



---

**Élelmiszertudományi Kar**

Doktori értekezés tézisei

**Kakukkfű és kardámmom szuperkritikus széndioxid és szubkritikus propán  
extrakciójának hatása az oleoresin kémiai összetételére, antioxidáns  
kapacitására és antimikrobás tulajdonságára**

Írta

**Hamdan Samer**

Témavezető

**Dr. Daood Hussein**  
kémiai tudományok kandidátusa

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet  
Budapest, Hungary  
2008

## 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi időben jelentős erőfeszítéseket és kutatásokat végeztek annak érdekében, hogy a természetes termékekből olyan biztonságos és hatásos kivonatokat nyerjenek, amelyek táplálkozás-tudományi, vegyipari és gyógyszerügyi szempontokból előnyösek. A kakukkfűvet és a kardámmot magot kellemes aroma profilja, valamint gyógyító, tápcsatornavédő (gastro-protective) és antibakteriális hatása miatt használják az élelmiszer és vegyi, illetve gyógyszeripari területén.

A növekvő környezetszennyezés és ezzel párhuzamosan emelkedő megbetegedések kockázata miatt jelentősen megnövekedett a biztonságos és erős antioxidatív hatású, valamint bioaktív vegyületeket tartalmazó élelmiszerek és táplálék kiegészítő termékek iránti kereslet. Világszerte, de különösen a Közel-keleti országok főzési kultúrájában nagy szerepe és hagyománya van a kakukkfűnek és a kardámmotnak. Mivel a két fűszer frissen nem hozzáférhető egész évben, ezért a kivonatuk előállítása különösen fontos jelentőséggel bír.

Egy másik nagyon fontos követelmény egészség-megőrző, környezetbarát termékek előállítása, amelyek tiszta és oldószer maradékmentes technológiával készülnek. A technológiai körülmények mellett másik fontos követelmény, hogy az élelmiszerek tulajdonságaikat, mint természetes színüket, ízüket, és eltarthatóságukat, valamint biológiailag aktív, egészség megőrző összetevőiket (pl.: antioxidánsok, vitaminok) megőrizték. Az egyik javasolt technológia erre a célra a szuperkritikus extrakció, amely főként széndioxid egyedüli alkalmazásával, vagy CO<sub>2</sub> és egyéb módosító oldószer segítségével vonja ki a szükséges olajokat, színezőanyagokat, és természetes gyantát, a fűszerekből és gyógynövényekből. A szuperkritikus és szubkritikus folyadékok fizikai-kémiai tulajdonságai alapján a kivonási folyamat többnyire 25 °C és 60 °C között zajlik, amely alapján a bomlás veszélye nélkül juthatunk hőérzékeny vegyületekhez. A széndioxid (CO<sub>2</sub>) kritikus hőmérséklete 31°C, amelyet különösképpen alkalmas közegnek találtak a hőérzékeny biológiai anyagok kivonására.

## 2.CÉLKITŰZÉSEK

A munkám fő irányvonala a szuperkritikus CO<sub>2</sub> és a szubkritikus propán extrakció körülményeinek optimalálása volt a kakukkfűből és kardámom magból származó, bioaktív vegyületekben és hatékony anyagokban gazdag oleoresin előállítása céljából. A részfeladatok a következők voltak:

1. A kakukkfű és kardámom mag esetében a szuperkritikus CO<sub>2</sub> és a szubkritikus propán extrakció körülményeinek (nyomás és hőmérséklet) optimalálása.
2. A hatékony és bioaktív komponensek meghatározása, legújabb analitikai módszerek alkalmazásával, különös tekintettel a természetes színanyagok, antioxidánsok és az illóolajok összetételére és koncentrációjára.
3. A szuperkritikus CO<sub>2</sub> extrakció körülményei hatásának vizsgálata a kakukkfű és a kardámom kivonat antioxidáns aktivitására, illetve az antioxidáns vegyületek összetételére és tartalmára.
4. Kakukkfűből és a kardámom magból különböző extrakciós módszerrel kivont oleoresin antimikrobás aktivitásának vizsgálata.

## 3.Anyagok és Módszerek

### 3.1. Szuper és szub-kritikus extrakció

Az extrakciós kísérletek átáramoltatásos nagynyomású berendezésben zajlottak, ahol 45 gramm frissen őrült kardámom maggal és kakukkfűvel töltöttem fel az extraktort. Az oldószert (CO<sub>2</sub> vagy propán) membránszivattyúval adagoltam a termosztált extraktorba. Az extraktorból távozó, az adott olajjal (extraktal) telített nagy nyomású folyadékot, fűtött túszelepen keresztül hűtött mintagyűjtő edénybe expandáltattam és 20 percig melegedni hagytam, hogy az oldószert elpárologjon belőle. A kivált extraktum mennyiségét mérlegeléssel határoztam meg. Az extraktoron áramoltatott oldószert mennyiségét a mintagyűjtő edény után kapcsolt gázórával mértem. Az etanolt, mint módosítót, a folyékony CO<sub>2</sub>-hoz 25% (w/w) arányban kevertem a palackban és egy napig állni hagytam használat előtt. A szuperkritikus CO<sub>2</sub> extrakciót 25°C-55°C-on és 80-450 bar nyomáson végeztem. A szubkritikus propán extrakciót pedig 25°C-on és 20-80 bár nyomás tartományban végeztem.

### **3.2.Kémiai analízisek**

#### ***Színanyagok HPLC vizsgálata***

A színanyagokat a kiinduló anyagokból először metanollal, azután metanol-dikloretan eleggyel vontam ki, az oleoresinekből pedig acetonnal nyertem ki. A HPLC vizsgálat körülményei a következők:

Oszlop: Chromsil C18, 6 µm (250 x 4,6 mm i.d.).

Eluens: 9:10 víz-metanol oldószerrel kezdődő és 35:55:10 acetonitril - izopropanol - metanol eleggyel végződő gradiens rendszert alkalmaztam.

Detektálás: Diódasoros detektorral 190-700 nm között történt.

Azonosítás: Spektrum felvételek és autentikus, illetve referencia (standard) anyagok alapján.

#### ***Tokoferol HPLC vizsgálata***

A kinyert lipid frakciót szappanosítottam, n-hexánnal extraháltam és normál-fázisú HPLC rendszerrel vizsgáltam, a következő körülmények között:

Oszlop: Nucleosil 100, 10 µm (240 x 4,6 mm i.d.)

Eluens: n-hexán-abszolút alkohol, 99,6:0,4

Detektálás: Fluorescens detektor Ex: 295 nm, Em: 330 nm

Áramlási sebesség: 1,2 ml/perc

Azonosítás: Referencia (Standard)  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -tokoferol használatával történt.

#### ***Zsírsavak GC vizsgálata***

Analízis előtt a glicerín-észtereket átalakítottam metil-észterekké MSZ-19929-86 és MSZ-195228-86 alapján. A GC körülmények a következők voltak:

Álló fázis: supelcowax filmmel borított borsilika oszlop

Szállító gáz: N<sub>2</sub>

Detektálás: Láng ionizációs detektor (FID)

Hőmérséklet program: 180 °C-tól 220 °C-ig (4°C/perc).

#### ***Aroma komponensek GC-MS vizsgálata***

A kvalitatív meghatározás esetében az aroma anyagokat szilárd fázisú mikro extrakcióval (SPME) állítottam elő. A kvantitatív mérések esetében az együtt extrahált aromás illóolaj GC-MS vizsgálatait dietil éterben való oldódás után, közvetlen injektálással végeztem. A GC-MS vizsgálat körülményei a következők voltak:

Oszlop: RH-5ms 30 m x 0,25 mm i.f., 0,25 µm film vastagságú

Szállító gáz: Hélium (4,8 tisztaságú)

Hőmérséklet program: 60 °C-tól 200 °C-ig, 10°C/perc növelve.

Injektálás: Split-less injektálás 260°C-on ( PARR módszer).

Azonosítás: Wiley 275 könyvtár adatai alapján.

### **3.3. Antimikrobás aktivitás**

Az antimikrobás hatást agardiffúziós módszerrel vizsgáltam. A kísérletet két gram-negatív baktériummal (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), három gram-pozitív baktériummal (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), két penészzel (*Penicillium vermiculatum*, *Aspergillus niger*) és egy élesztővel (*Kluyveromyces loddeare*) végeztem.

### **3.4. Antioxidáns hatás vizsgálata**

A gyökfogyó kapacitást trolox ekvivalens antioxidáns aktivitás (TEAC) értékben kifejezve, trolox kalibrációs görbe alapján határoztam meg DPPH szabadgyök használatával. A DPPH-t nyersanyag esetében metil alkoholban oldva, az oleoresin esetében pedig etil acetátban oldva alkalmaztam.

## **4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**

A munkám során elért eredményeket a következő pontokban foglalom össze:

1. Szuperkritikus CO<sub>2</sub> és szubkritikus propán extrakciós eljárást dolgoztam ki és az extrakció körülményeit optimalizáltam a kakukkfűből, illetve kardámmagból származó oleoresin előállítására céljából. Az eredmények arra utaltak, hogy a cseppfolyós propán extrakció kevesebb fajlagos oldószer felhasználásával nagyobb oleoresin hozamot mutat, és így a folyamat költsége alacsonyabb, mint a szuperkritikus CO<sub>2</sub> extrakcióé.
2. Megállapítottam, hogy mind a szubkritikus, illetve szuperkritikus CO<sub>2</sub> mind a cseppfolyós propán nagy mértékben aktiválja a kakukkfűben lévő karotinoid típusú színanyagok transz-cis izomerizációját és a klorofill típusú pigmentek oxidációját. A származékképzés mértéke párhuzamosan növekszik az extrakciónál alkalmazott nyomás emelkedésével. A kardámmag extrakciójánál ilyen származékképzési változást nem tapasztaltam.
3. Bizonyítottam, hogy a cseppfolyós propán hatékonyabb mint a szuperkritikus CO<sub>2</sub> a  $\beta$ -karotin, tokoferolok és az aroma anyagok kivonásában. Az etanol használata, mint módosító, a szubkritikus CO<sub>2</sub>-dal, javítja a kivonat színanyag- és tokoferol- tartalmát, de jelentősen rontja az aroma profilját.

4. Megállapítottam, hogy a szuperkritikus CO<sub>2</sub> esetén, a nyomás 100 barnál magasabb értékénél a kakukkfű oleoresinben előforduló illóolajok összetétele és tartalma jelentősen megváltozott. A timol mennyisége csökkent míg a karvakrol koncentrációja nőtt, mint domináns aromás vegyület, 200-300 bar nyomás tartományban. Ugyanakkor a kardámom mag esetében az illóolajok mennyisége nőtt az oleoresinben az alkalmazott nyomás emelkedésével.
5. A kakukkfűből és a kardámom magból kinyert olaj szabadgyök fogó aktivitása emelkedett a CO<sub>2</sub> extrakcióban alkalmazott nyomás növelésével, azonban ez nem a tokoferoloknak, hanem a zsírban oldódó színanyagoknak (klorofiloknak, karotinoidoknak és polifenoloknak) köszönhető. Pozitív korrelációt találtam az olajok antioxidáns aktivitása és azok összes fenol tartalma között.
6. Az illóolajban gazdag kivonatok alacsonyabb antioxidáns aktivitást mutatottak, mint az egyéb kivonatok. Ez arra utal, hogy az illóolajok kevesebb szerepet játszanak az összes antioxidáns aktivitásban, erős antioxidáns aktivitású vegyületek jelenlétében.
7. Mikrobiológiai vizsgálatokkal bizonyítottam, hogy mindkét gyógynövény kivonata gátlási aktivitással rendelkezik különböző mikrobák (baktériumok, élesztők, penészek) esetében, de a kakukkfű kivonatai jelentősen nagyobb antimikrobás hatást mutattak, mint a kardámom magból készített kivonatok. A szuperkritikus extrakció folyamatban az alkalmazott nyomás nem mutatott szignifikáns hatást a kivonatok antimikrobás aktivitásra.

## **5. AZ ÚJ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZÁSA**

1. Vegyipari területen: Az aromás illóolajban gazdag preparátumok a kozmetikai termékek, illetve illatszerek előállításában használhatóak. A kardámom kivonatot tartalmazó kozmetikai készítmények világszerte a kedvelt termékek közé tartoznak.
2. Gyógyszeripari területen: Mivel a kardámom mag és a kakukkfű gyógyító hatással rendelkeznek, a két gyógynövényből készült hatékony anyagokban gazdag kivonatok sokféle gyógyszer készítményben használhatják.
3. Élelmiszeripari területen: Az illóolajban és természetes antioxidánsokban gazdag kardámom és kakukkfű kivonatok az élelmiszerek, illetve táplálékkiegészítők előállításánál könnyebben és jobban adagolhatóak, mint nyers formában. A két gyógynövény kivonatát adalékként használják a sütőiparban, tejiparban, édesiparban és saláta félék készítésében.

## 6. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Illés V, **Hamdan S**, Daood H.G, Szabényi M. . (1999) Supercritical fluid extraction of oil from mixture of citrus peels and carrot. Proceedings of the 6th Meeting on Supercritical Fluids, Nottingham, UK10-13th April, 92-98

**Hamdan S**, Illés V, Daood H.G. (2000). Olajextrakció narancs és mandarinhéjból és ezek sárgarépával alkotott keverékével. *Olaj Szappan Kozmetika*, 49 (különszám), 26-32

Daood H, **Hamdan S**, Mátyás A. (2002) HPLC- módszerek a fotoszintetikus pigmentek kutatásában. Elváltás-tudományi Vándorgyűlés, 2002. okt. 16-18. Lillafüred Előadás összefoglalók E-26

Daood H, **Hamdan S**, Mátyás A. (2003). Hazai zöldségfélék bioantioxidáns tartalmának összehasonlító vizsgálata. A Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXVIII. Vándorgyűlése, Gyula., szeptember 11-13. Előadás

**Hamdan S**, Daood H.G, Illés V. (2003). Compositional changes on chlorophylls and carotenoids as a function of supercritical carbon dioxide and subcritical propane extraction of oregano leaves. Proceedings of the 6th international symposium on Supercritical Fluids TOME 1. 2003, 29-30 Aprile 2003, Versailles (France), pp. 353-358

H.G Daood, P Biacs, **S Hamdan**. (2004). High-performance liquid chromatography of carotenoids from tomato products on conventional and base-deactivated AB reversed phase column. *In: International Congress on Pigments in Food, Proceeding.* pp. 315-317

**Hamdan S**, Daood H.G, Korányi K. (2004). Az Oregano bioaktív komponenseinek korszerű analízise. Magyar Kemikusok Egyesülete, Vegyészkonferencia, 2004, június 30-július 2, Előadás

**Hamdan S.**, Daood H.G., Toth-Markus M., Illés V. (2008). Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane. *Journal of Supercritical Fluids.*, 44 25-30

**Hamdan S**, Daood G. H. (2008) Changes in the chlorophyll and carotenoid content and composition of ground thyme leaves as a function of supercritical carbon dioxide and sub-critical propane extraction. *Acta alimentaria* (accepted for publication)

Daood H. G, Korbasz M, **Hamdan S.**, Beczner J. (2008). Simultaneous LC determination of Ergosterol, Tocopherols and Carotenoids in foods. *Chromatographia* (accepted on april 08, 2008).