}^{-1}$  körüli sávok az O-H deformációhoz, az N-H deformációhoz (kisebb) és a hidrogén kötött

OH-csoportjához tartozik. A fő hasonlóságok az  $1230\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$ ,  $1620\text{ cm}^{-1}$ ,  $1710\text{ cm}^{-1}$  körüli sávok, az inflexió  $2600\text{ cm}^{-1}$ -nél (ami nagyon jellemző a HSs-ra),  $2850\text{ cm}^{-1}$  és  $2930\text{ cm}^{-1}$   $\text{cm}^{-1}$  [235, 242].



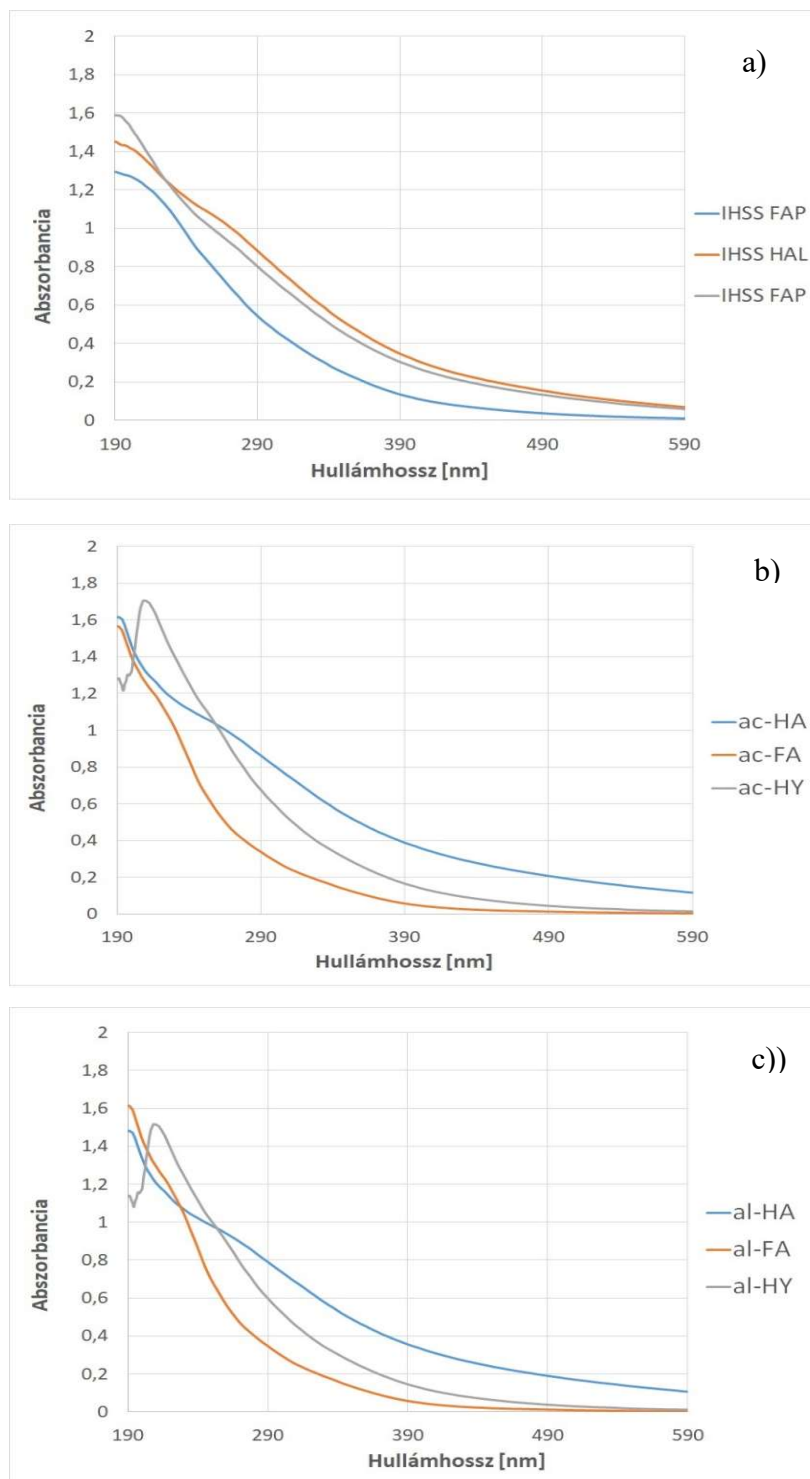
**23. ábra:** A frakciók különböző FT-IR spektrumai a saját kinyerésű minták és az IHSS minták összehasonlításához láthatók: a) savas feltáru minták spektruma (b) lúggal feltárt minták spektruma (c) IHSS referencia minták spektrumai az IHSS hivatalos webhelyéről: IHSS HAL (bal oldalon), IHSS HAP (középen), and IHSS FAP (jobb oldalon) [245]

### 5.1.3. UV-Vis Spektroszkópia eredményei

A különböző frakciók UV-VIS spektrumait a 24. ábra szemlélteti. (a különböző spektrumokhoz, különböző koncentrációk tartoznak, ahogy azt említettem a 4.3.2-es fejezetben). Általánosságban elmondható, hogy a HSs esetében ezek a spektrumok jellegtelenek [243]. Azonban jól észrevehető spektroszkópai különbségeket fedezhetünk fel a minták között. A legszembetűnőbb a HY frakciók spektrumában 210 nm-nél megjelenő csúcs, ami a másik két frakcióra egyáltalán nem jellemző, így úgy tűnik, hogy a HY spektroszkópai eszközökkel könnyen megkülönböztethető. Ennek oka egyrészt az lehet, hogy ez a frakció alkohol oldható, tehát egy olyan vegyület csoportra utal, amely csak alkohol jelenlétében oldódik ki, hisz a többi frakció nem alkohol oldható. Erre a csúcsra már más kutatók [246] is felfigyeltek, azonban ők HA és FA frakcióknál figyelték meg őket nem HY frakciónál. *Niu* és munkatársai [246] azt a megállapítást tették, hogy a származékcsoportok 206 nm-en, illetve 223,5 nm-en jelennek meg, amelyeket alkil-szubsztituált benzolgyűrűk és  $\pi$ - $\pi^*$  elektronátmenetek okoznak mono-, illetve diszubsztituált fenilkarboxi, illetve fenolos szerkezetekben [247 - 249]. Míg a 206 nm-en, 217,5 nm-en és 230,5 nm-en előforduló csúcsok szintén alkil-szubsztituált benzolgyűrűknek és  $\pi$ - $\pi^*$  elektronátmeneteknek tulajdoníthatók. Illetve más forrás szerint az amido és a karboxil csoportok jelenhetnek meg ennél a hullámhossznál [250].

Az FA és a HA frakciók között is találtam különbséget, miközben a HA frakciók spektruma folyamatosan növekszik, csökkenő hullámhossz mellett, míg az FA frakcióké sokkal élesebben és meredekebben kezd emelkedni. A saját kinyerésű minták és az IHSS minták közötti különbségek nem szignifikánsak.





**24. ábra.** A leonarditból kinyert különböző frakciók UV-Vis spektrumainak összehasonlítása az IHSS-mintákkal: (a) a savas extrakcióval kinyert frakciók, (b) a lúgos extrakcióval kinyert frakciók, (c) IHSS standard minták

A 24. ábra alapján jól látható, hogy a spektrumok nem mutatnak jellegzetes csúcsokat a HA és FA minták esetében, így nehéz a hasonlóságokat és különbségeket pontosan feltárni. Azonban a HSs esetében a különböző hullámhosszokon mért abszorbancia értékek

meghatározott arányai jól definiáltak, valamint információval szolgálnak a vizsgált minta tulajdonságáról. A főbb arányokat, mint az E4/E6, E2/E3 és URI indexeket a 6. táblázat foglalja össze. Az E4/E6 arányt fordítottan arányosnak tekintjük a HSs kondenzációs és aromás jellegével, valamint a humifikáció mértékével [174, 243].

Az E2/E3 arány korrelál a molekulamérettel [251, 252], hasonlóan az E4/E6 arányhoz. A HA-k E2/E3 aránya általában <5,0, míg az FA-ké 6,0 és 8,5 között van [252, 254]. Az UV abszorbancia arány index értékei (URI) információt adnak az UV-elnyelő funkciós csoportok és a telítetlen kötések, például az sp<sup>2</sup>-hibridizált szénatomok közötti relatív arányokról az aromás gyűrűkben.

**6. táblázat:** Spektrofotometriás indikátorok, a leonarditból kinyert frakciók, valamint az IHSS minták különböző hullámhosszúságú abszorbancia értékeinek hányadosából kapott

arányszámok összehasonlítása			
	E4/E6 Arány <sup>1</sup>	E2/E3 Arány <sup>1</sup>	URI Arány <sup>1</sup>
ac-HA	3,1	2,3	1,3
ac-FA	12,0	6,8	2,0
ac-HY	10,7	4,7	1,6
al-HA	4,2	2,5	1,2
al-FA	13,3	5,4	2,1
al-HY	10,2	4,8	1,7
IHSS HAP	5,5	2,7	1,4
IHSS HAL	5,3	2,5	1,3
IHSS FAP	15,5	4,4	1,5

<sup>1</sup> E4/E6 = Abs<sub>465nm</sub>/Abs<sub>665 nm</sub>; E2/E3 = Abs<sub>250 nm</sub>/Abs<sub>365 nm</sub>; URI = Abs<sub>210 nm</sub>/Abs<sub>254 nm</sub>.

A 6. táblázatban a HA minták E4/E6 aránya 3,1-5,5 közötti, ami megfelel a szakirodalmi adatoknak [243, 251 - 254], valamint azt jelzi, hogy a HA frakciók nagyobb molekulájúak, jobb minőségűek, stabil szerkezettel rendelkeznek és megfelelő humifikációs fokot mutatnak. Az FA minták E4/E6 aránya 12,0 és 15,5 között van, ami szintén korrelál az irodalmi adatokkal [243, 251 - 257]. Ez a számított érték arra utal, hogy az FA-frakciók kisebb molekulákból állnak, mint a HA- és HY-frakciók. A HY minták E4/E6 aránya 10,7 és 10,2 közötti, ami azt jelenti, hogy a HY frakció molekulamérete a HA és FA között van.

Hasonló következtetések vonhatók le az E2/E3 arányokból. A HA minták E2/E3 aránya 2,3-2,7 közötti, és mivel ez a jellemző paraméter az E4/E6 arányhoz hasonlóan fordítottan arányos a molekulamérettel, ez megerősíti, hogy a HA minták nagy molekulákból állnak. Az FA-minták E2/E3-aránya 4,4-5,4 közötti, ami megerősíti, hogy az FA-minták kisebb molekulákból állnak, mint a HA-minták. A HY minták E2/E3 aránya 4,7-4,8 volt, valamivel a HA és FA között, tehát a HY molekulamérete a HA és FA minták között helyezkedik el, ami összhangban van az E4/E6 arány megállapításával.

Az URI arányt kiértékelve azt látjuk, hogy a legkisebb értékek (1,2-1,4 között) a HA-frakciókhoz tartoznak. A HA-frakciókban van a legkevesebb UV-abszorbens funkciós csoport és/vagy telítetlen szénkötés az összes frakció közül. Tehát a funkciós csoportok és/vagy telítetlen kötések sűrűsége a HA-frakcióban a legkisebb, mivel az URI arány egyenesen arányos az UV-elnyelő funkciós csoportokkal és kötésekkel (és azok sűrűségével). 1,6 és 1,7 közötti értékkel a HY frakciók ismét a HA és az FA között vannak. Továbbá ismét az FA-nak van a legmagasabb aránya 1,5 és 2,1 között a HS három frakciója között. Ezek a mért értékek megegyeznek az irodalomban találtakkal [174, 243, 251 – 254].

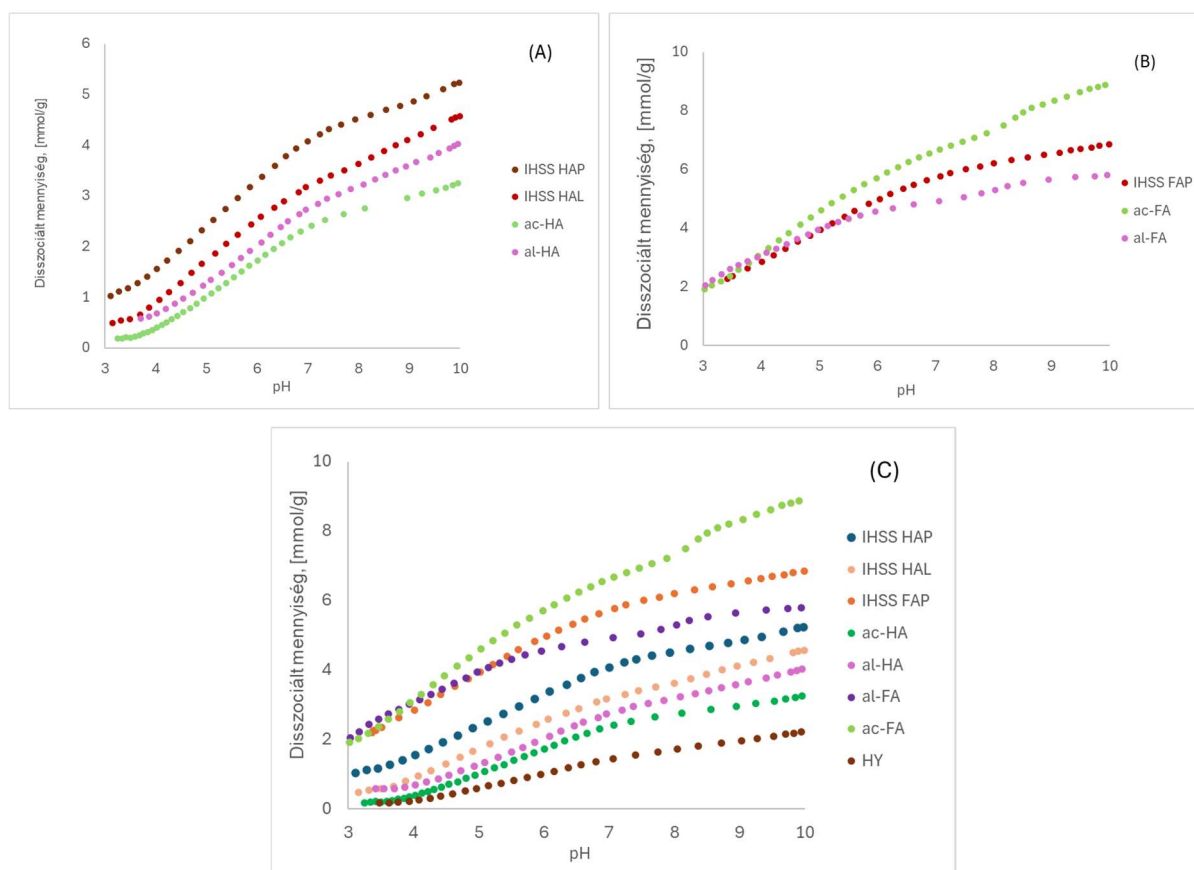
#### *5.1.4. Potenciometriás sav-bázis titrálás eredményei*

Potenciometriás sav-bázis titrálás eredményei alapján egyrészt elmondható, hogy a referencia mintákra kapott eredmények megegyeznek a szakirodalomban található értékekkel. Ez alapján megállapítható, hogy a módszer jól reprodukálható és így pontos képet ad az általam előállított mintákról is. A titrálás eredményei a 7. táblázatban találhatóak.

Másrészt összehasonlítottam a savas disszociációt jellemző pH-függvényeket a különböző saját frakciók és az IHSS referencia minták esetén is. A HA frakciók pH-függő disszociációja hasonló lefutásúak (25 A. ábra), mint a referencia anyagoké. Tehát az általam előállított minták jól korrelálnak a referencia minták disszociációs arculatával. A karboxil és fenolos hidroxil csoport tartalma azonban kisebb az általam előállított mintáknak, mint a referencia mintáknak. A FA frakciók esetén is hasonló mondható el, a savas és a lúgos kinyerésű FA minták disszociációs görbéje között helyezkedik el a referencia minta, IHSS FAP görbéje. Az általam előállított FA esetén 8-as pH értéknél megjelenő „lépcső” a karbonát jelenlétére utal. A HY frakció vizsgálata újdonság volt. A dolgozat megírásáig nem találtam olyan szakirodalmi adatot, amelyben megmérték volna ezen frakció COOH és ArOH értékeit potenciometriás sav-bázis titrálással.

**7. táblázat:** A potenciometriás sav-bázis titrálás során kapott COOH, fenolos OH csoportok és teljes savasság értékei a szilárd minták tömegére vonatkoztatva

	COOH [mmol g <sup>-1</sup> ]	ArOH [mmol g <sup>-1</sup> ]	Teljes savasság [mmol g <sup>-1</sup> ]
IHSS HAP	4,51	1,51	6,03
[210] Peat HA	5,08	1,08	6,16
IHSS FAP	6,21	1,34	7,56
[210] Peat FA	6,72	1,17	7,89
IHSS HAL	3,63	1,89	5,52
[210] Leonardit HA	4,77	1,48	6,25
al-HA	3,23	1,60	4,83
al-FA	5,31	0,99	6,30
al-HY	1,73	0,97	2,70
ac-HA	2,76	0,99	3,76
ac-FA	7,50	2,77	10,27



**25. ábra:** A HS minták pH-függő disszociációja. (A) a HA minták összehasonlítása, (B) a FA összehasonlítása, (C) az összes minta pH-függő disszociációja.

A sav-bázis titrálási eredmények egybe vágnak a 11-14. ábrákon látható elméleti molekula modellekkel, melyek szerint a FA frakció tartalmazza a legtöbb COOH csoportot, a HY frakció pedig a legkevesebb COOH és ArOH -t.

## 5.2 Humuszanyag frakciók antioxidáns jellege

### 5.2.1 Összes fenol tartalom - TPC módszer eredményei

Ebben a módszerben a minták TPC (total phenolic content, azaz összes fenol tartalmát) értékeit galluszsavra vonatkoztatjuk, így GAEAC (galluszsav ekvivalens antioxidáns kapacitás) értékeket adjuk meg. A lineáris kalibrációs görbe az F2 ábrán látható. A minták mért abszorbancia értékei megfeleltek az F2 ábrán megadott GA koncentrációknak, a GAEAC értékeket pedig a mintakoncentrációk figyelembevételével számítottam ki. Meg kell említenem, hogy a különböző minták, különböző kezdeti koncentrációira van szükség ahhoz, hogy a vizsgálatban hasonló abszorbancia szinteket érjünk el (lásd a 4.4.10 fejezetben). A TPC mérések eredményeit a 8. táblázat tartalmazza.

Az eredmények azt mutatják, hogy a HA minták tartalmazzák a legtöbb fenolos csoportot a különböző frakciók közül. Ezért a HA-frakciókból kellett a legalacsonyabb kezdeti koncentrációt alkalmazni, hogy elérhessük az egy körüli abszorbancia értéket. A mintákat, ha rangsorolni kívánnánk fenolos tartalmuk szerint, akkor ahogy említettem a HS frakciók állnának első helyen, a HY frakciók középen, a FA pedig a legalacsonyabb fenolcsoport-tartalommal rendelkeznek.

Az is megfigyelhető, hogy az IHSS standard mintákban sokkal több fenolcsoport van, mint a saját kinyerésű mintákban. A legnagyobb különbség az FA minták között van, mivel az IHSS FA-ban majdnem annyi fenolcsoport van, mint a saját kinyerésű HY mintákban. Ezekből az adatokból elmondható, hogy az extrakciós módszer és a végső tisztaság is nagyon fontos a TPC-tartalom szempontjából, függetlenül az alapanyagtól. A fenolos csoportok mennyisége pedig hatással lehet a minta antioxidáns képességére.

Meg kell említeni, hogy a minták saját fényelnyelése 725 nm-en befolyásolja a TPC-tartalom mérést. A különböző frakciók saját fényelnyelése eltérő módokon befolyásolják az eredményeket. Egyrészt a 725 nm-es fényelnyelési képességük zavarja a mérést. Másrészt azért, mert eltérő koncentrációjuk volt az abszorbancia körül, ahol minden eredmény bemutatásra került. Minél nagyobb a minta koncentrációja, annál nagyobb az saját fényelnyelési hatása és a korrigált eredményekre gyakorolt hatása.

Az eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált HS-frakciók magas TPC-tartalmúak, ami azt jelenti, hogy szabad gyökfogóként vagy antioxidánsként működhetnek. Ha ezeket az eredményeket összevetjük a 9. táblázatban bemutatott különböző irodalmi adatokkal, akkor ezek gyökfogó képességét a jól ismert gyümölcsök vagy gyümölcslevelek közé helyezhetjük.

Ezek az adatok meggyőzőek arról, hogy a HS-frakciók nagy mennyiségben tartalmaznak fenolos csoportokat, amelyek jó szabadgyökfogó vagy antioxidáns hatást jeleznek előre.

**8. táblázat:** A különböző HSs frakciók összes fenoltartalma (TPC) GAE egyenértékben

	<b>A minta koncentrációja [mg/ml]</b>	<b>GAE érték [mg GAE/g]</b>	<b>Korrigált GAE érték [mg GAE/g]</b>	<b>Szórás</b>
ac-HA	3,0	311,6	310,3	± 1,29
ac-FA	10,0	91,2	86,8	± 0,88
ac-HY	5,0	186,4	174,5	± 0,47
al-HA	3,0	302,7	300,6	± 1,12
al-FA	10,0	87,8	81,1	± 0,76
al-HY	6,0	187,2	152,5	± 0,48
IHSS HAP	2,2	472,4	471,2	± 1,45
IHSS HAL	2,8	506,1	446,9	± 3,37
IHSS FAP	1,8	156,8	154,1	± 0,55

**9. táblázat:** A különböző gyümölcsök és növényi kivonatok TPC értékei GAE egyenértékben megadva

	<b>GAE érték</b>	<b>Mértékegység</b>	<b>Irodalmi hivatkozás</b>
Rattan paprika gyümölcsök (vad) <i>Z. armatum,</i>	185,0	mg GAE/g	[228]
Rattan paprika gyümölcsök (termesztett) <i>Z. armatum,</i>	226,3	mg GAE/g	
Frissen facsart gyümölcslevek Alma	44,8	mg GAE/ml	[184]
Frissen facsart gyümölcslevek Mangó	80,4	mg GAE/ml	
Kereskedelmi 100%-os gyümölcslevek Alma	21,6	mg GAE/ml	
Kereskedelmi 100%-os gyümölcslevek Gránát alma	130,0	mg GAE/ml	
Sziklarózsa <i>Cistus incanus L,</i>	363,6	mg GAE/g	[185]
Erdei gyömbérgyökér <i>Geum urbanum L,</i>	234,5	mg GAE/g	
Málna <i>Rubus idaeus L,</i>	143,6	mg GAE/g	

### 5.2.2 DPPH módszer eredményei

A DPPH módszer adatai egyértelműen azt mutatják, hogy a saját kinyerésű minták gyökfogyó aktivitással rendelkeznek, mert hatékonyan segítik a stabil DPPH molekula kialakítását.

Ahogy azt a 4.4.10 fejezetben már említettem, a minták saját fényelnyelése 517 nm-en (lásd UV-Vis spektrumot a 24. ábrán), ahol a lila DPPH gyök abszorbanciáját mérjük, zavarja, megmászítja a mérési eredményeket, ezért korrekciót kellett végrehajtanom, ahogy azt *Celiz* és munkatársai is javasolják [255]. A választott módszernek megfelelően minden minta esetében megmértem a DPPH oldat fényelnyelését, majd minden minta esetében a módszer szerint alkalmazott azonos koncentrációban megmértem a saját fényelnyelést 517 nm-en. Ezt a saját fényelnyelési értéket levontam a DPPH vizsgálatban mért abszorbancia értékéből, hogy kiküszöböljük a színes mintaoldatok zavaró hatását. A gátlás/inhibíció %-os értékeit a (6) egyenlet szerint számítottam ki a korrigált abszorbancia adatok ismeretében. Ily módon reálisabb értékekhez juthattam. Az IC<sub>50</sub> értékeket, azaz az 50%-os gátlásnak megfelelő koncentrációkat a különböző frakciók esetében a 10. táblázat foglalja össze.

**10. táblázat:** Különböző frakciók DPPH szabad gyökfogyó aktivitása IC<sub>50</sub> értékben kifejezve

	IC <sub>50</sub> értékek [µg/mL]	Szórás
ac-HA	260	± 0,09
ac-FA	400	± 0,07
ac-HY	200	± 0,09
al-HA	180	± 0,15
al-FA	310	± 0,05
al-HY	190	± 0,10
IHSS HAL	57	± 0,29
IHSS HAP	53	± 0,33
IHSS FAP	326	± 0,36

Ha összehasonlítjuk az IHSS mintákat a leonarditból kivont frakcióinkkal, akkor elmondhatjuk, hogy mindegyik frakció antioxidáns hatású, de az igazán tiszta IHSS HA frakciók a leghatékonyabbak. Feltételezhető, hogy az IHSS extrakciós protokollban szereplő nehéz és precíz tisztítási lépések garantálták számos egyéb olyan anyag eltávolítását, amelyek

csökkenthetik az antioxidáns hatékonyságot a DPPH gyökök lebomlásának gátlásában. A tiszta IHSS-frakciók sokkal reaktívabbak és elérhetőbbek a DPPH-gyök számára. A DPPH teszt szerint jobb redukáló képességet mutatnak, mint az általam kinyert frakciók. Az IHSS-frakciók eredményeiből látható, hogy a legerősebb antioxidáns hatás a HA-frakcióké, és a tőzgeből és a leonarditból kivont frakciók között alig van különbség az utóbbi frakció javára. Az IHSS FAP is mutat antioxidáns hatást, de közel sem olyan erős, mint a HA-frakciók.

A saját kinyerésű minták eredményeit elemezve azt látjuk, hogy a saját mintáink is rendelkeznek gyökfogó aktivitással. A HY-frakciók rendelkeznek a legerősebb antioxidáns aktivitással, ezt szorosán követik a HA-frakciók, majd az FA-frakciók. Általánosságban elmondható, hogy a lúgos extrahálású minták nagyobb antioxidáns hatást mutatnak, mint a savas extrakciós frakciók.

Eredményeimet összevetettem *Phongpaichit* munkásságával [256], eszerint IHSS HA frakciók közepes szabadgyökfogó aktivitást mutatnak, mivel IC<sub>50</sub> értékük 50 és 100 µg/ml között van. A többi minta IC<sub>50</sub> értéke 100 és 350 között van, ez alapján *Phongpaichit* és munkatársai szerint [256] gyenge antioxidánsnak számít. *Phongpaichit* és munkatársai szerint meghatározott gyökfogó hatás mértékeit a 11. táblázatban mutatom be. A közelmúltban *You* és munkatársai [257] azt találták, hogy az FA-frakció hasonló DPPH gyökfogó képességgel rendelkezik, mint az aszkorbinsav, és 1000 µg/ml koncentrációnál elérte a ~50%-os gátlást. A krétapalából kivont természetes szerves anyagok (FA- és HA-frakciók) esetében szintén az aszkorbinsavhoz hasonló antioxidáns hatást figyeltek meg 25-1000 µg/ml koncentrációtartományban [258]. Azonban a DPPH gyök bomlásának ~50%-os gátlását már a fenténél jóval alacsonyabb koncentrációban (~250 µg/ml) sikerült elérni. Ez utóbbi szinte megegyezik a HSs mintáink korrigált IC<sub>50</sub>-értékeinek átlagával a 10. táblázatban. Ha azonban ezeket az IC<sub>50</sub> értékeket összehasonlítjuk a jól ismert antioxidánsok, például az áfonya, a málna vagy a szeder egyéb irodalmi adataival [259], elmondhatjuk, hogy a mintáink ugyanolyan jók vagy még jobbak is, mint ezek az antioxidánsok. A HS minták azonban gyakran nem érik el az aszkorbinsav, a narancssárga pitanga antioxidáns hatékonyságát [260, 261]. Ezen irodalmi értékek a 12. táblázatban láthatóak, illetve az eredményeket pár irodalmi értékkel együtt oszlop diagrammon is ábrázoltam a 26. ábrán.

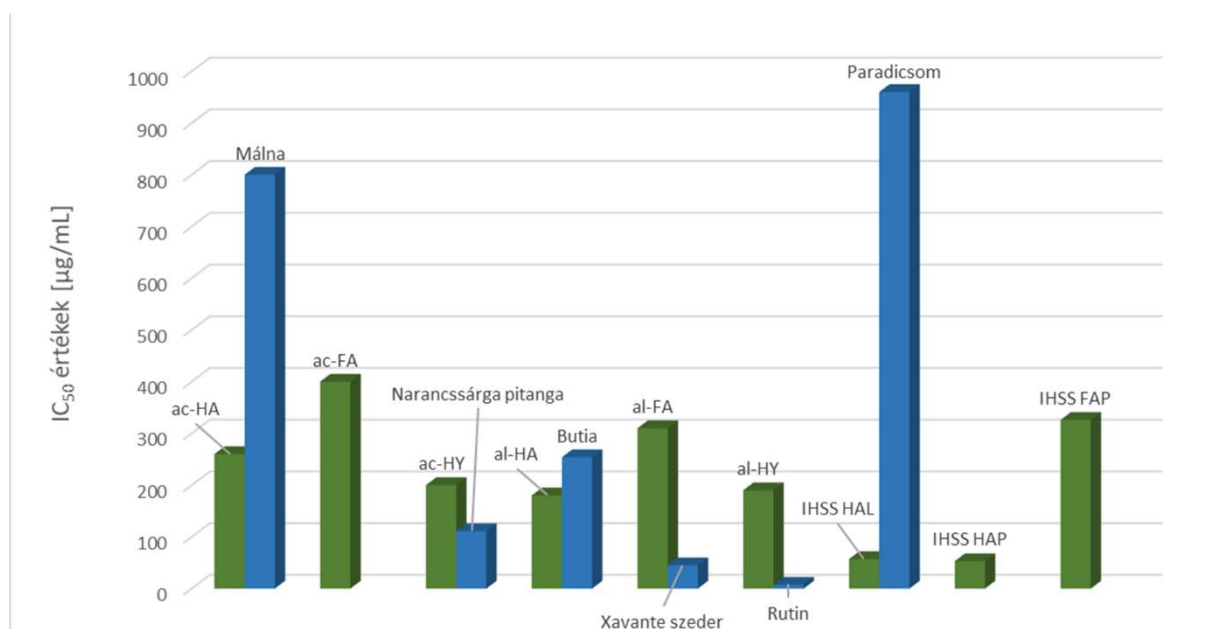


**11. táblázat:** IC<sub>50</sub> értékek értékelése *Phongpaichit* és munkatásai munkája alapján [256]

IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Értékelés
10-50 µg/mL	Erős antioxidáns aktivitás
50-100 µg/mL	Közepes antioxidáns aktivitás
>100 µg/mL	Gyenge antioxidáns aktivitás

**12. táblázat:** IC<sub>50</sub> értékek különböző gyümölcsökre és hatóanyagokra

	IC <sub>50</sub> értékek [µg/mL]	Irodalmi hivatkozás
<i>Málna</i>	800,0	[259]
Resveratrol	4700,0	
Narancssárga pitanga	110.91 ± 18.9	[260]
Butia	253.80 ± 25.4	
Xavante szeder	44.70 ± 2.1	
Rutin	7,2 ± 0.00	[261]
Paradicsom	960 ± 1,0	



**26. ábra:** A különböző HSs frakciók (zöld) és különböző gyümölcsök, kivonatok (kék) IC<sub>50</sub> értékei ábrázolva (legkisebb érték jelenti a legjobb gyökfogó hatást)

### 5.2.3 CUPRAC módszer eredményei

Ebben a módszerben egyrészt a Troloxot használtam, mint referencia molekula, azért, hogy a minták antioxidáns kapacitás értékeit TEAC mértékegységben (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) tudjuk meghatározni. Másrészt mivel a HAs a GA-al némileg szerkezeti analógiát mutatnak, GA-at is használtam referenciavegyületként. Ekképpen a GAEAC értékeket is meghatároztam a mintáinkra. Így több irodalmi adattal is összehajthatom a saját mérési eredményeinket.

Mindkét referenciavegyület lineáris kalibrációs görbéje az F3 és F4 ábrán látható. A GAEAC és a TEAC értékeket a minták mért abszorbancia értékeiből számítottam ki, amelyek megfeleltek az F3 és F4 ábra adott Trolox és GA koncentrációinak, illetve a HS minta koncentrációknak. A CUPRAC módszer eredményeit a 13. táblázat tartalmazza. A korábban említett saját fényelnyelése is befolyásolja a módszer eredményeit. Ennél a módszernél azonban minden frakció azonos koncentrációjú, mert a protokoll szerint 0,01 (m/m) %-os oldatokat kell használnom. De miután a frakciók saját fényelnyelési korrekcióját kivonták a mért abszorpciós értékekből, az eredmények megváltoztak, és a hatás mértéke frakciónként eltérő volt.

Az eredmények alapján elmondható, hogy mindegyik frakció antioxidáns hatású. A legjobb értékek szintén az IHSS mintákhoz tartoznak. A frakciókat tekintve nyilvánvaló, hogy a HY frakciók rendelkeznek a legmagasabb GAEAC és TEAC értékkel. Ezt követik a HA-frakciók, az FA-frakciók pedig az utolsók a listánkon.

**13. táblázat:** A GAEAC és TEAC a különböző frakciók CUPRAC módszerrel mért értékei

	GAEAC [μmol/g]	Korrigált GAEAC érték [μmol/g]	A GAEAC értékek szórása	TEAC [μmol/g]	Korrigált TEAC érték [μmol/g]	A TEAC értékek szórása
ac-HA	19,12	10,07	± 0,69	252,41	124,83	± 9,8
ac-FA	8,85	5,18	± 0,68	107,59	55,86	± 9,7
ac-HY	23,15	18,75	± 0,86	309,31	247,24	± 12,2
al-HA	18,97	9,94	± 0,64	216,72	108,15	± 9,4
al-FA	8,16	5,03	± 0,55	101,58	51,32	± 8,7
al-HY	21,87	17,66	± 0,91	294,23	236,45	± 11,7
IHSS HAP	32,62	31,56	± 0,12	315,48	287,48	± 5,6
IHSS HAL	38,56	34,82	± 0,18	398,65	314,86	± 5,2
IHSS FAP	18,66	17,14	± 0,14	284,64	168,45	± 4,8

#### 5.2.4 Módosított Cuprac módszer eredményei

A mérés során ugyanazokat a kalibrációs görbéket használtam, mint a CUPRAC-módszer esetében (F3 ábra). Az eredményeket a 4.5.7 fejezetben ismertetett kiértékelés alapján számítottam ki. A QUECHER-CUPRAC módszerrel kapott GAEAC és TEAC eredményeket a 14. táblázat foglalja össze. Ennél a módszernél a korábban említett saját fényelnyelési jelenség nem zavar annyira, mint a CUPRAC méréseknél, de így is megfigyelhető.

Az eredmények azt mutatják, hogy ezek a kapacitásértékek magasabbak, mint a CUPRAC módszernél. Az eltérés fő oka az lehet, hogy ez a módszer a minták szilárd formáját használja, amelyek az eljárás során feloldódnak. Így több funkciós csoport vehet részt a reakcióban, mint a CUPRAC-módszerben.

Itt is látható, hogy az IHSS minták teljesítménye a legjobb, és a frakciókat tekintve ugyanaz a sorrend figyelhető meg, mint a CUPRAC módszernél, vagyis a HY frakciók a legmagasabb GAEAC és TEAC értékkel rendelkeznek, amit a HA, majd az FA frakciók követnek. Azt is elmondhatjuk, hogy az extrakciós módszer és a végső tisztaság nagyon fontos a CUPRAC és a QUECHER CUPRAC módszerekkel mért antioxidáns tartalom szempontjából, alapanyagtól függetlenül.

**14. táblázat:** A különböző frakciók GAEAC és TEAC értékei a módosított, QUECHER-CUPRAC módszer szerint

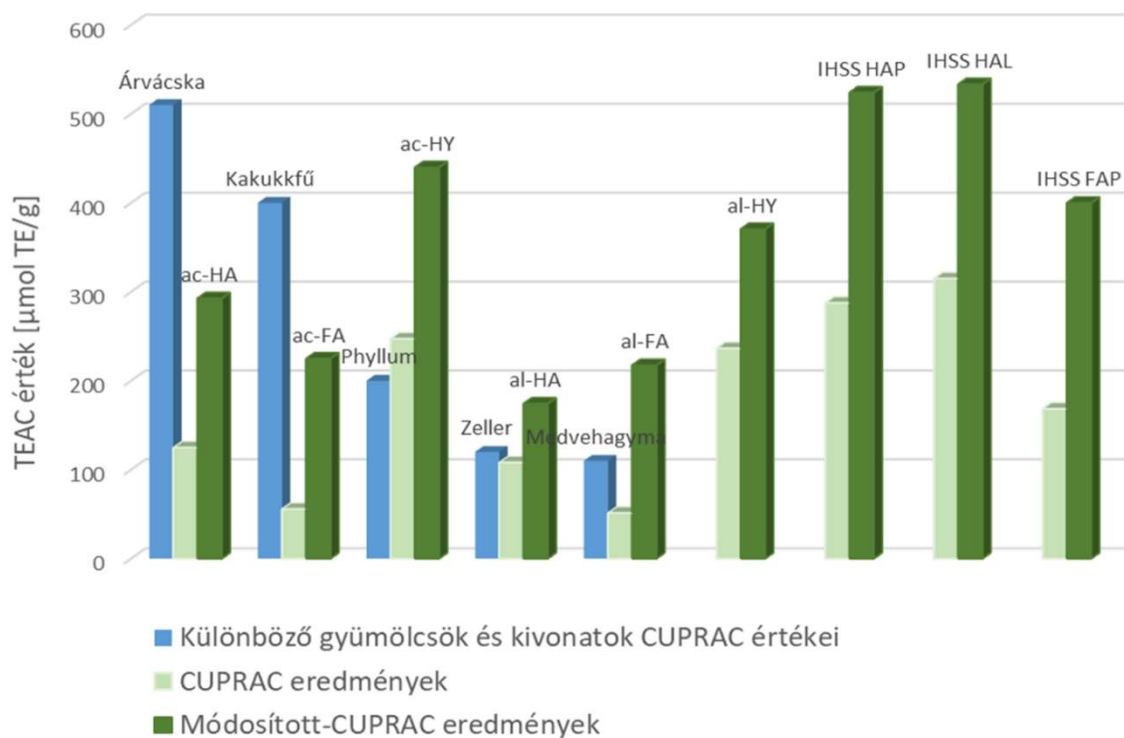
	<b>GAEAC [<math>\mu\text{mol/g}</math>]</b>	<b>Korrigált GAEAC [<math>\mu\text{mol/g}</math>]</b>	<b>A GAEAC értékek szórása</b>	<b>TEAC [<math>\mu\text{mol/g}</math>]</b>	<b>Korrigált TEAC [<math>\mu\text{mol/g}</math>]</b>	<b>A TEAC értékek szórása</b>
ac-HA	13,1	12,4	3,7	299,4	292,5	$\pm 5,4$
ac-FA	17,1	15,5	0,25	246,7	224,7	$\pm 2,9$
ac-HY	28,6	26,4	6,3	462,6	439,7	$\pm 4,3$
al-HA	12,7	11,8	2,5	183,6	174,1	$\pm 3,7$
al-FA	15,5	14,7	0,8	239,9	217,3	$\pm 1,1$
al-HY	26,6	26,1	4,8	401,3	370,4	$\pm 4,4$
IHSS HAP	39,7	38,1	1,2	555,4	523,9	$\pm 0,9$
IHSS HAL	41,5	41,2	0,6	541,2	533,2	$\pm 2,1$
IHSS FAP	28,8	27,7	0,8	406,3	399,8	$\pm 1,3$

A CUPRAC és a QUECHER-CUPRAC eredményeket összevethetjük a 15. táblázatban bemutatott irodalmi TEAC adatokkal. Az összehasonlításból azt a következtetést lehet levonni, hogy a mintáink a különböző növényi kivonatokhoz hasonlóan jó antioxidáns

hatással rendelkeznek. Az általam mért és az irodalmi hivatkozások TEAC értékeit oszlop diagrammon is ábrázoltam a 27. ábrán.

**15. táblázat:** Különböző gyümölcsök és kivonatok CUPRAC értékei a TEAC-ban kifejezve

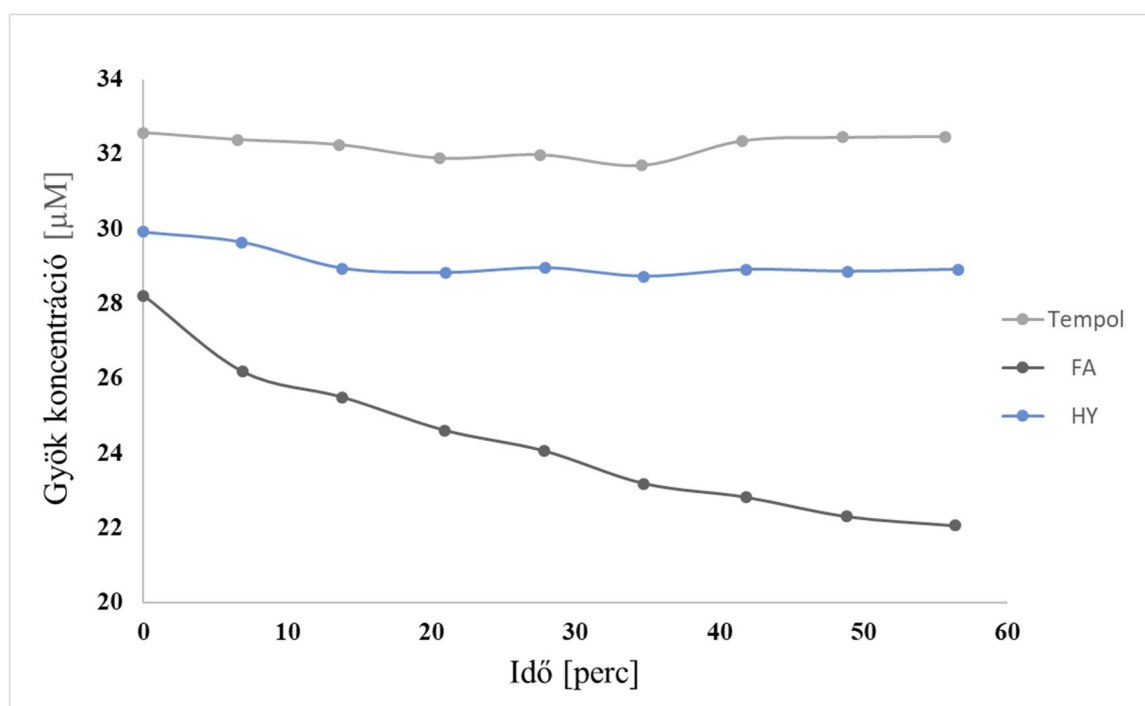
Gyümölcsök	TEAC érték ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	Referencia
Eper	26	[262]
Málna	18	
Szilva	18	
Narancs	8	
Spenót	7	
Brokkoli	6	
Hagyma	5	
<b>Növényi kivonatok</b>	-	[263]
Árvácska	510	
Kakukkfű	400	
Phyllum	200	
Zeller	120	
Medvehagyma	110	



**27. ábra:** A különböző HSs frakciók CUPRAC, módosított-CUPRAC, különböző gyümölcsök és kivonatok TEAC értékei

### 5.2.5 ESR mérések eredményei

A HSs minták antioxidáns aktivitását a Bruker Co.-nál automatizált microESR készüléken mérettük. A FA és a HY frakciók mutattak antioxidáns aktivitást az ESR mérések alapján (28. ábra). Az összes többi mintánál nem volt megfigyelhető az ESR-jel csökkenése. A 1 M-os NaOH hozzáadása a HA-mintákhoz problémás lehet, mivel előfordulhat, hogy a vizsgálat nem működik magasabb pH-értékeken. A szoftver automatikusan illeszkedik a kinetikus bomláshoz, és az FA és HY aktív minták antioxidáns kapacitásának kiszámítása elvégezhető. Különösen a Tempol belső referencia gyökkoncentrációja és a minták 60 perc utáni gyökkoncentrációja közötti különbséget számoltuk ki, az eredményeket a 16. táblázat tartalmazza.

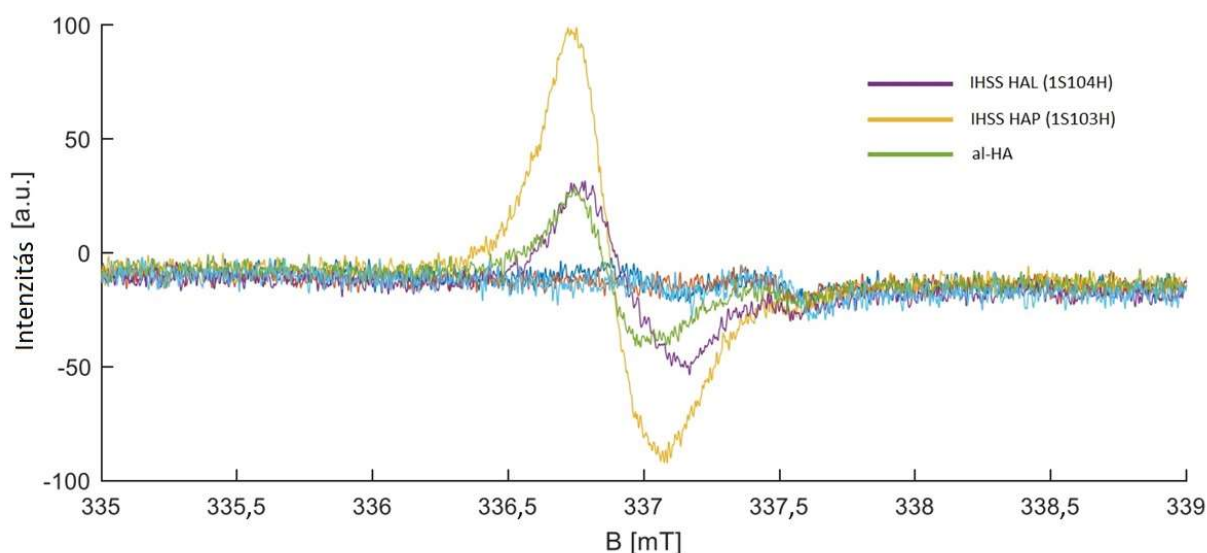


**28. ábra:** A gyökkoncentráció időbeli változása önmagában a Tempol önmagában és a Tempol FA és HY minták jelenlétében

**16. táblázat:** Különböző minták antioxidáns kapacitása microESR tesztek alapján

Minta	A minta koncentrációja [mg/ml]	Antioxidáns kapacitás [ $\mu$ M]
ac-FA	0,87	13,11
al-FA	0,66	7,38
IHSS FAP	0,27	6,13
ac-HY	0,39	4,49
al-HY	0,34	2,8

Néhány oldott mintát Bruker ESR5000 berendezésen mértek. Ez egy másik asztali rendszer, amely alacsonyabb koncentrációtartományban képes kimutatni a gyököket. A három HA minta, a tőzegtől és Leonarditból kivont két IHSS standard, olyan gyökjeleket mutat (29. ábra), amelyek szerves gyökökhöz rendelhetők [228, 264]. A gyökkoncentrációt a Spin Count segítségével számították ki, és az eredményeket a 17. táblázat mutatja be. Megjegyzendő, hogy a kapilláris üvegében lévő szennyeződések által okozott kis jel 337,5 mT-nál kissé torzítja az eredményt.



**29. ábra:** Az oldott HA minták ESR spektruma Bruker ESR5000 készüléken mérve

**17. táblázat:** A minták g-faktora és gyökkoncentrációja Bruker ESR5000 mérés alapján

Minta neve	g-faktor	Radical konc.
IHSS HAP (1S103H)	2,0038	$4,5 \times 10^{-11}$
IHSS HAL (1S104H)	2,0041	$10,2 \times 10^{-11}$
al-HA	2,0042	$3,9 \times 10^{-11}$

A 17. táblázatban szereplő minták g-faktor értéke egybevág az irodalmi adatokkal, *Witwicki* és munkatársai megállapították, hogy a HAs g-faktora 2,0035 körüli, ami összhangban van a szemikininon-típusú gyökök jelenlétével [230].

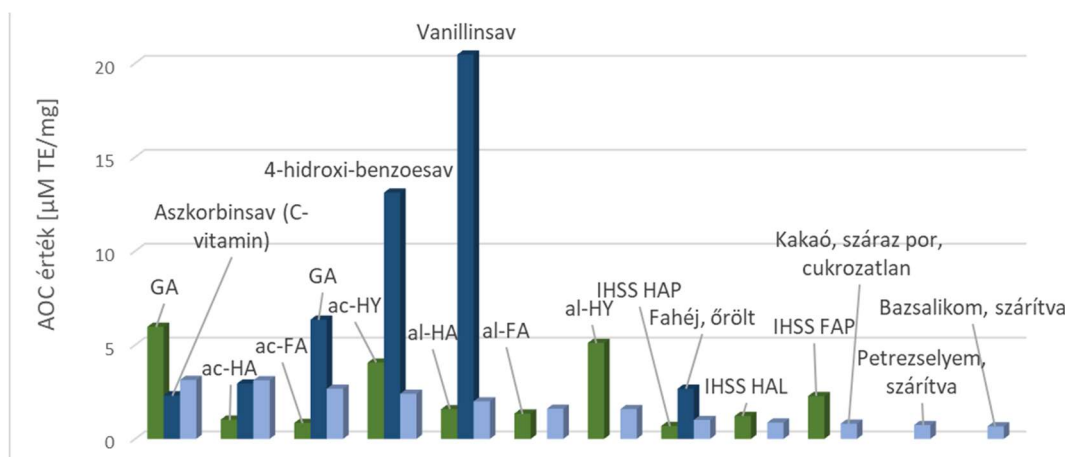
#### 5.2.6 ORAC mérés eredményei

A ORAC módszerrel mért eredményeket a 18. táblázat tartalmazza. Az AOC értékek kiszámításához használt AUC értékeket a F1 táblázat tartalmazza. A módszerrel sikerült a szakirodalmi adatokban fellelhető értékeket produkálni a kinyert frakcióinkra. Szakirodalmi adatokat *Klein* és munkatársai [219] tanulmányából vettem és szintén tartalmazza őket a 18. táblázat.

Az eredmények áttanulmányozása után elmondható, hogy a lúgos kinyerésű minták szignifikánsan nagyobb AOC értéket adtak, mint a savas feltárású minták mindegyik frakció esetén. A lúgos feltárású minták 25-55 %-kal adtak jobb eredményt a savas feltárású társaikhoz képest. Szintén elmondható, hogy az alapanyagként használt anyagnak is hatása van a AOC értékekre. Ha megfigyeljük a HAL és HAP minták eredményét, amiket azonos módon, de különböző kiindulási anyagból vontak ki, akkor láthatjuk, hogy a HAL minta (leonarditból kinyert huminsav) AOC értéke majdnem a duplája (77%) HAP minta AOC értékének (tőzegtől kivont huminsav). A saját kinyerésű HA minták AOC értékei közel azonosak a referencia mintákkal. A FA frakciók esetén azonban a referencia minta AOC értéke jóval magasabb a saját kinyerésű FA frakciónál.

Továbbá megfigyelhető a HY frakciók magas AOC értéke. Sajnos irodalmi adatot nem találtam, amivel összevethetnénk, így a meglévő adatokkal tudtam csak összevetni. Az összes frakció közül beleértve a referencia anyagokat is a HY mintáknak a legmagasabb az AOC értéke. A 18. táblázat tartalmazza a GA általam mért értékét és a szakirodalmi értékét is, azért, hogy bemutathassam, hogy a HY frakció értéke ehhez áll a legközelebb. Tehát az ORAC módszer szerint mindegyik mintának van antioxidáns kapacitása és közülük a HY frakció kiemelkedik.

A mért adatainkat más anyagokkal is összevettem, hogy el tudjam helyezni a már ismert anyagokhoz képest a mi adatainkat. Ezen más irodalmi értékeket a 19. táblázat tartalmazza. Ezekhez az értékekhez képest elmondható, hogy frakcióink igen magas antioxidáns kapacitással rendelkeznek. Az általam mért legkisebb AOC érték is nagyobb volt, mint a leggyengébb, bemutatott magas antioxidáns tartalmú élelmiszer. A HA frakciók közepén helyezkednének el a bemutatott irodalmi adatokhoz képest, kicsit jobb értékeket mutatnak a FA frakciók. Azonban a HY frakciók messze kiemelkednek a bemutatott értékekhez képest. Antioxidáns kapacitásuk meghaladja az aszkorbinsav és az E-vitamin értékét és mindegyik magas antioxidáns tartalmú élelmiszerét. Ezeket az eredményeket oszlop diagrammon is ábrázoltam a 30. ábrán.



**30. ábra:** A különböző HSs frakciók (zöld), különböző gyümölcsök és kivonatok (sötét és világos kék) ORAC eredményei AOC értékben megadva

**18. táblázat:** Az ORAC módszerrel mért minták eredményei AOC értékben kiszámítva

	AOC érték [µM TE/mg]	Irodalmi értékek más HSs frakciókra [µM TE/mg]
GA	5,97	6,35
ac-HA	1,03	0,3 - 2,07
ac-FA	0,85	1,08 - 2,56
ac-HY	4,06	-
al-HA	1,58	0,3 - 2,07
al-FA	1,35	1,08 - 2,56
al-HY	5,11	-
IHSS HAP	0,69	0,3 - 2,07
IHSS HAL	1,22	0,3 - 2,07
IHSS FAP	2,28	1,08 - 2,56

[219]



19. táblázat: Más vegyületek, gyümölcsök AOC értékei

Vegyületek	AOC érték [μM TE/mg]	
Aszkorbinsav (C-vitamin)	2,32	[219]
E-Vitamin	2,95	
Galluszsav	6,35	
4-hidroxi-benzoésav	13,11	
Vanillinsav	20,46	
Kumársav	30,58	
<b>Gyümölcsök</b>	-	[112]
Fahéj, őrölt	2,67	
Fekete arónia	0,16	
Kis vörös bab	0,14	
Vad áfonya	0,13	
Vörös vesebab	0,13	
Pinto bab	0,12	
Áfonya	0,09	
<b>A cikk szerint magas antioxidáns tartalmú élelmiszerek</b>	-	[112]
Szegfűszeg, őrölt	3,14	
Sumac, korpa, nyers	3,12	
Fahéj, őrölt	2,67	
Cirok, korpa	2,40	
Oregánó, szárítva	2,00	
Akácia bogyó, fagyasztva szárított	1,61	
Kurkuma, őrölt	1,59	
Cirok, korpa, fekete	1,01	
Sumac, gabona, nyers	0,87	
Kakaó, száraz por, cukrozatlan	0,81	
Köménymag	0,77	
Maqui bogyó, koncentrált por	0,75	
Petrezselyem, szárítva	0,74	
Cirok, korpa, vörös	0,71	
Bazsalikom, szárítva	0,67	

### 5.2.7 Sikertelen mérések

A mérések egy része sajnos nem hozott pozitív/értékelhető eredményt. Ennek ellenére fontosnak éreztem prezentálni, ezeket a nem sikeres próbálkozásokat, hiszen ezek tanulságosak és szélesebb ismereteket biztosítanak a HSs-ről. Három módszerrel nem sikerült igazolni a mintáim antioxidáns hatását, de ennek oka valószínűleg nem a hatás hiánya, hanem a módszerek valamilyen egyedi sajátos tulajdonságára vezethető vissza. Ezeket az eredményeket, egy fejezeten belül mutatom be.

#### 5.2.7.1 Elektrokémiai mérések eredményei

Sajnos az általunk alkalmazott módszerrel sem sikerült megmérnünk a mintáim antioxidáns tulajdonságait. Habár vannak olyan tudományos publikációk pl. [218], ahol sikeresen megmérték már a HSs frakciók antioxidáns hatását elektrokémiai a módszerrel. Azonban az ilyen tanulmányokban másfajta elektródot használtak. Az általunk alkalmazott elektród egy egyedi a Pécsi Tudomány Egyetem Kémiai Intézetében készített módosított felületű szén elektród volt [238]. A mérés feltételezésünk szerint azért nem sikerült, mert a GA és a HSs frakcióink egyaránt reakcióba léptek az elektróda oxidált formájával. Tehát redukálták az elektróda felszínét, így egy passzív nem reakcióképes felületet létrehozva, amely gátolta a további érdembeli méréseket.

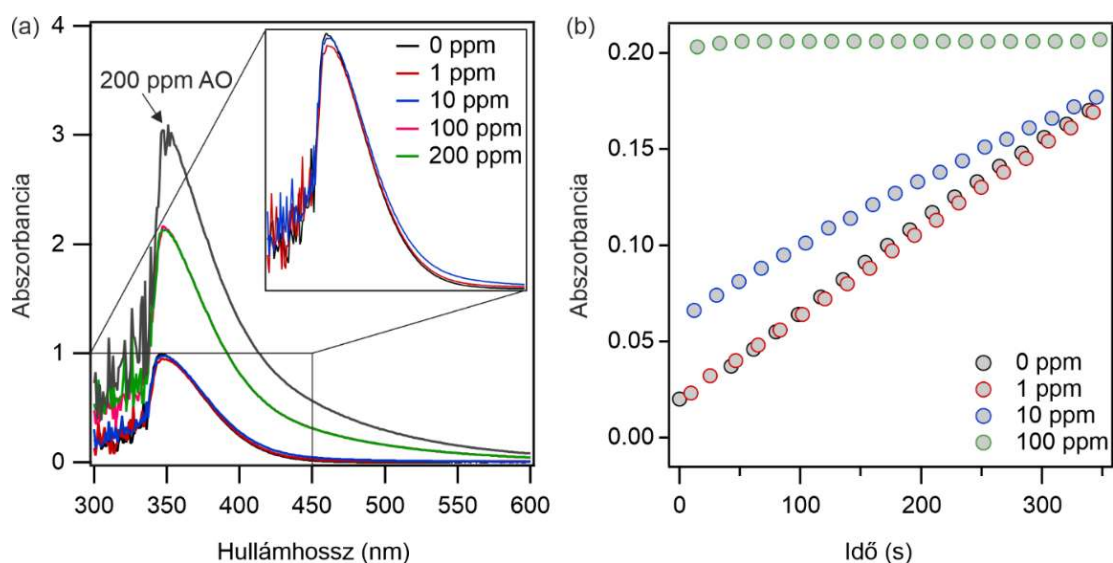
#### 5.2.7.2 FRAP mérés eredményei

Ezzel a módszer sajnos nem tudtam kimutatni a mintáink antioxidáns hatását. Ennek oka a HSs egy másik tulajdonságával lehet magyarázni. A HSs-ok nagyon jó komplexképzők és a fémeket egy bizonyos kötési sorrend szerint kötik meg [265]. Némely fémeket gyengébben némelyiket pedig erősebben. Ebben az esetben mivel a módszer Fe ionokat tartalmaz a mintáink pedig főként Ca/Mg/Na-ot, ezért ezeket az ionokat a HSs frakcióink szívesen lecserélik a Fe ionokra. Ebből kifolyólag a reakció nem játszódik le és az általam alkalmazott FRAP módszerrel nem tudtam megmérni a minták antioxidáns kapacitását.

A mérés során ennek kiküszöbölése érdekében itt is mint a többi módszernél is hígítási sorral is próbáltam megmérni, kiküszöbölni ezt a hibát. Sajnos ez sem hozott eredményt abban a koncentráció intervallumban, melyben dolgoztam.

### 5.2.7.3 Enzimes antioxidáns aktivitás módszer eredményei

A mintákat 1-200 ppm koncentrációtartományban vizsgálták. Mindkét tesztreakció során az oldatok saját színe jelentős mértékben befolyásolta a méréseket (31. ábra). A minták kis koncentráció esetén nem mutattak aktivitást, a koncentráció növelésével pedig a minták saját színe olyan nagy mértékben befolyásolta a méréseket, hogy érdemleges következtetéseket nem tudunk levonni belőle. Így ezen mérések alapján nem jelenthető ki, hogy a minták kataláz vagy szuperoxid-dizmutáz aktivitással bírnának.



**31. ábra:** Az IHSS FAP (2S103F) mintára mért kataláz teszt (a) és SOD teszt (b) eredményei

A 31. ábrán (a) jól látható, hogy kis koncentrációknál (1 ppm és 10 ppm) nem volt jelentős változás az antioxidáns nem tartalmazó minta spektrumához képest, míg magasabb koncentrációknál az abszorbanciában történő csökkenés helyett jelentős mértékben nőttek az abszorbancia értékek. Ez a változás a minta erős barnás színének tulajdonítható. A SOD teszt esetén (31. ábra (b)) hasonló jelenséget figyelhetünk meg. A pontokra illesztett görbék meredekségének csökkenése helyett, kis koncentrációknál nincs változás a kontroll (enzimet nem tartalmazó) mintához képest. 10 ppm esetén minimális csökkenés következett be a meredekségben, míg 100 ppm esetén állandó értékre állt be, azonban ezen esetekben már a mérés kezdetkor (0 s) is magasabb abszorbancia értékek voltak mérhetőek, ami a már korábban említett jelenségnek tulajdonítható. Mivel az abszorbancia értékeket jelentős mértékben befolyásolja az oldatok saját színe, így ezekből releváns következtetéseket nem vonhatunk le.

## 6. ÉRTÉKELÉS, ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarország és az egész Kárpát-medence szerencsés földrajzi szempontból, mert sokféle ásványkincsben bővelkedik. Köztük nagy szén vagyonnal és sok tőzeggel rendelkezik. Mindezek közül a legspeciálisabb anyag a Dudaron fellelhető Leonardit (dudarit). Munkám során fontosnak tartottam, hogy olyan kiindulási alapanyagból kezdjem meg a frakciók kinyerését, amely hazánkban elérhető. Éppen ezért ezt a hazai leonarditot, dudaritot használtam és nyertem ki belőle a HS frakciókat. A munka célja az volt, hogy bebizonyítsam, vajon a HSs frakcióknak van-e valamilyen antioxidáns hatása. Emellett fontosnak tartottam olyan két különböző feltárási eljárást használni, amik ipari szempontból megvalósíthatóak oly módon, hogy követhető legyen, hogy a különböző feltárási eljárások milyen hatással lehetnek a frakciók antioxidáns tulajdonságaira. Referencia anyagként a Nemzetközi Humuszanyag Társaság (IHSS) HA és FA frakcióit használtam. A saját kinyerésű mintákat fizikai-kémiai elemzésnek vettem alá, hogy megbizonyosodjak róla, hogy az előállított HA, FA és HY frakciók ténylegesen megfelelnek a szakirodalomban támasztott elvárásoknak.

Az elem analízis során nyert C/H/N/O/S értékekből a frakciókra számolt jellemző H/C vs. O/C adatokat összevettem a van Krevelen [190] diagramban fellelhető több száz hasonló mérés eredményeivel. Potenciometriás sav-bázis titrálás igazolta, hogy a savas (karboxil és fenolos hidroxil) funkciós csoportok mennyisége a mintáimban a FA, HA és HY frakciókra jellemző intervallumba esik. Spektrális vizsgálatokkal, (UV-Vis és a FT-IR spektroszkópia) meghatároztam egyrészt a HSs jellemzésére használt spektrális indexeket (E4/E6, E2/E3, URI arányok), a jellemző funkciós csoportjaikat és a kapott eredményeket összevettem a referencia minták értékeivel. Így igazolva, hogy a megfelelő frakciókat sikerült elválasztanom. Az FT-IR mérések segítségével sikerült meghatározni, hogy a két különböző kinyerési eljárás, hogyan befolyásolja az antioxidáns hatásáért felelős a funkciós csoportokat, tehát, hogy a kinyeréseknek milyen hatása van a frakciók antioxidáns potenciáljára. Másrészt az UV-Vis spektroszkópiával sikerült meghatározni az egyes frakciók saját fényelnyelését a használt antioxidáns tesztek mérési tartományában. Az elemanalitikai és a spektrális eredmények alapján megállapítható, hogy az általam kinyert HSs frakciók megfelelnek a szakirodalmi értékeknek, valamint a referencia mintákkal összehasonlítva is hasonlóságokat mutattak.

Miután meggyőződtem arról, hogy a mindkét kinyerési eljárás során valóban megfelelő frakciókat választottam el, megkezdtem az antioxidáns vizsgálatokat. Különböző antioxidáns hatást mérő módszerekkel vizsgáltam a saját és a referencia mintákat. Voltak olyan eljárások,

amikkel nem sikerült eredményt elérni, de az általam elvégzett tesztek többsége pozitív eredménnyel zárult. Több eljárást is alkalmaztam, azért, hogy szélesebb körben tudjam vizsgálni a mintáink antioxidáns tulajdonságát. Mivel mindegyik módszer más hatásmechanizmuson alapszik és más teszt vegyületet használ, ezért a kapott eredmények hatásban eltértek egymástól. A több fajta módszer használatának az előnye, hogy átfogó képet adnak a frakciók antioxidáns hatásáról. Minden általam elvégzett vizsgálat *in vitro* teszt volt (*in vivo* módszerek alkalmazására nem volt lehetőségünk).

Az első alkalmazott módszer az összes fenolos csoport meghatározására szolgált (TPC módszer), igaz ez a módszer nem közvetlenül az antioxidáns hatást vizsgálja, de eredményeiből következtetni lehet arra, hogy a vizsgált anyagok rendelkeznek-e antioxidáns tulajdonságokkal. Az eredmények azt mutatják, hogy a HA minták tartalmazzák a legtöbb fenolos csoportot a különböző frakciók közül. Ha rangsoroljuk a fenolos tartalmuk szerint a mintákat, akkor a HS frakciók állnának első helyen, a HY frakciók középen, a FA pedig a legalacsonyabb fenolcsoport-tartalommal rendelkeznek. Ez korrelál a UV-Vis eredményekkel és a frakciók spektrális indexeiből becsült relatív molekula méretével is. Az eredményekből látható, hogy a körültekintően tisztított IHSS referencia minták jobb eredményeket mutattak. Az eredményeim alapján elmondható, hogy az extrakciós módszer és a végső tisztaság is nagyon fontos a TPC-tartalom szempontjából, függetlenül az alapanyagtól.

A következő módszer, amivel vizsgáltam a mintáimat a DPPH módszer volt. A saját eredményeimet összevettem több szakirodalomban fellelhető egyéb anyag IC<sub>50</sub> értékével. Mivel viszonylag új anyagokról beszélünk fontosnak érzem, hogy ne csak számértékeket közöljek róluk, hanem el tudjam helyezni ezen értékeket a már jól ismert antioxidánsokhoz vagy élelmiszerekhez képest. Érzékeltetve, hogy a HS frakcióknak mekkora jelentőségük lehet, mint antioxidáns hatóanyagok. Az eredményekből láthatjuk, hogy mindegyik frakciónak gyökfogó hatása van, de a leghatékonyabbak a referencia minták, azon belül is az IHSS HA frakciók. A saját kinyerésű minták közül a HY-frakciók rendelkeznek a legerősebb gyökfogó kapacitással, ezt szorosan követik a HA-frakciók, majd az FA-frakciók. Általánosságban elmondható, hogy a lúgos extrahálású minták nagyobb antioxidáns hatást mutatnak, mint a savas extrakciós frakciók.

A következő mérési módszerek, amikkel vizsgáltam a CUPRAC és a módosított CUPRAC módszer volt. Ezek a módszerek már közvetlenül antioxidáns hatást vizsgálnak. A módosított CUPRAC módszert pedig kifejezetten azért választottam ki, mert azt úgy módosították, hogy optimálisan lehessen vele HSs-ok antioxidáns hatását mérni. A mért adatoknál itt is alkalmaztam a korrekciót és az eredményeimet összevettem más anyagok

szakirodalmi értékeivel. A CUPRAC vizsgálatok alapján elmondható, hogy mindegyik frakciónak van antioxidáns hatása. A legjobb értékek szintén az IHSS mintákhoz tartoznak. A saját kinyerésű frakciókat tekintve a HY frakciók rendelkeznek a legmagasabb GAEAC és TEAC értékkel, ezt követik a HA-frakciók, végül a FA-frakciók. A módosított CUPRAC eredmények azt mutatják, hogy ezek a kapacitásértékek magasabbak, mint a CUPRAC módszernél. Az eltérés fő oka az lehet, hogy ez a módszer a minták szilárd formáját használja, amelyek az eljárás során feloldódnak. Így több funkciós csoport vehet részt a reakcióban, mint a CUPRAC-módszerben. Az eredmények és a rangsoruk megegyezik a CUPRAC módszer esetén kapottakkal. Itt is elmondható, hogy az extrakciós módszer és a végső tisztaság nagyon fontos az antioxidáns hatás szempontjából, alapanyagtól függetlenül.

A következő módszer az ORAC módszer volt, amivel vizsgáltam. Ez egy más fajta, a hidrogén atom transzfer mechanizmuson (HAT) alapuló antioxidáns kapacitást mérő módszer. Információt ad a mért anyagok antioxidáns kapacitásáról. Az eredmények értékelése után elmondható, hogy a lúgos kinyerésű minták szignifikánsan nagyobb AOC értéket adtak, mint a savas feltárású minták mindegyik frakció esetén. A saját kinyerésű HA minták AOC értékei közel azonosak a referencia mintákkal. A FA frakciók esetén azonban a referencia minta AOC értéke jóval magasabb a saját kinyerésű FA frakciónál. Az összes frakció közül beleértve a referencia mintákat is a HY mintáknak a legmagasabb az AOC értéke, ami hatalmas meglepetés volt számomra. További nővumként emelném ki, hogy sikeresen megmértem a HY frakció AOC értékeit. Míg a HA és a FA frakciókra találtam szakirodalmi értékeket az AOC értékekre, addig a HY frakcióra semmilyen adatot nem találtam. Meg kell jegyezni, hogy a HY kevéssé vizsgált HS frakció, antioxidáns potenciáljukat igaz DPPH módszerrel már tesztelték, de nem közöltek összehasonlításra alkalmas adatokat.

A mintáimat megmértem egy speciális ESR mérő módszerrel is. Ezt az antioxidáns hatás mérésére fejlesztett ESR módszert eddig sikeresen alkalmazták különféle élelmiszerek antioxidáns kapacitásának meghatározására. Az ESR módszer eredményei alátámasztották a tesztelt frakciók antioxidáns potenciálját.

Ahogy említettem voltak olyan módszerek, amikkel nem sikerültek az antioxidáns hatást igazolnom. Ilyen volt például a FRAP módszer. Ennek okát a HSs komplexképző tulajdonságával lehet magyarázni, mivel a módszer Fe ionokat tartalmaz, a mintáink pedig főként Ca/Mg/Na-ot, ezért ezeket az ionokat a HSs frakcióink szívesen lecserélik a Fe ionokra. Ebből kifolyólag a reakció nem játszódik le és a FRAP módszerrel nem tudtam megmérni a minták antioxidáns kapacitását. Továbbá próbáltam még elektrokémiai módszerrel is bizonyítani a minták antioxidáns hatását. Feltételezésünk szerint azért nem volt sikeres ez a

mérés, mert minták redukálták az elektród felületén található módosított réteget. A disszertáció befejezéséig viszont nem sikerült olyan elektródot fejleszteni, amivel sikeresen meg lehetne mérni a mintáinkat. Enzimatis méréssel is próbálkoztunk, de a minták kis koncentráció esetén nem mutattak aktivitást, a koncentráció növelésével pedig a minták saját színe olyan nagy mértékben befolyásolta a méréseket, hogy érdemes következtetéseket nem tudunk levonni belőle

Az általam kiválasztott módszerek többségével sikerült igazolnom, hogy az általam kinyert frakcióknak van valamilyen antioxidáns tulajdonsága, legyen szó akár antioxidáns kapacitásról, antioxidáns hatásról vagy gyökfogó képességről. Némelyik módszerrel kiemelkedő, némelyik módszerrel pedig gyenge hatást sikerült bizonyítani.

A fenti eredmények alapján elmondható, hogy a feltételezésünk, miszerint az extrakciós módszer nemcsak a frakciók fizikai-kémiai tulajdonságait, hanem a szabad gyökfogó képességét is befolyásolja, beigazolódott. Az is elmondható az eredmények alapján, hogy az alapanyagként használt leonardit vagy tőzeg nem befolyásolja olyan nagy mértékben az eredményeket, mint a kivonási módszer.

Általánosságban elmondható, hogy a savas kinyerésű minták antioxidáns potenciálja jobb, mint a lúgos kinyerésűeké. A legtöbb mérés esetében a saját kinyerésű frakciók antioxidáns hatása elmaradt a referencia mintákhoz viszonyítva (kivéve az ORAC és ESR méréseket), ennek oka valószínűleg az, hogy az IHSS-minták sokkal több extrakciós, elválasztási és tisztítási lépésen esnek át a kinyerésük során, ezáltal a saját kinyerésű mintáknál sokkal tisztábbak. A frakciókat, ha egymáshoz képest szeretnénk elhelyezni antioxidáns hatásban, akkor elmondható, hogy a legtöbb módszer esetében a HY frakciók adták a legjobb eredményeket, utána következtek a HA frakciók és végül a FA frakciók (ezeket az eredményeket az F2. táblázatban foglaltam össze). Ez két módszer esetében alakult másként. A TPC módszernél a HA frakciók teljesítettek a legjobban, majd a HY és FA frakciók követték. Az ESR méréseknél a FA frakciók bizonyultak a legjobbnak, amiket a HY frakciók követték. Mindenképp újdonság és egyben nagy meglepetés volt HY frakció vizsgálata, hisz ezen frakciónak volt a saját kinyerésű minták közül a legjobb antioxidáns hatása. Eredményei néha megközelítették és egy esetben meg is haladták a referencia minták antioxidáns hatását.

## SUMMARY

Hungary and the entire Pannonian Basin are geographically fortunate due to their abundance of diverse mineral resources, including significant coal and peat deposits. Among these, the most unique material is Leonardite (dudarite), found in Dudar. In my research, I considered it essential to begin the extraction of fractions from a starting material that is readily available in Hungary. Therefore, I used this domestic Leonardite, or dudarite, to extract humic substance (HS) fractions. The primary goal of this work was to determine whether these HS fractions possess any antioxidant properties. Additionally, I found it important to use two different extraction methods that are industrially feasible to observe how various extraction methods may influence the antioxidant properties of the fractions. As reference materials, I used the humic acid (HA) and fulvic acid (FA) fractions provided by the International Humic Substances Society (IHSS).

The self-extracted samples underwent physicochemical analysis to ensure that the HA, FA, and HY fractions produced were consistent with the expectations outlined in the literature. I compared the characteristic H/C versus O/C data, calculated from the elemental analysis (C/H/N/O/S) of the fractions, with the results of hundreds of similar measurements documented in the van Krevelen diagram. Potentiometric acid-base titration confirmed that the quantity of acidic functional groups (carboxyl and phenolic hydroxyl) in my samples fell within the range typical for FA, HA, and HY fractions. Through spectral analyses, including UV-Vis and FT-IR spectroscopy, I determined the spectral indices (E4/E6, E2/E3, URI ratios) used to characterize HSs, and identified their characteristic functional groups. The obtained results were compared with the values of reference samples, thus confirming that the correct fractions had been successfully separated. FT-IR measurements allowed me to determine how the two different extraction procedures influenced the functional groups responsible for the antioxidant effect, thereby revealing the impact of extraction methods on the antioxidant potential of the fractions. Additionally, UV-Vis spectroscopy was employed to determine the inherent light absorption of each fraction within the measurement range of the applied antioxidant tests. Based on the elemental and spectral analysis results, it can be concluded that the extracted HS fractions are consistent with literature values and exhibit similarities when compared to reference samples.

After confirming that the appropriate fractions were successfully separated using both extraction methods, I proceeded with antioxidant assays. Various antioxidant measurement methods were applied to both my own samples and reference samples. While some methods



did not yield results, the majority of the tests conducted resulted in positive findings. Multiple methods were employed to provide a comprehensive examination of the antioxidant properties of the samples. Given that each method is based on a different mechanism of action and utilizes different test compounds, the results obtained varied in their effects. The advantage of using multiple methods is that they provide a holistic view of the antioxidant activity of the fractions. All tests conducted were *in vitro* (*in vivo* methods were not feasible).

The first method used was the Total Phenolic Content (TPC) method, which does not directly measure antioxidant activity, but allows for inferences about whether the tested substances have antioxidant properties. The results indicate that HA samples contain the highest number of phenolic groups among the different fractions. Ranking the samples by phenolic content places the HS fractions first, HY fractions in the middle, and FA fractions with the lowest phenolic group content. This correlates with the UV-Vis results and the relative molecular sizes of the fractions, as estimated from their spectral indices. The results show that the carefully purified IHSS reference samples produced better outcomes. Based on my findings, it can be stated that the extraction method and final purity are critical for TPC content, regardless of the raw material used.

The next method applied was the DPPH assay, where I compared my results with IC50 values of other substances reported in the literature. Given that these are relatively new substances, I believe it is important not only to report numerical values but also to contextualize these values in relation to well-known antioxidants or foods, to indicate the potential significance of HS fractions as antioxidant agents. The results show that all fractions exhibit radical scavenging activity, with the reference samples, particularly the IHSS HA fractions, being the most effective. Among the self-extracted samples, HY fractions possess the strongest radical scavenging capacity, followed closely by HA fractions and then FA fractions. Generally, fractions extracted using alkaline methods exhibit greater antioxidant activity than those extracted using acidic methods.

The following methods used were the CUPRAC and modified CUPRAC assays, which directly measure antioxidant effects. I specifically chose the modified CUPRAC method because it was optimized for measuring the antioxidant effects of HSs. I applied corrections to the measured data and compared my results with literature values for other substances. The CUPRAC tests confirmed that all fractions have antioxidant activity, with the highest values observed in the IHSS samples. Among the self-extracted fractions, HY fractions had the highest GAEAC and TEAC values, followed by HA and FA fractions. The modified CUPRAC results indicated that these capacity values were higher than those obtained with the standard CUPRAC

method. The main reason for this discrepancy is likely that the modified method uses the solid form of the samples, which dissolve during the procedure, allowing more functional groups to participate in the reaction compared to the standard CUPRAC method. The results and their rankings were consistent with those obtained using the CUPRAC method. Once again, it can be concluded that the extraction method and final purity play a critical role in antioxidant activity, regardless of the raw material used.

The next method I applied was the ORAC assay, which measures antioxidant capacity based on a different mechanism, the hydrogen atom transfer (HAT) mechanism. This method provides information about the antioxidant capacity of the tested substances. After evaluating the results, it can be concluded that the alkaline-extracted samples exhibited significantly higher AOC values than the acid-extracted samples across all fractions. The AOC values of the self-extracted HA samples were nearly identical to those of the reference samples. However, for the FA fractions, the AOC of the reference sample was significantly higher than that of the self-extracted FA fractions. Among all fractions, including the reference samples, the HY samples had the highest AOC values, which was a significant and unexpected finding. Additionally, I successfully measured the AOC values of the HY fractions, a notable achievement as there is limited data available for HY fractions in the literature. While literature values exist for the AOC of HA and FA fractions, I could not find any data for HY fractions.

I also measured my samples using a specialized ESR (electron spin resonance) method. This ESR method, developed for measuring antioxidant activity, has been successfully applied to determine the antioxidant capacity of various foods, and I was able to demonstrate its effectiveness on my samples. The ESR method results supported the antioxidant potential of the tested fractions.

As mentioned earlier, there were methods that did not successfully verify the antioxidant effect of the samples. For example, the FRAP method did not yield results, likely due to the complexing property of HSs, as the method involves Fe ions, and our samples primarily contain Ca/Mg/Na ions, which readily replace Fe ions in the HS fractions, preventing the reaction from occurring. Consequently, I could not measure the antioxidant capacity of the samples using the FRAP method. Additionally, I attempted to demonstrate the antioxidant activity of the samples using electrochemical methods. It is assumed that this measurement was unsuccessful because the samples reduced the modified layer on the electrode surface. However, until the completion of this dissertation, we were unable to develop an electrode capable of successfully measuring our samples. Enzymatic assays were also attempted, but the samples showed no activity at low

concentrations, and as the concentration increased, the intrinsic color of the samples interfered with the measurements to such an extent that no meaningful conclusions could be drawn.

With most of the methods I applied, I was able to demonstrate that the fractions I extracted possess some level of antioxidant properties, whether in terms of antioxidant capacity, antioxidant activity, or radical scavenging capacity. Some methods demonstrated outstanding effects, while others showed weaker effects.

Based on the above results, it can be concluded that our hypothesis that the extraction method affects not only the physicochemical properties of the fractions but also their free radical scavenging capacity has been confirmed. It can also be concluded from the results that the raw material used, whether Leonardite or peat, does not influence the results as significantly as the extraction method.

In general, it can be stated that the acid-extracted samples exhibited better antioxidant potential than the alkaline-extracted ones. In most measurements, the antioxidant effect of the self-extracted fractions was lower compared to the reference samples (except for the ORAC and ESR measurements), likely due to the fact that the IHSS samples undergo many more extraction, separation, and purification steps, making them much purer than the self-extracted samples. When comparing the fractions in terms of antioxidant activity, it can be said that for most methods, the HY fractions produced the best results, followed by the HA fractions, and finally the FA fractions (these results are summarized in Table F2). This ranking differed in two methods: in the TPC method, HA fractions performed best, followed by HY and FA fractions, while in the ESR measurements, FA fractions were the most effective, followed by HY fractions. The HY fraction was both a novelty and a significant surprise, as it exhibited the best antioxidant activity among the self-extracted samples, with its results sometimes approaching and in one case exceeding the antioxidant activity of the reference samples.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Tombáczi Etelka egyetemi tanárnak, aki szakmai és személyes támogatásával mindvégig segített. Szeretném megköszönni neki a rengeteg tanítást, türelmet, iránymutatást és támogatását. Lehetővé tette számomra hazai és nemzetközi konferenciákon való részvételt, ezáltal segítve szakmai tapasztalatok megszerzését és életre szóló élmények megélését.

Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik doktori értekezésem elkészítéséhez kapcsolódó munkámban segítettek. Szeretnék köszönetet mondani a Szegedi Tudomány Egyetem Mérnöki Karának Élelmiszermérnöki Intézetének, hogy lehetővé tették a méréseket laboratóriumukban. Szeretnék köszönetet mondani Fehér Anikónak az Élelmiszermérnöki Intézetének munkatársának, aki segített a mérések során. Továbbá az MTA-SZTE "Lendület" Biokolloid Kutató csoportnak az enzimikus mérések elvégzéséért, valamint az SZTE Környezet-biológia és Környezeti Nevelés Tanszéknek a fehérvérsejtes vizsgálatok lebonyolításáért. Nem utolsósorban a Pécsi Tudomány Egyetem Természet Tudományi Karának Kémia Intézetének, hogy lehetővé tették az elektrokémiai méréseket.

Köszönetet szeretnék mondani Alessandro Piccolo professzor úrnak, hogy az elem analíziseket és az FT-IR méréseket a Nápolyi Federico II. Egyetemén elvégezhettem.

Köszönetet szeretnék mondani édesapámnak Dr. Csicsor Jánosnak, egyben a Hymato Products Kft ügyvezetőjének, hogy a Covid alatti bezárásokban és utána is rendelkezésemre bocsájtotta a cég laboratóriumát és berendezéseit, ahol az antioxidáns mérések nagy része történt.

Leírhatatlanul hálás vagyok a Családomnak és szeretteimnek, a sok biztatásért, lelkesítésért, türelemért és áldozatért, amit tőlük kaptam. Köszönöm, hogy itt tarthatok az utamon, mindent köszönök! Köszönöm feleségemnek Csicsor-Kulcsár Petrának, hogy végig mellettem állt és támogatott a munkám során.

## Irodalomjegyzék

[1] GÓDOR, A. K. The Major Trends of Food Consumption in Hungary. *Deturope*, 8, 3, 202-211, **2016**.

DOI: 10.32725/det.2016.031

[2] BALOGH E., HEGEDUS A. and STEFANOVITS-BANYAI E. Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Sci. Hortic.*, 125, 3, 332-336, **2010**.

DOI: 10.1016/j.scienta.2010.04.015

[3] VATTEM, D. A. and SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochem.*, 39, 3, 367-379, **2003**.

DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00089-X

[4] OLAS B. Berry Phenolic Antioxidants – Implications for Human Health? *Front Pharmacol.*, 9, 78, **2018**.

DOI: 10.3389/fphar.2018.00078

[5] ARUOMA O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res.*, 523-524, 9-20, **2003**.

DOI: 10.1016/s0027-5107(02)00317-2

[6] BAGCHI K. and PURI S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East. Mediterr. Health J.*, 4, 2, 350-60, **1998**.

[7] LOBO V., PATIL A., PHATAK A. and CHANDRA N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev.*, 4, 8, 118-26, **2010**.

DOI: 10.4103/0973-7847.70902

[8] CHEESEMAN K. H. and SLATER T. F. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49, 3, 481-93, **1993**.

DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625

[9] LIPINSKI B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2011, 809696, **2011**.

DOI: 10.1155/2011/809696

[10] VARELA C. D. and FARHANA A. Biochemistry, Superoxides. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; **2023**.

[11] REES M. D., HAWKINS C. L. and DAVIES M. J. Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *Biochem. J.* 1, 381, 175-184, **2004**.

DOI: 10.1042/BJ20040148

[12] CASAS A. I., DAO V. T., DAIBER A., MAGHZAL G. J., DI LISA F., KALUDERCIC N., LEACH S., CUADRADO A., JAQUET V., SEREDENINA T., KRAUSE K. H. , LÓPEZ M. G., STOCKER R., GHEZZI P. AND SCHMIDT H. H. Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid. Redox Signal.*, 10, 23, 1171-1185, **2015**.

DOI: 10.1089/ars.2015.6433

[13] YOUNG I. S. and WOODSIDE J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, 54, 3, 176-186, **2001**.

DOI: 10.1136/jcp.54.3.176

[14] BHATTACHARYYA A., CHATTOPADHYAY R., MITRA S. and CROWE S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.*, 94, 2, 329-354, **2014**.

DOI: 10.1152/physrev.00040.2012

[15] SCHUERMAN D. and MEVISSSEN M. Manmade Electromagnetic Fields and Oxidative Stress-Biological Effects and Consequences for Health. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 7, 3772, **2021**.

DOI: 10.3390/ijms22073772

[16] JIANG S., LIU H. and LI C. Dietary Regulation of Oxidative Stress in Chronic Metabolic Diseases. *Foods*, 10, 8, 1854, **2021**.

DOI: 10.3390/foods10081854

[17] EBADI M. Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. Arizona: Prominent Press, **2001**.

[18] PHANIENDRA A., JESTADI D. B. and PERIYASAMY L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.*, 30, 1, 11-26, **2015**.

DOI: 10.1007/s12291-014-0446-0

[19] MARTÍNEZ M. C. and ANDRIANTSITOHAINA R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 11, 3, 669-702, **2009**.

DOI: 10.1089/ars.2007.1993

- [20] SEDIGHEH A., RAHELEH K., PARDIS M. P., FATEMEH H., SHAYAN M., MOHAMMAD H. F., SAJJAD M. and INA Y. A. Is Consumption of Pomegranate Supplementation Effective on Oxidative Stress Biomarkers Including MDA, ox-LDL, POX 1, GPX, TAC, and TBRAS? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Curr. Probl. Cardiol.*, 48, 8, 101198, **2023**.  
DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2022.101198
- [21] ALHASAWI A., LEGENDRE F., JAGADEESAN S. and APPANNA V. Chapter 10 - Biochemical Strategies to Counter Nitrosative Stress: Nanofactories for Value-Added Products. In: *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Editor(s): Das S. and Dash H. R., Academic Press, Cambridge, 153-169, **2019**.  
DOI: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00010-1
- [22] KANABUR P. and RAMASAMY R. Nutraceutical Therapy in Male Infertility. In: *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Editor(s): Skinner, M. K., Academic Press, Cambridge, 333-339, **2018**.  
DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64787-6
- [23] LIU T., STERN A. and ROBERTS L. J. The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J. Biomed. Sci.*, 6, 4, 226-35, **1999**.  
DOI: 10.1007/BF02253564
- [24] HARPER E. What Are Free Radicals, Anyway? *Solésence*, 2024.02.25.  
<https://solesence.com/what-are-free-radicals-anyway/> (Hozzáféres dátuma: 2024.02.26.)
- [25] ROCK C. L., JACOB R. A. and BOWEN P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, Vitamin E and the carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc.*, 96, 7, 703-704, **1996**.  
DOI: 10.1016/S0002-8223(96)00190-3
- [26] MCCORD J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108, 8, 652-659, **2000**.  
DOI: 10.1016/s0002-9343(00)00412-5
- [27] RAO A. L., BHARANI M. and PALLAVI V. Role of antioxidants and free radicals in health and disease. *Adv. Pharmacol. Toxicol.*, 7, 3, 29-38, **2017**.  
DOI: 10.59566/IJBS.2008.4089
- [28] BRIEGER K., SCHIAVONE S., MILLER F. J. JR. and KRAUSE K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.*, 142, 3334, 13659, **2012**.  
DOI: 10.4414/smw.2012.13659

[29] DIANO S., LIU Z. W., JEONG J. K., DIETRICH M. O., RUAN H. B., KIM E., SUYAMA S., KELLY K., GYENGESI E., ARBISER J. L., BELSHAM D. D., SARRUF D. A., SCHWARTZ M. W., BENNETT A. M., SHANABROUGH M., MOBBS C. V., YANG X., GAO X. B. AND HORVATH T. L. Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med.*, 17, 9, 1121-1127, **2011**.

DOI: 10.1038/nm.2421

[30] STEFANIS L., BURKE R. E. and GREENE L. A. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, 10, 4, 299-305, **1997**.

DOI: 10.1097/00019052-199708000-00004

[31] LOVELL M. A., EHMANN W. D., BUFFER B. M. and MARKESBERRY W. R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurol.*, 45, 8, 1594-1601, **1995**.

DOI: 10.1212/wnl.45.8.1594

[32] ESTERBAUER H., PUBI H. and DIEBER-ROTHENDER M. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.*, 23, 5, 573-581, **1991**.

DOI: 10.3109/07853899109150520

[33] BIN P., HUANG R. and ZHOU X. Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine. *Biomed. Res. Int.*, 2017, 9584932, **2017**.

DOI: 10.1155/2017/9584932.

[34] KEHM R., BALDENSPERGER T., RAUPBACH J. and HÖHN A. Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biol.*, 42, 101901, **2021**.

DOI: 10.1016/j.redox.2021.101901

[35] FREEMAN B. A. and CRAPO J. D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 5, 412-426, **1982**.

[36] ASHOK B. T. and ALI R. The aging paradox: Free radical theory of aging. *Exp. Gerontol.*, 34, 3, 293-303, **1999**.

DOI: 10.1016/s0531-5565(99)00005-4.

[37] SASTRE J., PELLARDO F. V. and VINA J. Glutathione, oxidative stress and aging. *J. Am. Aging Assoc.*, 19, 129-139, **1996**.

DOI: 10.1007/BF02434082

[38] CANTUTI-CASTELVETRI, I., SHUKITT-HALE B. and JOSEPH J. A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 18, 4-5, 367-381, **2000**.



DOI: 10.1016/s0736-5748(00)00008-3

[39] MATILL H. A. Antioxidants. *Annu. Rev. Biochem.*, 16, 177-192, **1947**.

[40] SADOWSKA-BARTOSZ I. and BARTOSZ G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 404680, **2014**.

DOI: 10.1155/2014/404680

[41] HALLIWELL B. How to characterize an antioxidant: An update. *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 73-101, **1995**.

DOI: 10.1042/bss0610073.

[42] HALLIWELL B. and GUTTERIDGE J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 1, 1-8, **1990**.

DOI: 10.1016/0003-9861(90)90510-6.

[43] MIKA, D. What are antioxidants and how do we measure them? *ChocoVivo*, 2019.03.30. <https://chocovivo.com/blogs/articles/what-are-antioxidants-and-how-does-one-measure-them> (Hozzáférés dátuma: 2024.02.24).

[44] LEVINE M. , RAMSEY S. C. and DARUWARA R. Criteria and recommendation for Vitamin C intake. *JAMA*, 281, 15, 1415-1423, **1999**.

DOI: 10.1001/jama.281.15.1415.

[45] NCCIH, Antioxidants: In Depth, *Molecular*, 2013. 11.

<https://mmlhealth.com/en/antioxidants-in-depth/> (Hozzáférés dátuma: 2024.02.25)

[46] GERMAN J. Food processing and lipid oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 459, 23-50, **1999**.

DOI: 10.1007/978-1-4615-4853-9\_3

[47] JACOB R. A. Three eras of vitamin C discovery. *Subcell. Biochem.*, 25, 1-16, **1996**.

[48] KNIGHT J. Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 28, 6, 331-346, **1998**.

[49] EL-LATEEF, H. M. A., EL-DABEA T., KHALAF, M. M. and ABU-DIEF A. M. Recent Overview of Potent Antioxidant Activity of Coordination Compounds. *Antioxidants*, 12, 2, 213, **2023**.

DOI: 10.3390/antiox12020213

[50] WOLF G. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: The contribution of Henry A. Mattill. *J. Nutr.*, 135, 3, 363-366, **2005**.

DOI: 10.1093/jn/135.3.363

[51] Rice-Evans C. A, Diplock A. T. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, 15, 1, 77-96, **1993**.

DOI: 10.1016/0891-5849(93)90127-g.

- [52] Krinsky N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 2, 248-254, **1992**.  
DOI: 10.3181/00379727-200-43429.
- [53] NIKI E. Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: *Free radicals: From basic science to medicine*. Editor(s): Poli G., Albano E. and Dianzani M. U., Birkhauser Verlag, Basel, 365-73, **1993**.  
DOI: 10.1007/978-3-0348-9116-5
- [54] SIES H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 82, 2, 291-295, **1997**.  
DOI: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024
- [55] ZELKO I., MARIANI T. and FOLZ R. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 3, 337-349, **2002**.  
DOI: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x
- [56] BANNISTER J., BANNISTER W. and ROTILIO G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22, 2, 111-180, **1987**.  
DOI: 10.3109/10409238709083738
- [57] Johnson F. and Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med.*, 26, 4-5, 340-352, **2005**.  
DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.006
- [58] WUERGES J., LEE J. W., YIM Y. I., YIM H. S., KANG S. O. and DJINOVIC CARUGO K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 23, 8569-8574, **2004**.  
DOI: 10.1073/pnas.0308514101
- [59] CHELIKANI P., FITA I. and LOEWEN P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 2, 192-208, **2004**.  
DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
- [60] EISNER T. and ANESHANSLEY D. J. Spray aiming in the bombardier beetle: Photographic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 17, 9705-9709, **1999**.  
DOI: 10.1073/pnas.96.17.9705
- [61] GAETANI G., FERRARIS A., ROLFO M., MANGERINI R., ARENA S. and KIRKMAN H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87, 4, 1595-1599, **1996**.
- [62] MEISTER A. and ANDERSON M. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711-760, **1983**.  
DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431

- [63] BRIGELIUS-FLOHE R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 9-10, 951-965, **1999**.  
DOI: 10.1016/s0891-5849(99)00173-2.
- [64] HAYES J., FLANAGAN J. and JOWSEY I. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88, **2005**.  
DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- [65] MEISTER A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.*, 269, 13, 9397-9400, **1994**.
- [66] SMIRNOFF N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam. Horm.*, 61, 241-266, **2001**.  
DOI: 10.1016/s0083-6729(01)61008-2
- [67] PADAYATTY S., KATZ A., WANG Y., ECK P., KWON O., LEE J., CHEN S., CORPE C., DUTTA A., DUTTA S. K. and LEVINE M. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, 22, 1, 18-35, **2003**.  
DOI: 10.1080/07315724.2003.10719272
- [68] SHIGEOKA S., ISHIKAWA T., TAMOI M., MIYAGAWA Y., TAKEDA T., YABUTA Y. and YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.*, 53, 372, 1305-1319, **2002**.
- [69] NASSAR E., MULLIGAN C., TAYLOR L., KERKSICK C., GALBREATH M., GREENWOOD M., KREIDER, R. and WILLOUGHBY, D. S. Effects of a single dose of N-Acetyl-5-methoxytryptamine (Melatonin) and resistance exercise on the growth hormone/IGF-1 axis in young males and females. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, 4, 14, 1-13, **2007**.  
DOI: 10.1186/1550-2783-4-14
- [70] CANIATO R., FILIPPINI R., PIOVAN A., PURICELLI L., BORSARINI A. and CAPPELLETTI E. Melatonin in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 527, 593-597, **2003**.  
DOI: 10.1007/978-1-4615-0135-0\_68
- [71] REITER R. J., CARNEIRO R. C. and OH C. S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.*, 29, 8, 363-372, **1997**.  
DOI: 10.1055/s-2007-979057
- [72] TAN D. X., MANCHESTER L. C., REITER R. J., QI W. B., KARBOWNIK M. and CALVO J. R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol. Signals Recept.*, 9, 3-4, 137-159, **2000**.  
DOI: 10.1159/000014635
- [73] HERRERA E. and BARBAS C. Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.*, 57, 2, 43-56, **2001**.

[74] BRIGELIUS-FLOHE R. and TRABER M. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J.*, 13, 10, 1145- 1155, **1999**.

[75] TRABER M. G. and ATKINSON J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.*, 43, 1, 4-15, **2007**.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024

[76] WANG X. and QUINN P. Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.*, 38, 4, 309-336, **1999**.

DOI: 10.1016/s0163-7827(99)00008-9

[77] MASSEY K. D. and BURTON K.P. Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: Effects of alpha-tocopherol, Trolox and phytol. *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 5, 449-458, **1990**.

DOI: 10.1016/0891-5849(90)90058-q

[78] LÚCIO M., NUNES C., GASPAR D., FERREIRA H., LIMA J. L. F. C. and REIS S. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies in vitro. *Food Biophys.*, 4, 4, 312-320, **2009**.

DOI: 10.1007/s11483-009-9129-4

[79] ALBERTINI R. AND ABUJA P. M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic. Res.*, 30, 3, 181-188, **1999**.

DOI: 10.1080/10715769900300201

[80] GIORDANO M. E., CARICATO R. and LIONETTO M. G. Concentration Dependence of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Trolox in HeLa Cells: Involvement in the Induction of Apoptotic Volume Decrease. *Antioxidants*, 9, 11, 1058, **2020**.

DOI: 10.3390/antiox9111058

[81] DORTA E., ASPÉE A., PINO E., GONZÁLEZ L., LISSI E. and LÓPEZ-ALARCÓN C. Controversial alkoxy and peroxy radical scavenging activity of the tryptophan metabolite 3-hydroxy-anthranilic acid. *Biomed. Pharmacother.*, 90, 332-338, **2017**.

DOI: 10.1016/j.biopha.2017.03.082

[82] DISTELMAIER F., VALSECCHI F., FORKINK M., VAN EMST-DE VRIES S., SWARTS H. G., RODENBURG R. J. T., VERWIEL E. T. P. and SMEITINK J. A. M. Trolox-sensitive reactive oxygen species regulate mitochondrial morphology, oxidative phosphorylation. *Antioxid. Redox Sign.*, 17, 12, 1652–1669, **2012**.

DOI: 10.1089/ars.2011.4294

[83] VERGAUWEN H., TAMBUIZER B., JENNES K., DEGROOTE J., WANG W., DE SMET S., MICHIELS J. and VAN GINNEKEN C. Trolox and Ascorbic Acid Reduce Direct and Indirect Oxidative Stress in the IPEC-J2 Cells, an In Vitro Model for the Porcine Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*, 10, 3, e0120485, **2015**.

DOI: 10.1371/journal.pone.0120485

[84] SALGO M. G. and PRYOR W. A. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 333,2, 482-488, **1996**.

DOI: 10.1006/abbi.1996.0418

[85] MESSIER E. M., BAHMED K., TUDER R. M., CHU H. W., BOWLER R. P. and KOSMIDER B. Trolox contributes to Nrf2-mediated protection of human and murine primary alveolar type II cells from injury by cigarette smoke. *Cell Death Dis.*, 4, 4, e573, **2013**.

DOI: 10.1038/cddis.2013.96

[86] SINGH P. P., CHANDRA A., MAHDI F., RAY A. and SHARMA P. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. *Ind. J. Clin. Biochem.*, 25, 3, 225-243, **2010**.

DOI: 10.1007/s12291-010-0078-y

[87] CASTAÑEDA-ARRIAGA R., PÉREZ-GONZÁLEZ A., REINA M., ALVAREZ-IDABOY J. R. and GALANO A. Comprehensive investigation of the antioxidant and pro-oxidant effects of phenolic Compounds: A Double-Edged Sword in the Context of Oxidative Stress? *J. Phys. Chem.*, 122, 23, 6198–6214, **2018**.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b03500

[88] SHARMA M. K. and BUETTNER G. R. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An ESR study. *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 6, 649-653, **1993**.

DOI: 10.1016/0891-5849(93)90146-l

[89] POLJSKAK B. and RASPOR P. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: A comparative study. *Appl. Toxicol.*, 28, 2, 183-188, **2008**.

DOI: 10.1002/jat.1264

[90] KO K. M., YICK P. K., POON M. K. T. and IP S. P. Prooxidant and antioxidant effects of trolox on ferric ion-induced oxidation of erythrocyte membrane lipids. *Mol. Cell Biochem.*, 141, 1, 65-70, **1994**.

DOI: 10.1007/BF00935592

[91] KAHKESHANI N., FARZAEI F., FOTOUHI M., ALAVI S. S., BAHRAMSOLTANI R., NASERI R., MOMTAZ S., ABBASABADI Z., RAHIMI R., FARZEI M. H. and BISHAYEE

A. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: a mechanistic review. *Iran J. Basic Med. Sci.*, 22,3, 225-237, **2019**.

DOI: 10.22038/ijbms.2019.32806.7897

[92] NOURI A., HEIBATI F. and HEIDARIAN E. Gallic acid exerts anti-inflammatory, antioxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 394, 1, 1-9, **2021**.

DOI: 10.1007/s00210-020-01931-0

[93] COUTO A. G., KASSUYA C. A. L., CALIXTO J. B. and PETROVICK P. R. Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 23, 1, 124-131, **2013**.

DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000133

[94] CHANG S. S., LEE V.S, TSENG Y. L., CHANG K. C., CHEN K. B., CHEN Y. L. and LI C. Y. Gallic acid attenuates platelet activation and platelet-leukocyte aggregation: involving pathways of akt and GSK3 $\beta$ . *Evid. Complement. Alternat. Med.*, 2012, 683872, **2012**.

DOI: 10.1155/2012/683872

[95] LEE J. H., OH M., SEOK J. H., KIM S., LEE D. B., BAE G., BAE H. I., BAE S. Y., HONG Y. M., KWON S. O., LEE D. H., SONG C. S., MUN J. Y., CHUNG M. S. and KIM K. H. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. *Viruses*, 8, 6, 157, **2016**.

DOI: 10.3390/v8060157

[96] RASOOLY R., CHOI H. Y., DO P., MORRONI G., BRESCINI L., CIRIONI O., GIACOMETTI A. and APOSTOLIDIS E. whISOBAX™ Inhibits Bacterial Pathogenesis and Enhances the Effect of Antibiotics. *Antibiotics*, 9, 5, 264, **2020**.

DOI: 10.3390/antibiotics9050264

[97] LIMA K. G., KRAUSE G. C., SCHUSTER A. D., CATARINA A. V., BASSO B. S., DE MESQUITA F. C., PEDRAZZA L., MARCZAK E. S., MARTHA B. A., NUNES F. B., CHIELA E. C. F., JAEGER N., THOM'É M. P., HAUTE G. V., DIAS H. B., DONADIO M. V. and DE OLIVEIRA J. R. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. *Biomed. Pharmacother.*, 84, 1282–1290, 2016.

DOI: 10.1016/j.biopha.2016.10.048

[98] PRISCILLA D. and PRINCE P. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in wistar rats. *Chem Biol Interact.*, 179, 2-3, 118-124, **2009**.

DOI: 10.1016/j.cbi.2008.12.012

[99] KADE I. J., OGUNBOLUDE Y., KAMDEM J. P. AND ROCHA J. B. T. Influence of gallic acid on oxidative stress-linked streptozotocin-induced pancreatic dysfunction in diabetic rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 25, 1, 35-45, **2014**.

DOI: 10.1515/jbcpp-2012-0062

[100] NICHOLSON R. L. and HAMMERSCHMIDT R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 1, 369-389, **1992**.

DOI: 10.1146/annurev.py.30.090192.002101

[101] BAILEY B. A., STREM M. D., BAE H., ANTUNEZ DE MAYOLO G. and GUILTINAN M. J. Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/or methyl jasmonate. *Plant Sci.*, 168, 5, 1247-1258, **2005**.

DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.01.002

[102] BENNETT R. N. and WALLSGROVE R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.*, 127, 4, 617-633, 1994.

DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968

[103] MICHALAK A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. of Environ. Stud.*, 15, 4, 523-530, **2006**.

[104] WINKEL-SHIRLEY B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 3, 218-223, **2002**.

DOI: 10.1016/s1369-5266(02)00256-x

[105] RIVERO R. M., RUIZ J. M., GARCÍA P. C., LÓPEZ-LEFEBRE L. R., SÁNCHEZ E. and ROMERO L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.*, 160, 2, 315-321, **2001**.

DOI: 10.1016/s0168-9452(00)00395-2

[106] CHAPPELL J. and HAHLBROCK K. Transcription of plant defence genes in response to UV light and fungal elicitor. *Nature*, 311, 76-78, **1984**.

DOI: 10.1038/311076a0

[107] FURUTA S., NISHIBA Y. and SUDA I. Fluorometric assay for screening antioxidative activities of vegetables. *J. Food Sci.*, 62, 3, 526-528, **1997**.

DOI: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb04422.x

[108] WANG H., CAO G. and PRIOR R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 701-705, **1996**.

DOI: 10.1021/jf950579y

- [109] LIN J. K., LIN C. H., LING Y. C., LIN-SHIAN S. Y. and JUAN I. M. Survey of catechins, gallic acid and methylxantines in green, oolong, puerh and black teas. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 9, 3635-3642, 1998.  
DOI: 10.1021/jf980223x
- [110] HUANG D., OU B. and PRIOR R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6, 1841–1856, **2005**.  
DOI: 10.1021/jf030723c
- [111] YEO J. and SHAHIDI F. Revisiting DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay as a useful tool in antioxidant evaluation: a new IC100 concept to address its limitations. *J. Food Bioact.*, 7, 36-42, **2019**.  
DOI: 10.31665/JFB.2019.7196
- [112] Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K. M., Özyürek M., and Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 85, 5, 957-998, **2013**.  
DOI: 10.1351/PAC-REP-12-07-15
- [113] GORINSTEIN S., VARGAS O., JARAMILLO-OCAMPO N., SALAS I., MARTINEZ-AYALA A., ARANCIBIA P., TOLEDO F., KATRICH E. and TRAKHTENBERG S. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 3, 321-328, **2007**.  
DOI: 10.1007/s00217-006-0417-7
- [114] ZHOU K., LAUX J. J. and YU L. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5, 1118-1123, **2004**.  
DOI: 10.1021/jf030640w
- [115] BENZIE I. F. F. and STRAIN J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.*, 239, 1, 70-76, **1996**.  
DOI: 10.1006/abio.1996.0292
- [116] SADEER N., MONTESANO D., ALBRIZIO S., ZENGIN G. and MAHOMOODALLY F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9, 8, 709, **2020**.  
DOI: 10.3390/antiox9080709
- [117] PAYNE A. C., MAZZER A., CLARKSON G. J. and TAYLOR G. Antioxidant assays - consistent findings from FRAP and ORAC reveal a negative impact of organic cultivation on antioxidant potential in spinach but not watercress or rocket leaves. *Food Sci. Nutr.*, 1, 6, 439-444, **2013**.



DOI: 10.1002/fsn3.71

[118] WOJTUNIK-KULESZA K. A. Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. *Molecules*, 25, 22, 5267, **2020**.

DOI: 10.3390/molecules25225267

[119] MONIRUZZAMAN M., SULAIMAN S. A., KHALIL I. and GAN S. H. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: A comparison with manuka honey. *Chem. Cent. J.*, 7, 138, **2013**.

DOI: 10.1186/1752-153X-7-138

[120] SHARIFI-RAD J., QUISPE C., CASTILLO C. M. S., CAROCA R., LAZO-VÉLEZ M. A., ANTONYAK H., POLISHCHUK A., LYSIUK R., OLIINYK P., DE MASI L., BONTEMPO P., MARTORELL M., DAŞTAN S. D., RIGANO D., WINK M. and CHO W. C. Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2022, 3848084, **2022**.

DOI: 10.1155/2022/3848084

[121] KARADIREK S., KANMAZ N., BALTA Z., DEMIRCIVI P., ÜZER A., HIZAL J. and APAK R. Determination of total antioxidant capacity of humic acids using CUPRAC, Folin-Ciocalteu, noble metal nanoparticle- and solid-liquid extraction-based methods. *Talanta*, 153, 120–129, **2016**.

DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.006

[122] APAK R., GÜÇLÜ K., DEMIRATA B., ÖZYÜREK M., CELIK S. E., BEKTAŞOĞLU B., BERKER K. I. and OZYURT D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 7, 1496-1547, **2007**.

DOI: 10.3390/12071496

[123] APAK R., GÜÇLÜ K., ÖZYÜREK M. and CELIK S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta*, 160, 413-419, **2007**.

DOI: 10.1007/s00604-007-0777-0

[124] ÖZYÜREK M., GÜÇLÜ K. and APAK R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 30, 4, 652-664, **2011**.

DOI: 10.1016/j.trac.2010.11.016

[125] BAYARSAIKHAN G., AVAN A. N., ÇEKİÇ S. D. and APAK R. Use of modified CUPRAC and dinitrophenylhydrazine colorimetric methods for simultaneous measurement of

oxidative protein damage and antioxidant defense against oxidation, *Talanta*, 204, 613-662, **2019**.

DOI: 10.1016/j.talanta.2019.06.049

[126] APAK R., GÜÇLÜ K., ÖZYÜREK M., Karademir S. E. and Altun M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radic. Res.*, 39, 9, 949-961, **2005**.

DOI: 10.1080/10715760500210145

[127] ÖZYÜREK M., BEKTAŞOĞLU B., GÜÇLÜ K., GÜNGÖR N. and APAK R. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone–water solution containing 2% methyl- $\beta$ -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal. Chim. Acta*, 630, 1, 28-39, **2008**.

DOI: 10.1016/j.aca.2008.09.057

[128] BEKTAŞOĞLU B., CELİK S. E., ÖZYÜREK M., GÜÇLÜ K. and APAK R. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345, 3, 1194-1200, **2006**.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.038

[129] BENER M., ÖZYÜREK M., GÜÇLÜ K. and APAK R. Development of a low-cost optical sensor for cupric reducing antioxidant capacity measurement of food extracts. *Anal. Chem.*, 82, 10, 4252-4258, **2010**.

DOI: 10.1021/ac100646k

[130] TUFAN A. N., ÇELİK S. E., ÖZYÜREK M., GÜÇLÜ K. and APAK R. Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method, *Talanta*, 108, 136-142, **2013**.

DOI: 10.1016/j.talanta.2013.02.061

[131] WAYNER D. D., BURTON G. W., INGOLD K. U. and LOCKE S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.*, 187, 1, 33-37, **1985**.

DOI: 10.1016/0014-5793(85)81208-4

[132] CAO G., ALESSIO H. M. and CUTLER R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 3, 303-311, **1993**.

DOI: 10.1016/0891-5849(93)90027-r.

[133] DELANGE R. J. AND GLAZER A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal. Biochem.*, 177, 2, 300-306, **1989**.

DOI: 10.1016/0003-2697(89)90056-0

[134] CALDWELL C. R. Oxygen radical absorbance capacity of the phenolic compounds in plant extracts fractionated by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.*, 293, 2, 232-238, **2001**.

DOI: 10.1006/abio.2001.5134

[135] BADARINATH A. V., RAO K. M., CHETTY C. M. S., RAMKANTH V., RAJAN T. V. S. AND GNANAPRAKASH K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. PharmTech. Res.*, 2, 2, 1276-1285, **2010**.

[136] OU B., HAMPSCH-WOODILL M. and PRIOR R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 10, 4619-4626, **2001**.

DOI: 10.1021/jf010586o

[137] BORLINGHAUS J., REITER J., RIES M. and GRUHLKE M. C. H. Chapter 37 - Screening procedures and tests for antioxidants. In: *Pathology* Editor(s): Victor R. Preedy, Academic Press, Cambridge, 389-395, **2020**.

DOI: 10.1016/B978-0-12-815972-9.00037-8

[138] BARTOSZEK M. and POLAK, J. An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. *Food Chem.*, 132, 4, 2089–2093, **2012**.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.12.060

[139] MORSY M. A. and KHALED M. M. Novel EPR characterization of the antioxidant activity of tea leaves. *Spectrochimica. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 58, 6, 1271-1277, **2002**.

DOI: 10.1016/s1386-1425(01)00716-8

[140] YU L. L. and CHENG Z. Application of electron spin resonance (ESR) spectrometry in nutraceutical and food research. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 1, 62–78, **2008**.

DOI: 10.1002/mnfr.200700395

[141] ZIVKOVIC J. V., ZEKOVIC Z., MUJIC I. O., GODEVAC D., MOJOVIC M., MUJIC A. and SPASOJEVIC I. EPR spin-trapping and spin-probing spectroscopy in assessing antioxidant properties: Example on extracts of catkin, leaves, and spiny burs of *Castanea sativa*. *Food Biophys.*, 4, 2, 126–133, **2009**.

DOI: 10.1007/s11483-009-9109-8

- [142] ELIAS R. J., ANDERSEN M. L., SKIBSTED L. H. and WATERHOUSE, A. L. Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin trapping. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10, 4359–4365, **2009**.  
DOI: 10.1021/jf8035484
- [143] VAN LEEUW R., KEVERS C., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J. O. and DOMMES J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of pinot noir. *J. Food Compos. Anal.*, 36, 1–2, 40–50, **2014**.  
DOI: 10.1016/j.jfca.2014.07.001
- [144] JEHLE D., LUND M. N., ØGENDAL L. H. and ANDERSEN M. L. Characterisation of a stable radical from dark roasted malt in wort and beer. *Food Chem.*, 125, 2, 380–387, **2011**.  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.011
- [145] BARTOSZEK M. and POLAK, J. A comparison of antioxidative capacities of fruit juices, drinks and nectars, as determined by EPR and UV-vis spectroscopies. *Spectrochimica Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 153, 546–549, **2016**.  
DOI: 10.1016/j.saa.2015.09.022
- [146] ORLOWSKA M., KOWALSKA T., SAJEWICZ M., PYTLAKOWSKA K., BARTOSZEK M., POLAK J. and WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Antioxidant activity of selected thyme (*Thymus L.*) species and study of the equivalence of different measuring methodologies. *J. AOAC Int.*, 98, 4, 876–882, **2015**.  
DOI: 10.5740/jaoacint.SGE6-Orlowska
- [147] Gadow A., Joubert E., and Hansmann C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*aspalathus linearis*), r-Tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3, 632-638, **1997**.  
DOI: 10.1021/jf960281n
- [148] HADWAN M. H. and ABED H. N. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Brief*, 6, 194-199, **2016**.  
DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.012
- [149] BEAUCHAMP C. AND FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44, 1, 276-287, **1971**.  
DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
- [150] HAQUE, M. A., MOROZOVA K., FERRENTINO G. and SCAMPICCHIO M. Electrochemical Methods to Evaluate the Antioxidant Activity and Capacity of Foods: A Review. *Electroanalysis*, 33, 6, 1419-1435, **2021**.  
DOI: 10.1002/elan.202060600

- [151] HOYOS-ARBELÁEZ J., VÁZQUEZ M. AND CONTRERAS-CALDERÓN J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chem.*, 221, 1371-1381, **2017**.  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.017
- [152] BARTOSZ G. Total antioxidant capacity. *Adv Clin Chem.*, 37, 219-292, **2003**.  
DOI: 10.1016/s0065-2423(03)37010-6
- [153] FOTI M. C., DAQUINO C. AND GERACI C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH(\*) radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.*, 69, 7, 2309-2314, **2004**.  
DOI: 10.1021/jo035758q
- [154] DAVIES G. and GHABBOUR E. Humic Substances: Structures, Models and Functions (Special Publications) 1st Edition. Royal Society of Chemistry, **2002**.  
DOI: 10.1039/9781847551085
- [155] ZACCONE C., PLAZA C., CIAVATTA C., MIANO T. and SHOTYK W. Advances in the determination of humification degree in peat since Achard (1786): Applications in geochemical and paleoenvironmental studies. *Earth-Sci. Rev.*, 185, 163-178, **2018**.  
DOI: 10.1016/j.earscirev.2018.05.017
- [156] STEELINK C. What Is Humic Acid? A Perspective Of The Past Forty Years. In: *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications – The Proceedings of the third Humic Substances Seminar*. Editor(s): Ghabbour E. A. and Davies G., The Royal Society of Chemistry, London, 1-8, **1999**.
- [157] STOHS S. J. Safety and efficacy of shilajit (mumie, moomiyo). *Phytother. Res.*, 28, 4, 475-479, **2014**.  
DOI: 10.1002/ptr.5018
- [158] WALLNER A., BOROMISSZA Ö., DZSIDA L., HARGIATI L., JÁMBOR O., JURCSIK I., KALMÁR I., KOVATSITS M., NAGYMIHÁLY F., PATKÓ GY., STEFANOVITS P. and TAKÁCS P. A szén huminsav tartalmának hasznosítási lehetőségei. Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság, Budapest, **1974**.
- [159] GAUTAM R. K., NAVARATNA D., MUTHUKUMARAN S., SINGH A., ISLAMUDDIN and MORE N. Humic Substances: Its Toxicology, Chemistry and Biology Associated with Soil, Plants and Environment. In: *Humic Substances*, Editor(s): Makan A., IntechOpen; London, **2021**.  
DOI: 10.5772/intechopen.98518

- [160] NIEDER R., BENBI D.K. and REICHL F.X. Soil Components and Human Health. Springer, Dordrecht, **2018**.  
DOI: 10.1007/978-94-024-1222-2
- [161] BÉRES T., KABDEBÓ S., FERENC K., NEMESÉRI L., SZÉLSY A. and VISY L. Studies on therapeutic application of fulvic acids, with special regard to their liver protecting function. *Magy Állatorv. Lapja*. 12, 351–352, **1957**.
- [162] BÉRES T., KIRÁLY I., BÓNA E., LŐVEI E. and RÓBERT S. Tőzeg-fulvósavval szerzett therapiás tapasztalataink. *Orvosi Hetilap*, 99, 17, 567, **1958**.
- [163] PANT K., SINGH B. and THAKUR N. Shilajit: A Humic Matter Panacea for Cancer. *Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res.* 4, 2, 17–25, **2012**.
- [164] TIWARI S.K., DICKS L.M.T., POPOV I.V., KARASEVA A., ERMAKOV A.M., SUVOROV A., TAGG J.R., WEEKS R. and CHIKINDAS M.L. Probiotics at War Against Viruses: What Is Missing from the Picture? *Front. Microbiol.*, 11, 1877, **2020**.  
DOI: 10.3389/fmicb.2020.01877
- [165] KÖNTÖS Z. Efficacy of “Essential Iodine Drops” against Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *PLoS ONE*, 16, 7, e0254341, **2021**.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0254341
- [166] ERDTMAN H.G.H. Studies on the formation of complex oxidation and condensation products of phenols. A contribution to the investigation of the origin and nature of humic acid. Part I.—Studies of the reactivity of simple monocyclic quinones. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 143, 848, 177-191, **1933**.  
DOI: 10.1098/rspa.1933.0212
- [167] KLEBER M. and LEHMANN J. Humic Substances Extracted by Alkali Are Invalid Proxies for the Dynamics and Functions of Organic Matter in Terrestrial and Aquatic Ecosystems. *J. Environ. Qual.*, 48, 2, 207-216, **2019**.  
DOI: 10.2134/jeq2019.01.0036
- [168] GELENCSÉR A., HOFFER A., KRIVÁCSY Z., KISS G., MOLNÁR A. and MÉSZÁROS E. On the possible origin of humic matter in fine continental aerosol. *J. Geophys. Res.*, 107, 12, 4137, **2002**.  
DOI: 10.1029/2001JD001299
- [169] ODZOBA D.M., BLYTH J.C., ENGLER R.F., DINEL H. and SCHNITZER, M. Leonardite and humified organic matter. In: *Humic Substances: Structures, Models and Functions (Special Publication)*. Editor(s): Ghabbour E.A. and Davies, G., Royal Society of Chemistry, London, 309-314, **2001**.

DOI: 10.1039/9781847551085-00309

[170] WANG S., WANG Y., HE X. and LU Q. Degradation or humification: rethinking strategies to attenuate organic pollutants. *Trends Biotechnol.*, 40, 9, 1061-1072, **2022**.

DOI: 10.1016/j.tibtech.2022.02.007

[171] FLAIG W., BEUTELSPACHER H. and RIETZ E. Chemical composition and physical properties of humic substances. In: *Soil Components, Vol. 1: Organic Components*. Editor(s): Gieseking, J. E., Springer-Verlag, New York, 1–211, **1975**.

DOI:10.1007/978-3-642-65915-7\_1

[172] TOMBACZ E. Humuszanyagok a környezeti rendszerekben. *Magy. Kém. Lapja*, 57, 8, 306-313, **2002**.

[173] JASTROW J. D., AMONETTE J. E. and BAILEY V. L. Mechanisms controlling soil carbon turnover and their potential application for enhancing carbon sequestration. *Clim. Change*, 80, 1, 5-23, **2007**.

DOI: 10.1007/s10584-006-9178-3

[174] KALAKOIDO L., ODEY E. A. and AMENAY A. Application of Techniques Derived from the Study of Soil Organic Matter to Characterize the Organic Matter during the Composting of Various Materials-A Review. *J. Poll. Effects Cont.*, 05,02, 1000184, **2017**.

DOI: 10.4172/2375-4397.1000184

[175] WU J., ZHAO Y., QI H., ZHAO X., YANG T., DU Y., ZHANG H. and WEI Z. Identifying the key factors that affect the formation of humic substance during different materials composting. *Bioresour. Technol.*, 244, 1, 1193-1196, **2017**.

DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.100

[176] STEVENSON F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, **1994**.

[177] HAYES, M.H., McCARTHY P., MALCOLM R.L. and SWIFT R.S. Structures of humic substances: The emergence of forms. In: *Humic substance II: In search of structure*. Editor(s): Hayes, M.H.; Mccarthy, P.; Malcolm, R.L. and Swift, R.S., John Wiley & Sons, New York, 3-31, **1989**.

[178] SCHULTEN, H. R. and SCHNITZER M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Sci. Nat.*, 82, 487–498, **1995**.

DOI: 10.1007/BF01134484

[179] SCHULTEN, H. R. and SCHNITZER M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 26, 1–15, **1997**.

DOI: 10.1007/s003740050335

[180] JOHNSTON C.T. and TOMBÁ CZ E. Surface Chemistry of Soil Minerals. In: *Soil Mineralogy with Environmental Applications*. Editor(s): Dixon J. B. and Schulze D. G., Soil Science Society of America, Madison, **2002**.

DOI: 10.2136/sssabookser7.c2

[181] BUFFLE J., GRETER F. L. AND HAERDI W. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, 49, 2, 216-222, **1977**.

DOI: 10.1021/ac50010a012

[182] JURCSIK I. Doktori (PhD) Disszertáció, Huminanyagok szerkezetének és élettani hatásának vizsgálata, Sopron, **1978**.

[183] SWIFT R.S. Organic matter characterization. In: *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Editor(s): Sparks D. L., Page A. L., Helmke P. A., Loeppert R. H., Soltanpour P. N., Tabatabai M. A., Johnston C. T. and Sumner M. E., Soil Science Society American, Madison, 1011-1020, **1996**.

[184] KUWATSUKA S., WATANABE A., ITOH K. AND ARAI S. Comparison of Two Methods of Preparation of Humic and Fulvic Acids, IHSS Method and NAGOYA Method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 38, 1, 23-30, **1992**.

DOI: 10.1080/00380768.1992.10416948

[185] JANOS P. Separation methods in the chemistry of humic substances. *J. Chromatogr. A*, 983, 1-2, 1-18, **2003**.

DOI: 10.1016/s0021-9673(02)01687-4

[186] THURMAN E. M. and MALCOLM R. L. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 15, 4, 463-466, **1981**.

DOI: 10.1021/es00086a012

[187] FATIMA N., JAMAL A., HUANG Z., LIAQUAT R., AHMAD B., HAIDER R., ALI M.I., SHOUKAT T., ALOTHMAN Z.A., OULADSMANE, M., ALI T., ALI S., AKHTAR N. and SILLANPÄÄ M. Extraction and Chemical Characterization of Humic Acid from Nitric Acid Treated Lignite and Bituminous Coal Samples. *Sustainability*, 13, 16, 8969, **2021**.

DOI: 10.3390/su13168969

[188] HANC A., ENEV V., HREBECKOVA T., KLUCAKOVA M. AND PEKAR M. Characterization of humic acids in a continuous-feeding vermicomposting system with horse manure. *J. Waste Manag.*, 99, 1-11, **2019**.

DOI: 10.1016/j.wasman.2019.08.032



[189] DOS SANTOS J. V., FREGOLENTE L. G., MOUNIER S., HAJJOUL H., FERREIRA O. P., MOREIRA A. P. and BISINOTI M. C. Fulvic acids from Amazonian anthropogenic soils: Insight into the molecular composition and copper binding properties using fluorescence techniques. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 205, 111173, **2020**.

DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111173

[190] VAN KREVELEN D. W. Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel*, 29, 269-284, **1961**.

[191] Ribeiro J. S., Ok S. S., Garrigues S. and de la Guardia M. FTIR Tentative Characterization Of Humic Acids Extracted From Organic Materials. *Spectroscopy Letters*, 34, 2, 179-190, **2000**.

DOI: 10.1081/SL-100002007

[192] LANDGRAF M.D., DA SILVA S.C. and REZENDE M.O.O. Mechanism of Metribuzin Herbicide Sorption by Humic Acid Samples from Peat Vermicompost. *Anal. Chim. Acta*, 368, 155-164, **1998**.

DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00049-X

[193] TU Q., SHAN X. Q. and NI Z.M. Comparative characteristic studies on soil and commercial humic acids. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347, 330-336, **1993**.

DOI: 10.1007/BF00323816

[194] WOELKI G., FRIEDRICH S., HANSCHMANN G. and SALZER R. HPLC fractionation and structural dynamics of humic acids. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357, 548-552, **1997**.

DOI: 10.1007/s002160050211

[195] LUBAL P., SIROKY D., FETSH D. and HAVEL H. Study of complexation of Czech humic acids with metal ions. *Talanta*, 47, 1, 401-412, **1998**.

DOI: 10.1016/S0039-9140(98)00143-X

[196] HEJZLAR J., SZPAKOWSKA B. AND WERSHAW R.L. Comparison of humic substances isolated from peatbog water by sorption on DEAE-cellulose and amberlite XAD-2. *Wat. Res.*, 28, 9, 1961-1970. **1994**.

DOI: 10.1016/0043-1354(94)90171-6

[197] HADŽIJA O. and ŠPOLJAR B. Quantitative determination of carboxylate by infrared spectroscopy: application to humic acids. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351, 692-693, **1995**.

DOI: 10.1007/BF00323352

- [198] SENESI N., MIANO T. M., PROVENZANO M. R. and BRUNETTI G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.*, 81-82, 143-156, **1989**.  
DOI: 10.1016/0048-9697(89)90120-4
- [199] CHOPPIN G. R. and KULLBERG L. Protonation thermodynamics of humic acid. *J. Inorg. Nukl. Chem.*, 40, 4, 651-654, **1978**.  
DOI: 10.1016/0022-1902(78)80381-9
- [200] POMMER A. M. AND BREGER I. A. Potentiometric titration and equivalent weight of humic acid. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 20, 1, 30-44, **1960**.  
DOI: 10.1016/0016-7037(60)90136-8
- [201] THIELE H. and KETTNER H. Über Huminsäuren. *Kolloid-Z*, 130, 131-160, **1953**.
- [202] PALLADINO G., FERRY D., MARFREDI C. and VASCA E. Potentiometric determination of the total acidity of humic acids by constant-current coulometry. *Anal. Chimica Acta*, 582, 1, 164-173, **2007**.  
DOI: 10.1016/j.aca.2006.08.060
- [203] WILSON D. E. and KINNEY P. Effects of polymeric charge variations on the proton-metal ion equilibria of humic materials. *Limnol. Oceanogr.*, 22, 2, 281-289, **1977**.  
DOI: 10.4319/lo.1977.22.2.0281
- [204] SUTTON R. and SPOSITO G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 23, 9009–9015, **2005**.  
DOI: 10.1021/es050778q
- [205] KHIL'KO S.L., KOVTUN A.I. and RYBACHENKO V.I. Potentiometric titration of humic acids. *Solid Fuel Chem.*, 45, 5, 337–348, **2011**.  
DOI: 10.3103/S0361521911050028
- [206] BUFFLE J., DELODOEY M.D. and HAENDI L. The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. *Anal. Chim. Acta*, 101, 2, 339-357, **1978**.  
DOI: 10.1016/S0003-2670(01)93369-0
- [207] FRIMMEL F. H., HOPP W. and QUENTIN, K. E. Titration isolierter aquatischer Huminstoffe und ihrer Calcium-Komplexe mit starken Basen und Säuren. *Z. Wasser Abwasser Forsch.*, 18, 259-262, **1985**.
- [208] PATTERSSON C., ARSENIE I., EPHRAIM J.P., BOREN H. and ALLARD B. Properties of fulvic acids from deep groundwaters. *Sci. Total Environ.*, 81-82, 287-296, **1989**.  
DOI: 10.1016/0048-9697(89)90135-6

- [209] RITCHIE J. D. and PERDUE E. M. Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 67, 1, 85-96, **2003**.  
DOI: 10.1016/S0016-7037(02)01044-X
- [210] RITCHIE J. D. and PERDUE E. M. Analytical constraints on acidic functional groups in humic substances. *Org. Geochem.*, 39, 6, 783–799, **2008**.  
DOI:10.1016/j.orggeochem.2008.03.003
- [211] CHEN J., GU B., LEBOEUF E.J., PAN H. and DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48, 1, 59-68, **2002**.  
DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00041-3
- [212] Tombácz E., Mádi É., Szekeres M. and Rice J. A. Electrolyte induced spontaneous fractionation of polydisperse humate solutions. In: *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments and Waters*. Editor(s): Swift R. S. and Spark K. M., IHSS, Hyde Park Press, Adelaide, 53-60, **2001**.
- [213] SAAB S.C. and MARTIN-NETO L. Condensed aromatic rings and E4/E6 ratio: Humic acids in gleysoils studied by NMR CP/MAS<sup>13</sup>C, and dipolar dephasing. *Quím. Nova*, 30, 2, 260-263, **2007**.  
DOI: 10.1590/S0100-40422007000200003
- [214] AVAGYAN A., RUNKLE B. R. K. and KUTZBACH L. Application of high-resolution spectral absorbance measurements to determine dissolved organic carbon concentration in remote areas. *J. Hydrol.*, 517, 435–446, **2014**.  
DOI: 10.1016/j.jhydrol.2014.05.060
- [215] FÖLDÉNYI R., CZINKOTA, I., SEBŐK A. and MARTON, A. Huminyanyagok UV-VIS Spektruma és a Weibull-Féle Sűrűségfüggvény. In: *6. Környezetkémiai Szimpózium, 1st ed.* Editor(s): Salma I., Magyar Tudományos Akadémia: Bakonybél, Hungary, **2017**.
- [216] CHEN Y., SENESI N. and SCHNITZER M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Am. J.*, 41, 2, 352-358, **1977**.  
DOI: 10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x
- [217] HER N., AMY G., SOHN J. and GUNTEN U. UV absorbance ratio index with size exclusion chromatography (URI-SEC) as an NOM property indicator. *J. Water Supply Res. Technol.*, 57, 1, 35-44, **2008**.  
DOI: 10.2166/aqua.2008.029
- [218] CSICSOR J., GERSE, J. and TIKOS A. The biostimulant effect of different humic substance fractions on seed germination. In: *Humic substances in the global environment and*

*implications on human health*. Editor(s): Senesi N. and Miano T. M., Elsevier, Amsterdam, 557–562, **1994**.

[219] KLEIN O. I., KULIKOVA N. A., KONSTANTINOV A. I., ZYKOVA M. V. and PERMINOVA I. V. A Systematic Study of the Antioxidant Capacity of Humic Substances against Peroxyl Radicals: Relation to Structure. *Polymers*, 13, 19, 3262, **2021**.

DOI: 10.3390/polym13193262

[220] VERRILLO M., SALZANO M., SAVY D., DIMEO V., VALENTINI M., COZZOLINO V. and PICCOLO A. Antibacterial and antioxidant properties of humic substances from composted agricultural biomasses. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 9, 28, 2022,

DOI: 10.1186/s40538-022-00291-6

[221] PONOMARENKO E.V and ANDERSON D.W. Importance of charred organic matter in Black Chernozem soils of Saskatchewan. *Can. J. Soil Sci.*, 81, 3, 285–297, **2001**.

DOI: 10.4141/S00-075

[222] HU S., YIN J., NIE S., WANG J., PHILLIPS G.O., XIE M. and CUI S.W. In vitro evaluation of the antioxidant activities of carbohydrates. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.*, 7, 2, 19-27, **2016**.

DOI: 10.1016/j.bcdf.2016.04.001

[223] RODRÍGUEZ-BONILLA P., GANDÍA-HERRERO F., MATENCIO A., GARCÍA-CARMONA F. and LÓPEZ-NICOLÁS J.M. Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. *Food Anal. Methods.*, 10, 9, 2994-3000, **2017**.

DOI: 10.1007/S12161-017-0871-9

[224] FOTI M. C. and AMORATI R. Non-phenolic radical-trapping antioxidants. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61, 11, 1435-1448, **2009**.

DOI: 10.1211/jpp/61.11.0002

[225] AESCHBACHER M., GRAF C., SCHWARZENBACH R. P. and SANDER M. Antioxidant properties of humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 9, 4916-4925, **2012**.

DOI: 10.1021/es300039h

[226] RIMMER D. L. and SMITH A. M. Antioxidants in soil organic matter and in associated plant materials. *Eur. J. Soil Sci.*, 60, 2, 170-175, **2009**.

DOI: 10.1111/j.1365-2389.2008.01099.x

[227] RIMMER D. L. and ABBOTT G. D. Phenolic compounds in NaOH extracts of UK soils and their contribution to antioxidant capacity. *Eur. J. Soil. Sci.*, 62, 2, 285-294, **2011**.

DOI: 10.1111/j.1365-2389.2010.01341.x

[228] ZYKOVA M., SCHEPETKIN I., BELOUSOV M., KRIVOSHCHIEKOV S., LOGVINOVA L., BRATISHKO K., YUSUBOV M., ROMANENKO S. AND QUINN M. Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Humic Acids Isolated from Peat of Various Origins. *Molecules*, 23, 4, 753, **2018**.

DOI: 10.3390/molecules23040753

[229] KOROTKOVA E. I., KARBAINOV Y. A. and AVRAMCHIK O. A. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, 3, 465-468, **2003**.

DOI: 10.1007/s00216-002-1687-y

[230] WITWICKI M., JASZEWSKI A. R., JEZERSKA J., JERZYKIEWICZ M. and JEZERSKI A. The pH-induced shift in the g-tensor components of semiquinone-type radicals in humic acids-DFT and EPR studies. *Chem. Phys. Lett.*, 462, 4-6, 300-306, **2008**.

DOI: 10.1016/j.cplett.2008.07.086

[231] MAL'TSEVA E. V., YUDINA N. V. and LOMOVSKII O.I. Electrochemical reduction of oxygen in the presence of humic acids. *Russ. J. Phys. Chem.*, 85, 1257-1260, **2011**.

DOI: 10.1134/S003602441107020X

[232] RIFFALDI R. and SCHNITZER M. Electron-spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 8, 1, 1-10, **1972**.

DOI: 10.1016/0016-7061(72)90028-6

[233] EFIMOVA I.V., KHIL'KO S.L., SMIRNOVA O.V., BEREZHNOI V. S. and RYBACHENKO V. I. Antioxidant properties of humatomelanic acids from brown coal. *Solid Fuel Chem.*, 47, 193–196, **2013**.

DOI: 10.3103/S0361521913040058

[234] IHSS – Natural Organic Matter Research, Source Materials for IHSS Samples, Natural Organic Matter Research. <https://humic-substances.org/source-materials-for-ihss-samples/> (Hozzáférés dátuma: 2024.02.22)

[235] DOSKOCIL L., BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ J., ENEV V., KALINA L. and WASSERBAUER J. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel*, 213, 123–132, **2018**.

DOI: 10.1016/j.fuel.2017.10.114

[236] TOMBÁČZ E. and RICE J. A. Changes of colloidal state in aqueous systems of humic acids. In: *Understanding Humic substances, Advanced Methods, Properties and Applications*. Editor(s): Ghabbour, E. A. and Davies, G., Woodhead Publishing, Sawston, 69-78, **1999**.

DOI: 10.1016/C2013-0-17916-0

[237] TOMBÁ CZ E. Colloidal properties of humic acids and spontaneous changes of their colloidal state under variable solution conditions. *Soil Sci.*, 164, 11, 814-824, **1999**.

[238] MUTHURI L. K., NAGY L. and NAGY G. Chronopotentiometric method for assessing antioxidant activity: A reagentless measuring technique. *Electrochem. commun.*, 122, 1-2, 106907, **2020**.

DOI: 10.1016/j.elecom.2020.106907

[239] RICE J. A. and MACCHARTHY P. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, 17, 5, 635-648, **1991**.

DOI: 10.1016/0146-6380(91)90006-6

[240] EPHRAIM J.H. Heterogeneity as a Concept in the Interpretation of Metal Ion Binding by Humic Substances—The Binding of Zinc by an Aquatic Fulvic Acid. *Anal. Chim. Acta*, 267, 1, 39-45, **1992**.

DOI: 10.1016/0003-2670(92)85004-P

[241] LOBARTINI J. C., TAN K. H., ASMUSSEN L. E., LEONARD R. A., HIMMELSBACH D. and GINGLE A. R. Humic matter isolated from soils and water by the XAD-8 resin and conventional NaOH methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 20, 13-14, 1453-1477, **1989**.

DOI: 10.1080/00103628909368161

[242] TAN K.H., LOBARTINI J.C., HIMMELSBACH D.S. and ASMUSSEN, L.E. Composition of humic acids extracted under air and nitrogen atmosphere. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 22, 9-10, 861-877, **1991**.

DOI: 10.1080/00103629109368460

[243] CAMPANELLA L., COSMA B., DEGLINNOCENTI N., FERRI T., PETRONIO B. M. and PUPELLA A. Humic Compounds in Seawater and Marine Sediments from Antarctica. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 55, 1-4, 61-75, **1994**.

DOI: 10.1080/03067319408026209

[244] FUENTES M., GONZÁLEZ-GAITANO G. and GARCÍA-MINA J.M. The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Org. Geochem.*, 37, 12, 1949-1959, **2006**.

DOI: 10.1016/j.orggeochem.2006.07.024

[245] FT-IR, 13C NMR and Fluorescence Spectra/IHSS., *IHSS – Natural Organic Matter Research*. <https://humic-substances.org/ftir-13c-nmr-and-fluorescencespectra/> (Hozzáférés dátuma: 2024. április 5).

[246] NIU H., YANG H., TONG L., ZHONG S. and LIU Y. Spectral study of humic substance extract from pressurized oxidizing slag of Carlin-typed gold deposit. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 1347 012027, **2019**.

DOI: 10.1088/1742-6596/1347/1/012027

[247] KORSHIN G. V., LI C. W. and BENJAMIN M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Res.*, 31, 7, 1787-1795, **1997**.

DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00006-7

[248] CHIN Y. P., AIKEN G. and O'LOUGHLIN E. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 11, 1853-1858, **1994**.

DOI: 10.1021/es00060a015

[249] CHEN J., GU B., LEBOEUF E. J., PAN H. and DAI S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 48, 1, 59-68, **2002**.

DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00041-3

[250] WYSOCKI J. Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC N. Am.*, 37, 10, 750–759, **2019**.

[251] ZOU J., ZHANG H., YUE D. and HUANG J. Is the traditional alkali extraction method valid in isolating chemically distinct humic acid? *Adv. Chem. Eng.*, 6, 100077, **2021**.

DOI: 10.1016/j.ceja.2020.100077

[252] SENESI N., D'ORAZIO V. and RICCA G. Humic acids in the first generation of Eurosoils. *Geoderma*, 116, 3-4, 325-344, **2003**.

DOI: 10.1016/S0016-7061(03)00107-1

[253] ÅGREN A., BUFFAM I., BERGGREN M., BISHOP K., JANSSON M. and LAUDON H. Dissolved organic carbon characteristics in boreal streams in a forest-wetland gradient during the transition between winter and summer. *J. Geophys. Res.*, 113, 3, **2008**.

DOI: 10.1029/2007JG000674

[254] DE HAAN H. Solar UV-light penetration and photodegradation of humic substances in peaty lake water. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 5, 1072-1076, **1993**.

[255] CELIZ G., RENFIGE M. and FINETTI M. Spectral analysis allows using the DPPH\* UV–Vis assay to estimate antioxidant activity of colored compounds. *Chem. Pap.*, 74, 9, 3101-3109, **2020**.

DOI: 10.1007/s11696-020-01110-8

- [256] PHONGPAICHIT S., NIKOM J., RUNGJINDAMAI N., SAKAYAROJ J., HUTADILOK-TOWATANA N., RUKACHAISIRIKUL V. and KIRTIKARA K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from Garcinia plants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51, 3, 517–525, **2007**.  
DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00331.x
- [257] YOU S. H., YOON M. Y. and MOON J. S. Antioxidant and Anti-inflammatory Activity Study of Fulvic Acid. *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, 12, 285–289, **2021**.  
DOI: 10.4103/jnsbm.JNSBM\_12\_3\_3
- [258] KHUDA F., ANJUM M., KHAN S., KHAN H., SAHIBZADA M.U.K., KHUSRO A., JAN A., ULLAH N., SHAH Y. and ABBAS M. Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities of natural organic matter extracted from cretaceous shales in district Nowshera-Pakistan. *Arab. J. Chem.*, 5, 1-11, **2022**.  
DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103633
- [259] HANGUN-BALKIR, Y. and MCKENNEY, M.L. Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *Green Chem. Lett. Rev.*, 5, 147–153, **2012**.  
DOI: 10.1080/17518253.2011.603756
- [260] DENARDIN C. C., HIRSCH G. E., DA ROCHA R. F., VIZZOTTO M., HENRIQUES A. T., MOREIRA J. C. F., GUMA F. T. C. R. and EMANUELLI T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *J. Food Drug Anal.*, 23, 3, 387-398, **2015**.  
DOI: 10.1016/j.jfda.2015.01.006
- [261] DJENIDI H., KHENNOUF S. and BOUAZIZ A. Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progr. Nutr.*, 22, 1, 224-235, **2020**.  
DOI: 10.23751/pn.v22i1.7701
- [262] PHUYAL N., JHA P. K., RATURI P. P. and RAJBHANDARY S. Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *Sci. World J.*, 2020, 8780704, **2020**.  
DOI: 10.1155/2020/8780704
- [263] WERN K. H., HARON H. AND KENG C. B. Comparison of Total Phenolic Contents (TPC) and Antioxidant Activities of Fresh Fruit Juices, Commercial 100% Fruit Juices and Fruit Drinks. *Sains Malays.*, 45, 9, 1319- 1327, **2016**.
- [264] DEBSKA B., SPYCHAJ-FABISIAK E., SZULC W., GAJ R. and BANACH-SZOTT M. EPR Spectroscopy as a Tool to Characterize the Maturity Degree of Humic Acids. *Materials*, 14, 12, 3410, **2021**.



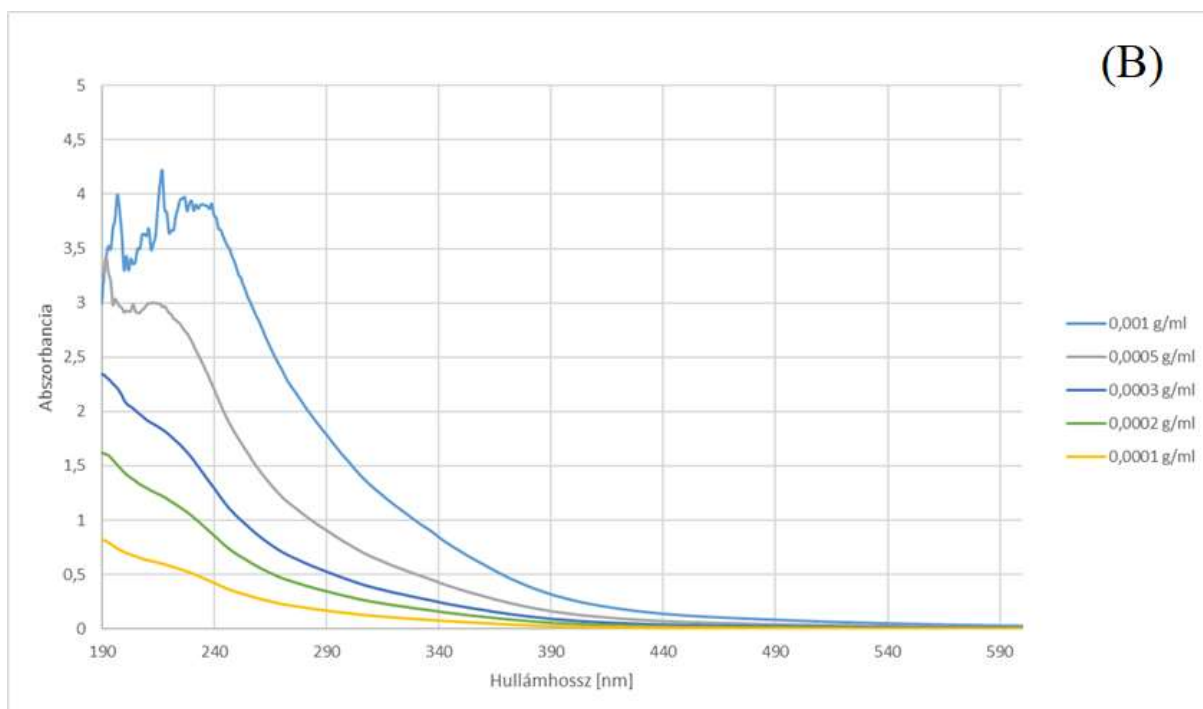
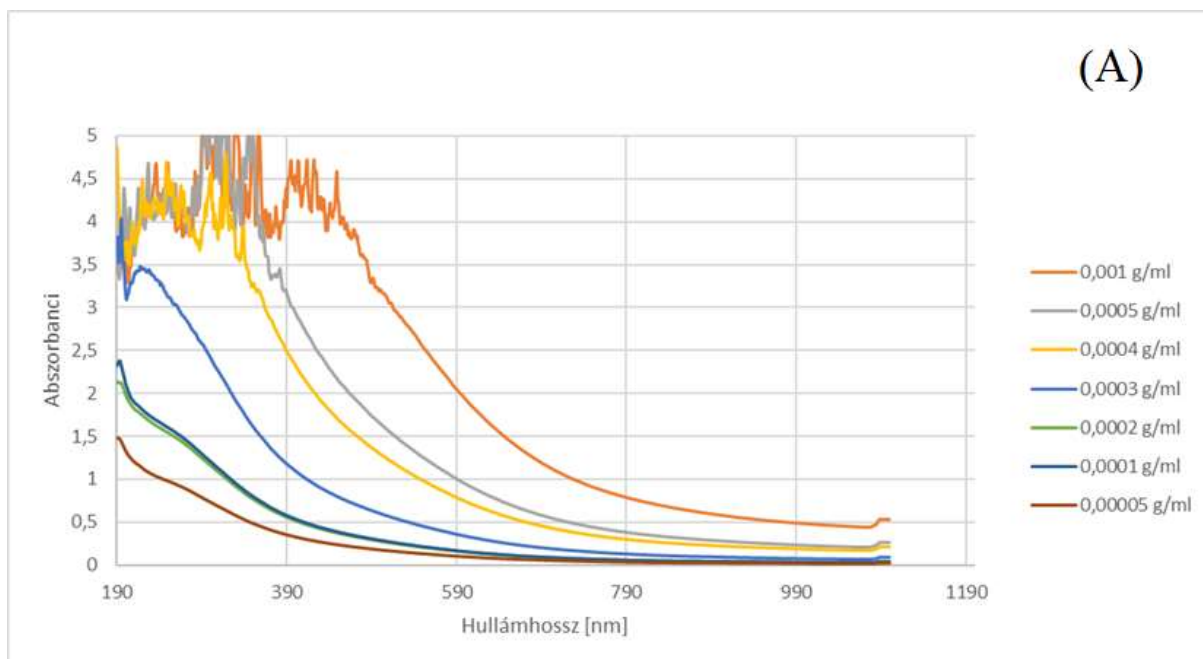
*DOI: 10.3390/ma14123410*

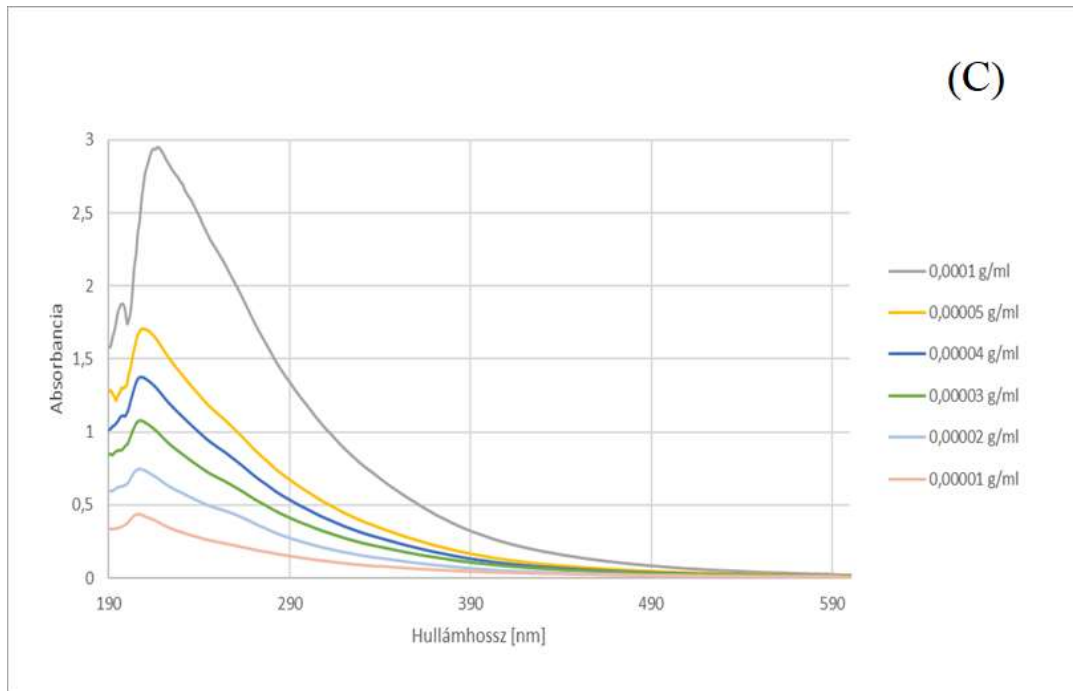
[265] PANDEY A. K., PANDEY S. D. AND MISRA V. Stability Constants of Metal–Humic Acid Complexes and Its Role in Environmental Detoxification. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 47, 2, 195-200, **2000**.

*DOI: 10.1006/eesa.2000.1947*

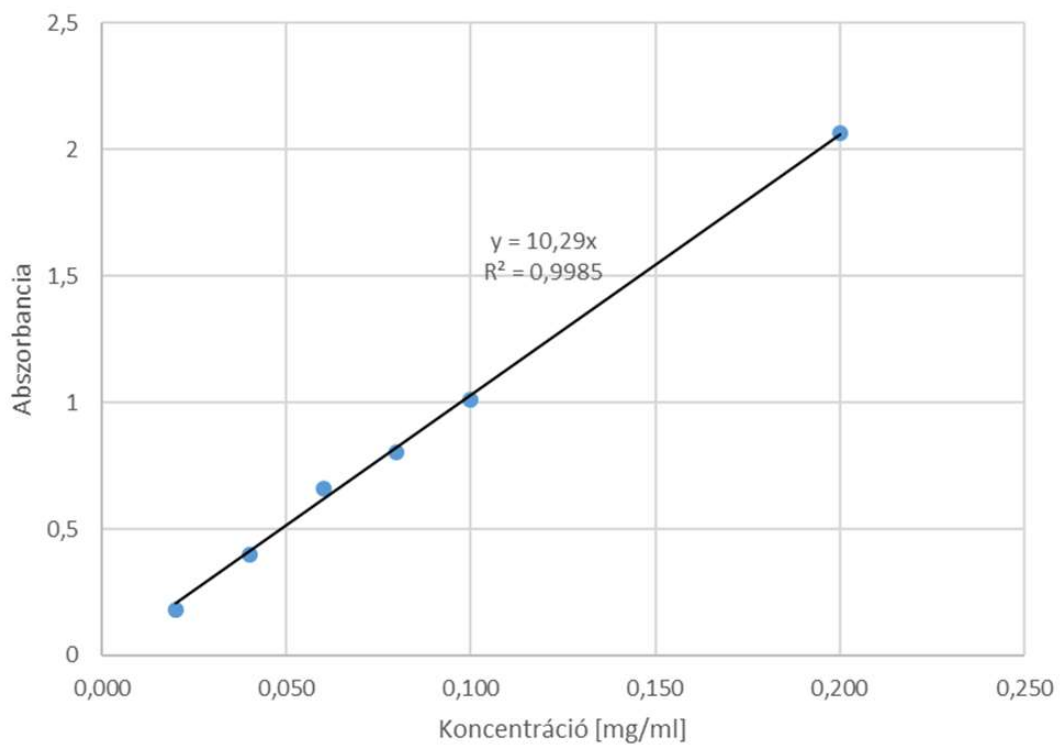
## Függelék

**F1 ábra:** A különböző minta koncentrációkhoz tartozó UV-Vis spektrumok: (a) a lúgos kinyerésű HA frakció spektrumai, (b) a lúgos kinyerésű FA frakció spektrumai, (c) a lúgos kinyerésű HY frakció spektrumai

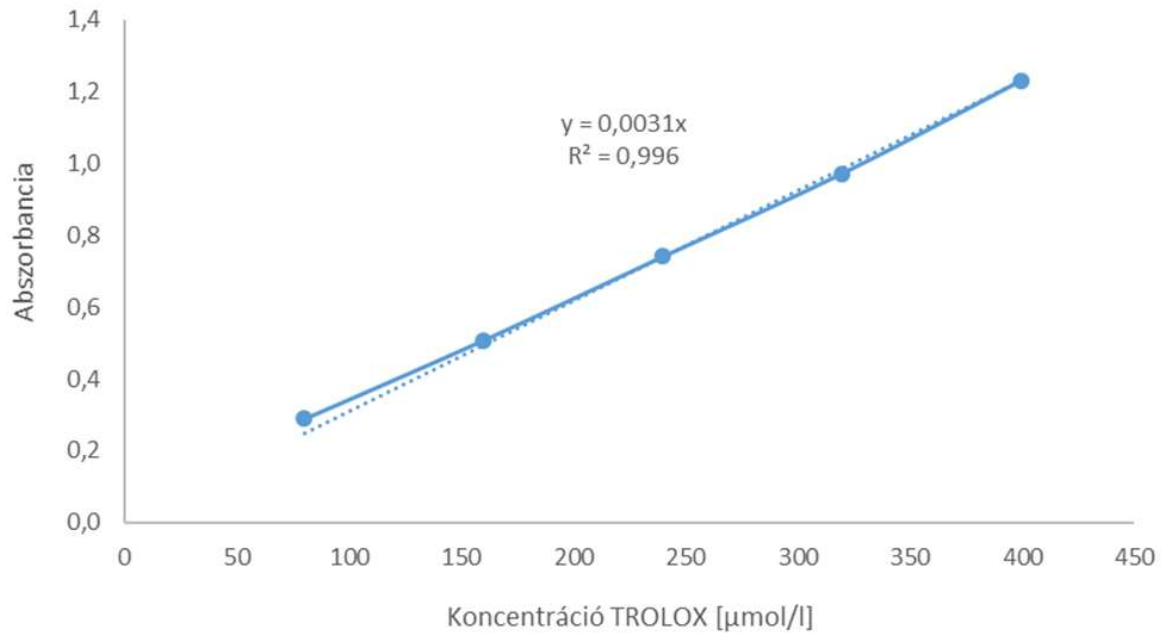




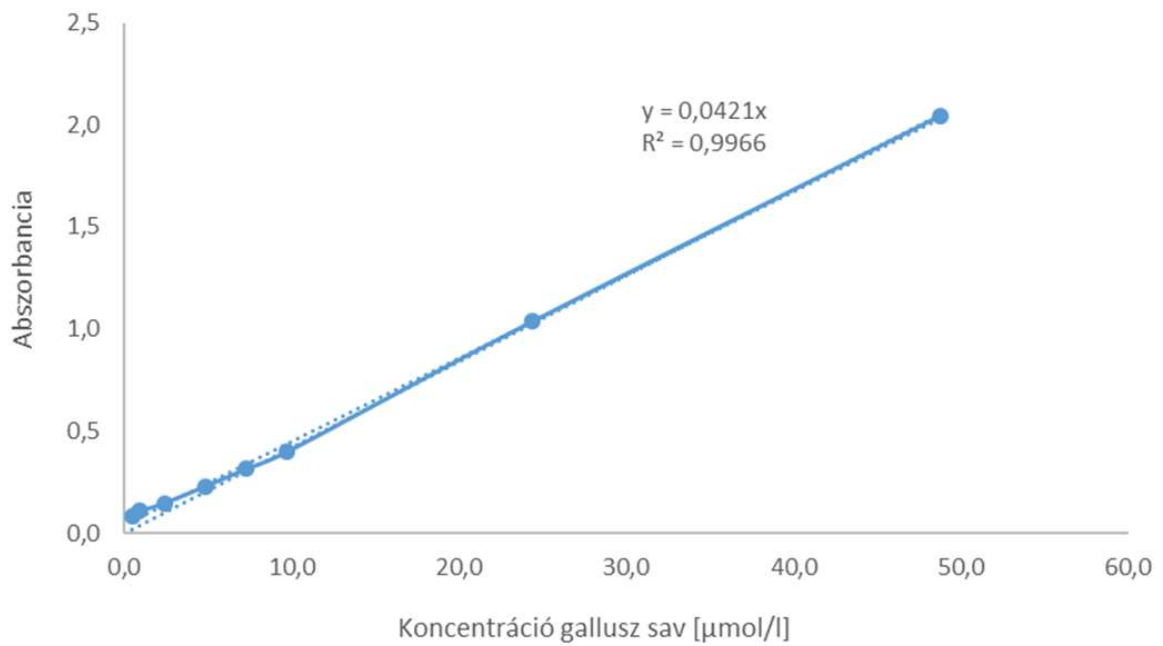
**F2 ábra:** A galluszsav kalibrálási görbéje a TPC módszerhez



**F3 ábra: A Trolox kalibrációs egyenese a CUPRAC módszer számolásához**



**F4 ábra: A galluszsav kalibrációs egyenese a CUPRAC módszer számolásához**



**F1 táblázat:** Az ORAC módszernél használt, az AOC értékek kiszámításához használt AUC értékek, amiket a görbe alatti területekből számoltam ki a (1)-es és (2)-es egyenletek segítségével. A TROLOX molalitása 15  $\mu\text{M}$  volt

	<b>AUC értékek</b>
Vak	50,21
Trolox	52,02
GA	57,43
IHSS FAP	52,96
IHSS HAP	51,05
IHSS HAL	51,69
ac-FA	51,24
al-FA	51,84
ac-HY	55,13
al-HY	56,39
ac-HA	51,46
al-HA	52,12

**F2 táblázat:** Az összes eredmény összefoglalása és az eredmények rangsorolása egy táblázatban.

	TPC GAE értékben [mg GAE/g]	DPPH IC <sub>50</sub> konc. [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	CUPRAC TEAC értékben [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]	CUPRAC TEAC értékben [ $\mu\text{mol}/\text{g}$ ]	ORAC AOC értékben [ $\mu\text{M TE}/\text{mg}$ ]
IHSS HAP	471,2	53	287,4	523,9	0,69
IHSS HAL	446,9	57	314,8	533,2	1,22
IHSS FAP	154,1	326	168,4	399,8	2,28
al-HA	300,6	180	108,1	174,1	1,58
al-FA	81,1	310	51,3	217,3	1,35
al-HY	152,5	190	236,5	370,4	5,11
ac-HA	310,3	260	124,8	292,5	1,03
ac-FA	86,8	400	55,8	224,7	0,85
ac-HY	174,5	200	247,2	439,7	4,06
<b>Rangsor az összes minta közül</b>	-	-	-	-	-
1.	IHSS HAP	IHSS HAP	IHSS HAL	IHSS HAL	al-HY
2.	IHSS HAL	IHSS HAL	IHSS HAP	IHSS HAP	ac-HY
3.	ac-HY	al-HA	al-HY	al-HY	IHSS FAP
<b>Rangsor csak a saját kinyerésű minták közül</b>	-	-	-	-	-
1.	ac-HA	al-HA	ac-HY	ac-HY	al-HY
2.	al-HA	ac-HA	al-HY	al-HY	ac-HY
3.	ac-HY	ac-HY	ac-HA	ac-HA	al-HA