



Rota**Chrom**
Perpetual Innovation

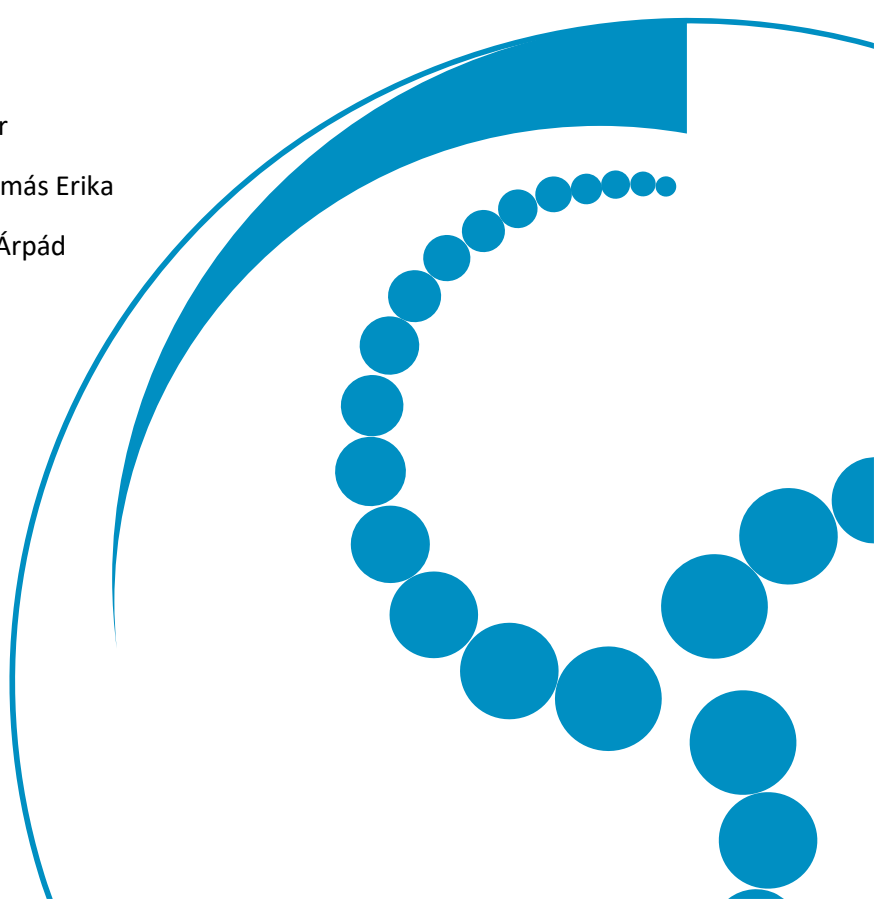
Jelentés cikória gyökér extrakciójáról, HPLC-MS és HPLC-ELSD vizsgálatáról

Összeállította: Blanár Eszter

Jantyikné Tamás Erika

Ellenőrizte: Dr. Könczöl Árpád

Dátum: 2020.06.17.



1. Bevezetés

Dr. Halász András és hallgatója Persovits Edina a Szent István Egyetem képviselőjében kért fel minket vadon termő cikória gyökér kivonatolására, valamint meghatározott komponenseinek HPLC vizsgálatára. A kivonatok in vitro és in vivo endoparazita-ellenes hatás tesztelés céljára készültek. Korábban sertések esetén mutatták ki a cikóriában is nagy mennyiségben előforduló fruktopoliszacharid, az inulin parazitaellenes hatását [1]. Az inulin forró vizes extrakcióját az irodalomban közölt módon végeztük (70 °C-on, ultrahangos kádban, 1 órát át) [2].

2. Anyagok és módszerek

2.1. Felhasznált vegyszerek és vizsgált minták

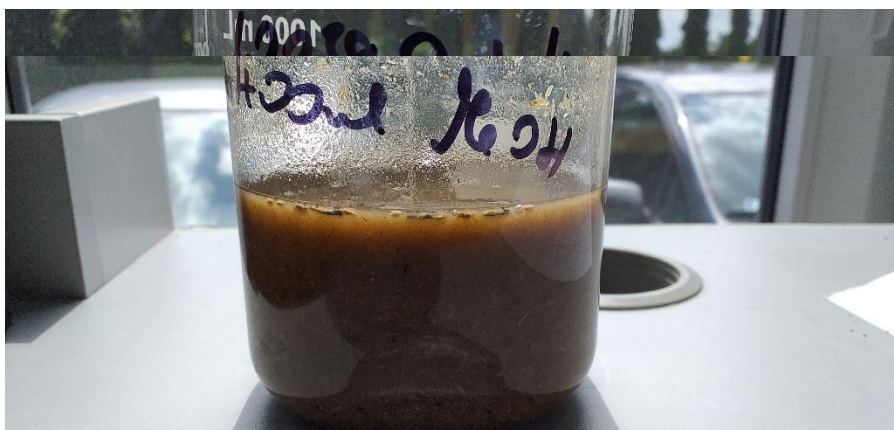
Az extrakcióhoz használt metanol laboratóriumi tisztaságú volt és a Molar Chemicals Kft.-től került beszerzésre. A HPLC-ELSD illetve LC-MS mérésekhez használt HPLC tisztaságú víz, illetve HPLC tisztaságú acetonitril a Sigma-Aldrich Kft.-től származott. A felhasznált cikória gyökérzet Karcag mellett került begyűjtésre.

2.2. Mintaelőkészítés A cikória gyökereket kiolvastottuk, megmostuk, majd körülbelül 1 cm nagyságúra aprítottuk.



1. kép Felaprított cikória minta.

2.3. Extrakció 100 gramm anyagot mértünk be 1000 ml-s főzőpoharakba, hozzámértünk 400 ml desztillált vizet, illetve metanolt, majd botmixerrel homogenizáltuk.

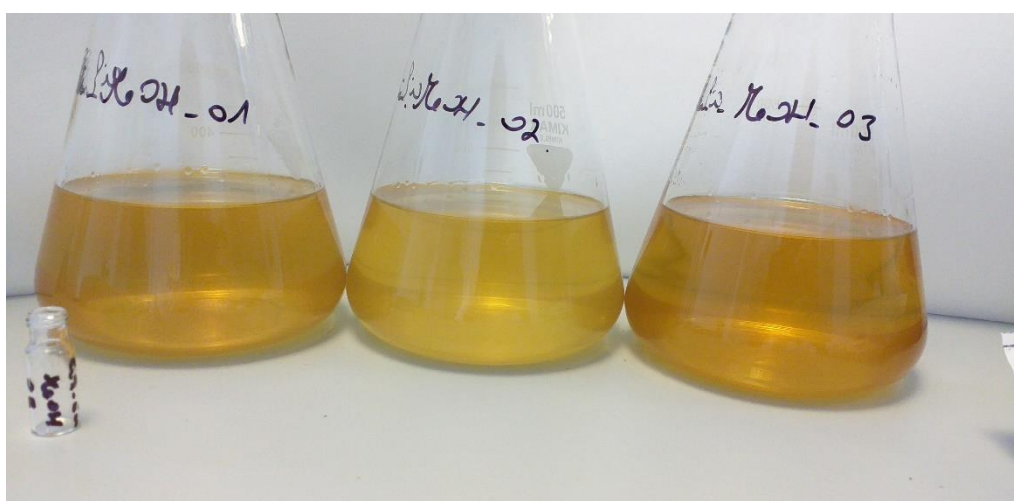


3. kép Felaprított cikória minta + 400 ml metanol homogenizálás után.

1. táblázat Minta megnevezések és extrakcióhoz bemért tömegek.

Dátum	Minta megnevezése	Bemért tömeg [g]
06.02.	Első vizes extrakt	100,32
06.02.	Első metanolos extrakt	100,38
06.08.	cik_in_w_01	100,18
06.08.	cik_in_w_02	100,05
06.08.	cik_in_w_03	116,26
06.08.	cik_in_MeOH_01	100,26
06.08.	cik_in_MeOH_02	100,19
06.08.	cik_in_MeOH_03	100,09
06.08.	cik_in_MeOH_04	20,05

Az extrakciót a vizes minta esetén 70 °C-ra állított ultrahangos kádban végeztük egy órán keresztül, míg metanollal 30 °C-on egy órán keresztül zajlott az kivonatalás. A metanolos extrakciók kapcsán fontos megjegyezni, hogy az ultrahangos kád hőmérsékletét nem lehetett szabályozni, így az első metanolos extrakt esetén 32 °C, a cik_in_MeOH 01,02,03 során 48 °C, míg a cik_in_MeOH_04-es minta esetén 60 °C-ra emelkedett az ultrahangos kád vizének hőmérséklete.



4. kép A metanolos extrakció mintái szűrés után.

2.4. Szűrés A szűrés két réteg szűrőpapírral történt, Erlenmeyer lombik és üvegtölcsér használatával.

HPLC minta előkészítés: A mérések előtt a mintákat szűrni kellett. A metanolos extraktum esetén 0,22 µm, míg a vizes minták 0,45 µm-es fecskendőszűrővel tudtuk szűrni. A HPLC mérésekhez minden mintából 1-1 ml-t vettünk ki.

Tárolás: Fagyasztóban.



5. kép A metanolos leszűrt cikória extraktum hűtés után.



6. kép A vizes leszűrt extraktum kiolvasztás után.

2.5. A minták bepárlása

Rotációs bepárlók segítségével történt az egyesített minták bepárlása. A metanolos extraktumok bepárlása 40 °C-on történt, míg a vizeseké 60 °C-on. Nem sikerült a teljes nedvesség tartalmat lepárolni a mintákról. A bepárlás végén a metanolos extraktumok esetén az alkalmazott nyomás 40 mbar volt, míg a vizes extraktum esetén 37 mbar.

2. táblázat Bepárlás utáni minták tömegmérlege.

Extraktum típusa	Bemért cikória tömege [g]	Bepárlás utáni tömeg [g]	Kinyerés [%]
Vizes	100,32		
	100,18		
	100,05		
	116,26		
Összesen:	416,81	85,75	20,57
Metanolos	100,32		
	100,26		
	100,19		
	20,05		
Összesen:	320,82	13,58	4,23
Metanolos (cik_in_MeOH_03)	100,09	3,19	3,19

2.6. Törzsoldatok készítése

2. táblázat Standard cukor oldatok koncentrációja.

Standard megnevezése	Bemért tömeg [mg]	Koncentráció mg/ml
L-ramnóz	5,23	~ 1
Glükóz	5,12	~ 1
D-laktóz	5,14	~ 1
Inulin	10,08	~ 1

Az oldatok 5 és 10 ml térfogatú mérőlombikban lettek elkészítve. Az inulin oldat több koncentrációban és különböző módon is össze lett állítva:

3. táblázat Inulin oldhatósági teszt.

Bemért anyag tömege [mg]	Koncentráció [mg/ml]	Oldószer	Mechanikai hatás	Megjegyzés
50,06	5	víz	Ultrahang	Opálos
50,06	5	víz	Ultrahang +70°C	Opálos
50,14	5	MeOH:víz (1:4)	Ultrahang +70°C	Opálos, sötétebb, mint a vizes.
20,30	2	víz	-	Nem teljes a beoldódás
10,14	1	víz	Ultrahang	Áttetsző

2.7. HPLC-ELSD módszer

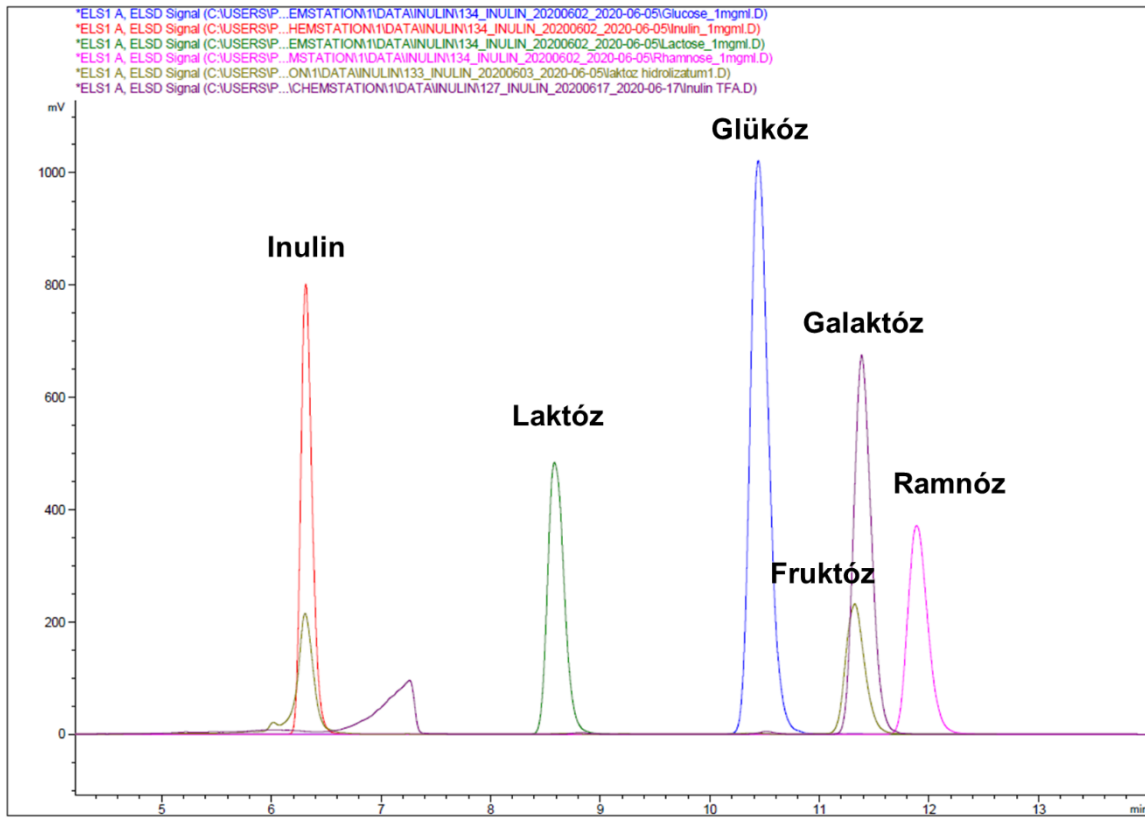
A HPLC-ELSD méréseket egy Agilent 1260 Infinity II típusú, kvaterner pumpával szerelt, 4260B ELSD fényszórásos detektorral kapcsolt rendszeren hajtottuk végre. Az elválasztásokat egy BIO-RAD Aminex HPX-87H (300x7,8 mm, 10 µm, cat#125-0140) ionkizárásos kolonnán végeztük. Eluensként HPLC tisztaságú vizet használtunk, 0,5 ml/min térfogatáram mellett, izokratikus módon 0-14 percig. Az analitikai oszlopot 80 °C-ra termosztáltuk, míg az injektálási térfogat egységesen 10 µl volt. Az ELSD paraméterei a következők voltak: párolgási hőmérséklet 45 °C, porlasztó hőmérséklet 45 °C, porlasztó gáz térfogatárama 1.60 SLM, 30-as jelsimítás. A kromatogramok kiértékelésére az Open Lab szoftvert használtuk. A standard minták mérése alapján a standard vegyületek retenciós idejei (1 mg/ml törzsoldat):

- inulin 6.315 perc
- laktóz 8.582 perc
- glükóz 10.441 perc
- galaktóz 11.322 perc
- fruktóz 11.386 perc
- rhamnóz 11.887 perc

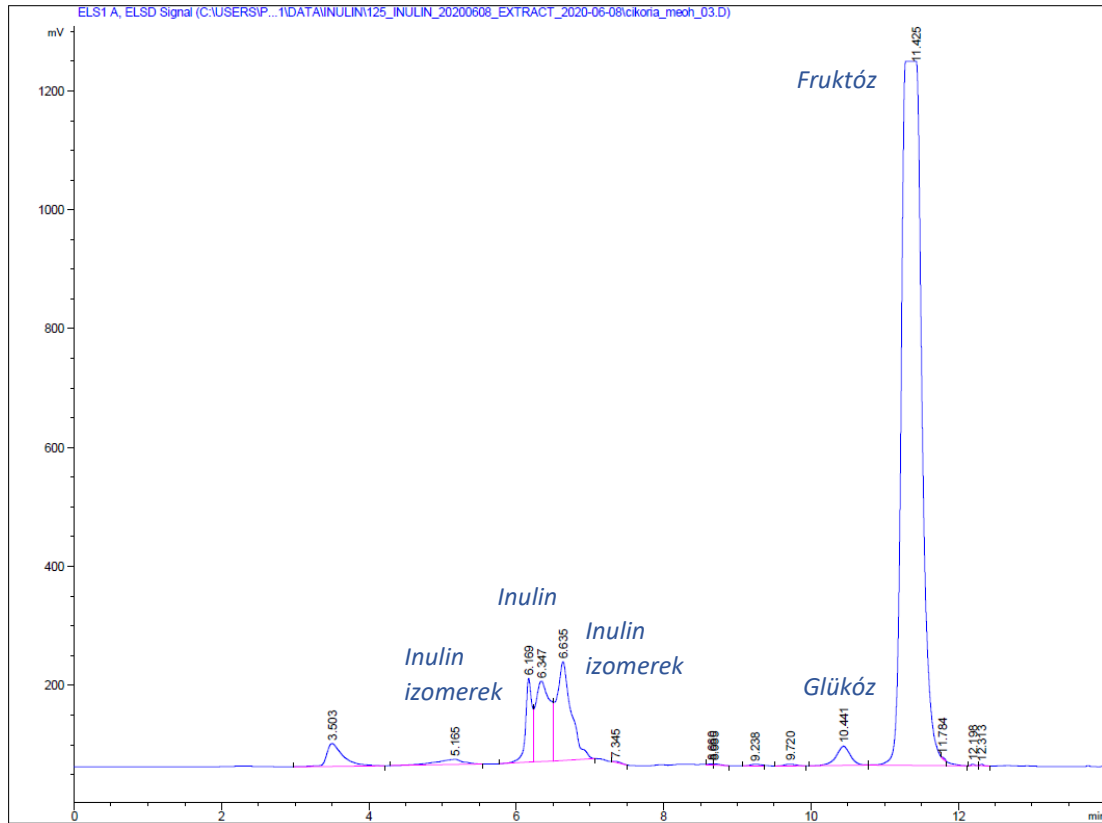
2.8. HPLC-MS módszer

Az LC-MS/MS méréseket egy Agilent 1260 Infinity II folyadékkromatográfból és egy Agilent 6420 típusú ESI ionforrással felszerelt hármass kvadrupól tömegspektrométerrel végeztük. Az elválasztásokat egy Phenomenex Kinetex EVO C18 (100x3 mm, 2,6 µm) kolonnán végeztük. A következő eluens párt használtuk: A: H₂O 10 mM ammónium-formiát, pH 10; B: tiszta acetonitril. Az analitikai oszlopot 45 °C-ra termosztáltuk, az alkalmazott térfogatáram 1,1 ml/perc, míg az injektálási térfogat egységesen 15 µl volt. Az optimált gradiens program a következők szerint alakult: 0,00-16,00 perc 2%-60% B; 16,01-20,00 perc 100% B; 20,00-21,01 perc 100%-2% B. A kromatogramokat 220, 254, 280 nm-en rögzítettük. A tömegspektrométer üzemi paraméterei a következők voltak: ESI pozitív ionizáció, szárító gáz hőmérséklete 300 °C, a nitrogén áramlási sebessége 11 l/perc, porlasztó gáz nyomása 15 psi, fragmentor feszültség 135 V, kapilláris feszültsége 4 kV, pásztázó (scan) üzemmód 100-1000 *m/z*. Az MS spektrumok és kromatogramok kiértékelésére a MassHunter Qualitative Analysis Navigator szoftvert (B.08.00) használtuk.

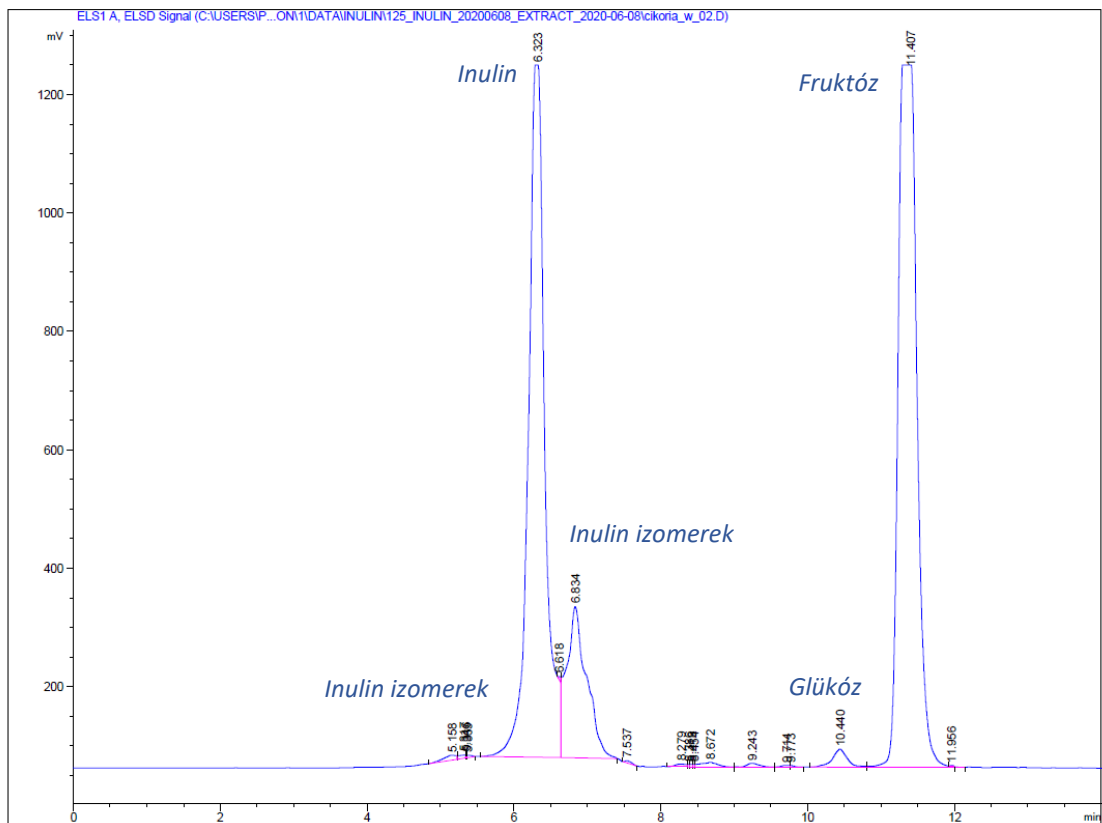
3. Eredmények



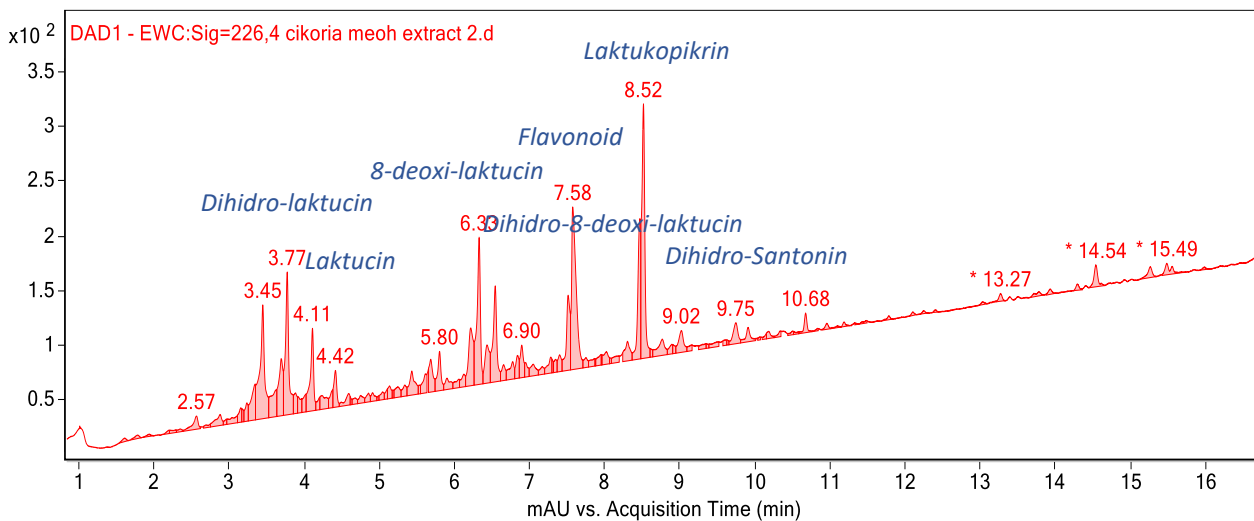
1. ábra Cukor standardek HPLC-ELSD kromatogramja. A galaktóz mintát laktóz, míg a fruktóz mintát inulin savas hidrolízisével nyertük.



2. ábra Metanolos cikória extraktum HPLC-ELSD kromatogramja.



3. ábra Vizes cikória extraktum HPLC-ELSD kromatogramja.



4. ábra Metanolos cikória extraktum HPLC UV-kromatogramja.

4.táblázat Retenciósi idő és molekulatömeg alapján, irodalmi összevetés [3,4] után azonosított egyéb komponensek a metanolos cikória extraktumban.

Retenciósi idő [perc]	[M+H] ⁺	Azonosított komponens megnevezése	Csúcsterület [%]
3,45	279, 446, ...	Dihidro-laktucin + egyéb komponensek	5,88
3,77	279	Dihidro-laktucin	5,20
4,11	277	Laktucin	3,00
6,33	261	8-deoxi-laktucin	5,45
6,54	263	Dihidro-8-deoxi-laktucin	3,88
6,90	430	Hidroxi-dihidro-laktukopikrin	1,12
7,58	500	Flavonoid származék	7,81
8,52	411	Laktukopikrin	8,33
8,87	247	Szantonin	*
9,75	249	Dihidro-szantonin	1,14
19,88	413	Dihidro-laktukopikrin	*

*UV-kromatogramon jelet nem adó, csak MS detektorral azonosított komponensek.

4. Értékelés

A forró vizes extrakció révén összesen 85,75 g mintát nyertünk ki a cikória gyökérből 20,57%-os extrakciós határfok mellett, ezzel szemben a metanolos kivonatolás csak 13,58 g és 3,19 g mintát eredményezett 4,23%, illetve 3,19%-os extrakciós hatékonyság mellett. A HPLC-ELSD vizsgálat fő komponensként inulint, izomerjeit és fruktózt, minor komponensként glükózt azonosított a vizes kivonatban. A metanolos kivonatban ezzel szemben a vizes mintához hasonló mennyiségű fruktóz és glükóz mellett csak nyomokban detektáltunk inulint. A metanolos kivonat LC-MS vizsgálata során kb. 50 db komponenst detektáltunk, amelyek közül irodalmi adatok segítségével összesen 11 db szeszkviterpén-lakton és flavonoid típusú vegyületet azonosítottunk.

5. Felhasznált irodalom

- [1] S. Petkevicius, L. E. Thomsen, K. E. Bach Knudsen, K.D.Murrell, A. Roepstroff, J. Boes, The effect of inulin on new and on patent infections of *Trichuris suis* in growing pigs, *Parasitology* (2007), 134, 121–127.
- [2] Uğur Başaran, Mohammed Akkbik, Hanife Mut, Erdem Gülümser, Medine Çopur Doğrusöz & Serhat Koçoğlu, High-Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection for the Determination of Inulin in Chicory Roots, *Analytical Letters* (2018), 51, 83-95.
- [3] Giulia Graziani, Rosalia Ferracane, Paolo Sambo, Silvia Santagata, Carlo Nicoletto, Vincenzo Fogliano, Profiling chicory sesquiterpene lactones by high resolution mass spectrometry, *Food Research International* (2015), 67, 193–198.
- [4] Federico Ferioli, Luigi Filippo D’Antuono, An update procedure for an effective and simultaneous extraction of sesquiterpene lactones and phenolics from chicory, *Food Chemistry* (2012), 135, 243–250.