



Élelmiszertudományi Kar

**ANTIOXIDÁNS KAPACITÁS MEGHATÁROZÁSA
ÉS ENNEK KIALAKÍTÁSÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ
VEGYÜLETEK VIZSGÁLATA BOGYÓS GYÜMÖLCSÖK ESETÉBEN**

BALOGH EMŐKE

Doktori értekezés

Készült:

Budapesti Corvinus Egyetem

Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2010.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: *Dr. Fodor Péter*
DSc, egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezetők: *Stefanovitsné Dr. Bányai Éva*
DSc, egyetemi tanár
Alkalmazott Kémia Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

dr. Abrankó László
PhD, egyetemi adjunktus
Alkalmazott Kémia Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2010 június 8.-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Lugasi Andrea, PhD

Szentmihályi Klára, PhD

Szőllősiné Varga Ilona, CSc

Opponensek

Halász Anna, DSc

Máthé Imre, DSc

Titkár

Sárosi Szilvia, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések, jelölések jegyzéke	9
1. Bevezetés.....	11
2. Irodalmi áttekintés.....	13
2.1. Egészségügyi körkép	13
2.2. Szabadgyökök és antioxidánsok	15
2.3. Védelmi rendszerek bemutatása	19
2.3.1. Enzimes védelmi rendszerek bemutatása	19
2.3.2. Nem enzimes védelmi rendszerek bemutatása	20
2.3.2.1. C-vitamin (aszcorbinsav).....	20
2.3.2.2. E-vitamin (tokoferol)	20
2.3.2.3. Karotinoidok és az A-vitamin.....	21
2.3.2.4. Polifenolos vegyületek.....	21
2.3.2.4.1. A fenolos savak és a flavonoidok bioszintézise.....	23
2.3.2.4.2. A flavonoidok kémiai-biokémiai tulajdonságai.....	23
2.3.2.4.3. A flavonoidok felszívódása	25
2.3.2.4.4. Flavonoidmintázat	26
2.3.2.5. Ásványi anyagok.....	26
2.4. A bogyós gyümölcsök jelentősége	27
2.4.1. A szamóca jelentősége, élettani hatása	28
2.4.2. A málna jelentősége, élettani hatása	29
2.4.3. A ribiszke jelentősége, élettani hatása	29
2.5. A legelterjedtebben alkalmazott antioxidáns kapacitást mérő módszerek elvei, előnyei és hátrányai	30
2.5.1. Hidrogénatom átvitelen alapuló, antioxidáns kapacitást mérő módszerek.....	32
2.5.1.1. Oxigéngyök Abszorpciós kapacitás -ORAC- Oxygen Radical Absorbance Capacity	32
2.5.1.2. Összes peroxilgyök befogására vonatkozó paraméter-TRAP-Total peroxil Radical Trapping Parameter	34
2.5.1.3. Kemilumineszcencián alapuló módszerek-CL-Chemiluminescence.....	34
2.5.1.4. Krocín elszíntelenedésén alapuló módszer	35
2.5.1.5. Béta-karotin elszíntelenedésén alapuló módszer	36
2.5.1.6. Fotokemilumineszcencián alapuló antioxidáns kapacitás mérés-PCL- Photochemiluminescence	36

2.5.2. Elektronátmeneten alapuló antioxidáns kapacitást mérő módszerek bemutatása	37
2.5.2.1. Vasredukálóképességén alapuló módszer-FRAP-Ferric Reducing Ability of Plasma	37
2.5.2.2. Összes polifenol meghatározás Folin-Ciocalteu reagenssel-TPC-Total Polyphenol Content.....	38
2.5.2.3. Rézion redukálóképességén alapuló antioxidáns kapacitás mérés -CUPRAC- CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity	38
2.5.2.4. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás -TEAC –Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.....	39
2.5.2.5. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés.....	40
3. Célkitűzések	47
4. Anyagok és módszerek.....	49
4.1. Kísérletek, mérések helye	49
4.2. Növényanyag	49
4.3. Felhasznált vegyszerek, reagensek	50
4.4. A mérések során használt készülékek.....	50
4.5. Mintaelőkészítések és vizsgálati módszerek.....	50
4.5.1. Szárazanyagtartalom meghatározás	51
4.5.2. Mintaelőkészítések és összanatioxidáns kapacitás meghatározása	51
4.5.2.1. Hidrogén atom átvitelen alapuló (HAT) módszerek.....	51
4.5.2.1.1. Víz- és zsírolldható antioxidáns kapacitás meghatározása fotokemilumineszcencia elvén	51
4.5.2.1.2. Összantioxidáns kapacitás meghatározása kemilumineszcencia elvén	53
4.5.2.2. Elektron átvitelen alapuló (ET) módszerek	54
4.5.2.2.1. Összantioxidáns kapacitás FRAP módszerrel.....	54
4.5.2.2.2. Összpolifenol tartalom – TPC módszer	54
4.5.2.2.3. TEAC módszer	54
4.5.2.2.4. DPPH megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás módszer	54
4.5.3. Összantocianin tartalom.....	55
4.5.4. C-vitamin-tartalom meghatározása kromatográfiás módszerrel.....	55
4.5.5. Fenolos savak, katechin és epikatechin mennyiségi meghatározása	56
4.5.6. Flavonoid mono- és diglikozidok meghatározása	56
4.5.7. Statisztikai elemzések	58

5. Eredmények és értékelésük	59
5.1. A Photochem készülék tesztelése	59
5.1.1. ACW mérések.....	61
5.1.1.1. Vízoldható antioxidáns kapacitás meghatározása aszkorbinsav esetén.....	61
5.1.1.2. Vízoldható antioxidáns kapacitás meghatározása galluszsav esetén.....	64
5.1.1.3. Vízoldható antioxidáns kapacitás meghatározása citromsav esetén.....	65
5.1.2. ACL mérések	66
5.1.2.1. Zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározása aszkorbinsav esetén	66
5.1.2.2. Zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározása citromsav esetén	69
5.1.2.3. Zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározása trolox esetén	70
5.1.3. A műszerrel és a mérésekkel kapcsolatos megállapítások.....	71
5.2. A bogyós gyümölcsökkel kapcsolatos eredmények	74
5.2.1. A gyümölcsök szárazanyagtartalma	74
5.2.2. Az antioxidáns kapacitás vizsgálatok eredményei.....	75
5.2.2.1. A hidrogénatom átvitelén alapuló (HAT) módszerek eredményei.....	75
5.2.2.2. Az elektronátmenettel járó (ET) módszerek eredményei	79
5.2.3. Az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata.....	87
5.2.3.1. Az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó vegyületek mennyiségi meghatározása.....	87
5.2.3.2. Az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó vegyületek minőségi meghatározása.....	105
6. Új tudományos eredmények.....	119
7. Összefoglalás.....	121
8. Summary	125
9. Irodalomjegyzék.....	129
10. Mellékletek.....	141
Köszönetnyilvánítás	149

RÖVIDÍTÉSEK, JELÖLÉSEK JEGYZÉKE

AAPH	2,2'-azo-bis(2-amidinopropán) dihidroklorid
ABAP	2,2'-azobis-2-amidinopropán
ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav
ACL	Lipid soluble Antioxidant Capacity, zsírolható antioxidáns kapacitás
ACW	Water soluble Antioxidant Capacity, vízoldható antioxidáns kapacitás
AH	Antioxidáns
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization, légköri nyomáson történő kémiai ionizáció
CL	Kemilumineszcencián alapuló antioxidáns kapacitás mérés
CPS	Counts Per Second, beütésszám másodpercenként
CUPRAC	CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity, a rézion redukálásán alapuló antioxidáns kapacitás mérési módszer
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás
ET	Elektron átmeneten alapuló antioxidáns kapacitás
EPI	Enhanced Product Ion, Kiválasztott termékion
ESI	Electrospray Ionisation, elektroporlasztásos ionizáció
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma, a plazma vas redukálóképességén alapuló antioxidáns kapacitás
GC	Gas Chromatography, Gázkromatográfia
HAT	Hidrogénatom átmeneten alapuló antioxidáns kapacitás
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
MRM	Multiple Reaction Monitoring, több kiválasztott termékion figyelése
MS/MS	Tandem tömegspektrometria
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Mágneses magrezonancia
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity, oxigén gyök absorbanca kapacitás
PCA	Principal Component Analysis, Főkomponens Analízis
PCL	Photochemiluminescence, fotokemilumineszcencián alapuló antioxidáns kapacitás
RLU	Relative Light Unit, vonatkoztatott fény kibocsátási egység
ROO [•]	Peroxil gyök
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxil sav, az E vitamin vízoldható formája
TPC	Összpolifenol meghatározás Folin-Ciocalteu reagenssel
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazin
TRAP	Total peroxil Radical Trapping Parameter-összes peroxilgyök befogására vonatkozó Paraméter
TRSC	Total Radical Scavenger Capacity, Összgyökfogó Kapacitás

1. BEVEZETÉS

Hazánk lakosságának túlnyomó része a szabadgyökökkel összefüggésbe hozható betegségek (civilizációs betegségek, elhízás, 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 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, 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 köszönhetőn a betegségek megelőzéséhez is döntő mértékben hozzájárulhatnak.

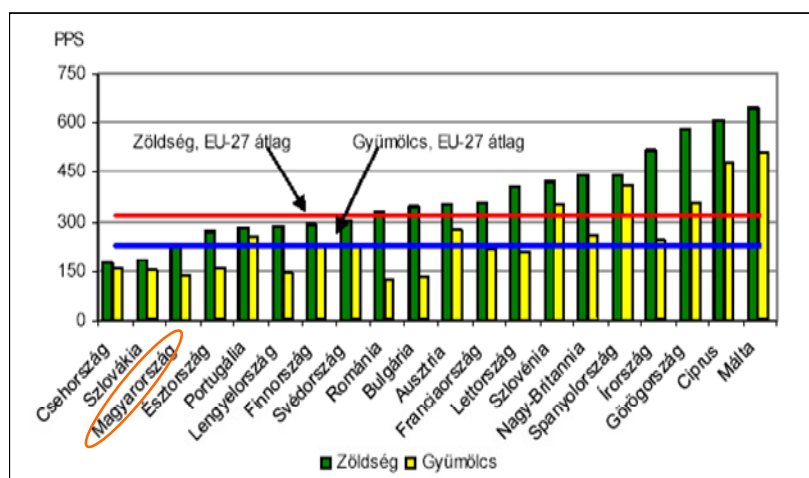
Már az őskorban is szívesen fogyasztott bogyós gyümölcsöknek különösen fontos szerepük van a szabadgyökök káros hatásaival szembeni küzdelemben, ugyanis rendkívül nagy az antioxidáns hatásuk a bennük előforduló nagy vitamin- és flavonoidtartalom miatt. Miután az utóbbi időben az orvoslásban jelentős 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 főszereplőivé váltak, mivel a daganatos megbetegedések, valamint a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében és utókezelésében is elengedhetetlenül fontosak.

Az eddigiek alapján fontos és indokolt is, hogy a Magyarországon termesztett bogyós gyümölcsök antioxidáns jellemzőit vizsgáljuk, valamint az antioxidáns kapacitásuk kialakításában döntő szerepet játszó komponenseiket mind minőségileg, mind mennyiségileg megismerjük.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Egészségügyi körkép

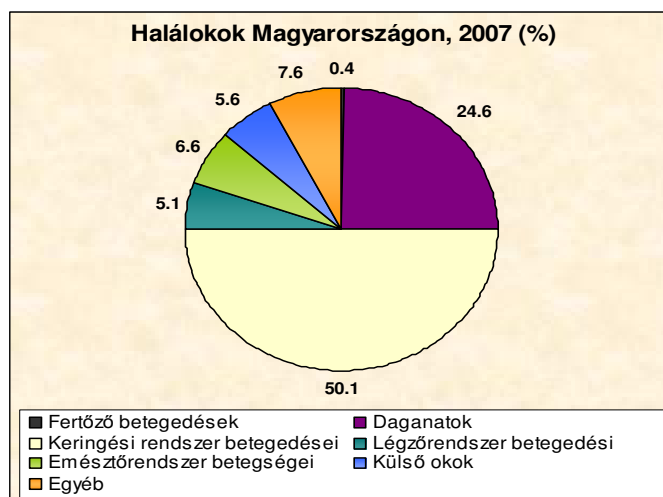
Korunk egészségtudatos, de „laikus” fogyasztójának nincsen egyszerű dolga, ha a rendelkezésre álló információáradatból (internet, fórumok, rádió, televízió, szakkönyvek, szaklapok, magazinok, médiában szereplők-, felkapott hírességek életmód-, táplálkozás-, vagy a fogyókúra tanácsai, ajánlásai stb.) ki akarja szűrni a szakszerű, tudományosan bizonyított adatokat. Nem könnyíti meg a fogyasztók eligazodását, illetve döntését a soha nem látott bőséges élelmiszerkínálat, a gyártók „újabbnál újabb” termékei és reklámfogásai. Népszerű lett az étrend-kiegészítők szedése/fogyasztása, amely esetében a legnagyobb problémát a túladagolás jelenti, valamint az egyéb szerekkel-gyógyszerekkel való, akár még nem is ismert kölcsönhatásuk és mellékhatásuk (Halliwell, 2007; Cornetti, 2009). Szerencsésebb lenne természetes forrásból, elsősorban zöldségek gyümölcsök fogyasztásával hozzájutni a nélkülözhetetlen antioxidánsokhoz, vitaminokhoz, provitaminokhoz, polifenolos vegyületekhez stb., hiszen mindezeket a természetben előforduló formában és megfelelő arányban tartalmazzák. A Központi Statisztikai Hivatal felméréséből kiderül (KSH, 2007), hogy a többi tagállamhoz képest (1. ábra) kevesebbet költünk zöldség és gyümölcs vásárlására. A sorban Magyarország hátulról a harmadik helyen áll, és nálunk csak a csehek és a szlovákok ráfordításai kisebbek. A sorrendben elsőként szerepelnek azok a tagállamok, ahol a mediterrán diétának köszönhetően nem meglepő módon kisebb a kialakulási kockázata az ún. civilizációs betegségeknek, mint a szív- és érrendszeri, vagy rosszindulatú daganatos megbetegedések (Trichopoulou és mtsai., 2003; Estruch és mtsai., 2006).



1.ábra. Az Európai Unió tagállamai magánháztartásaiban a zöldségre és gyümölcsre fordított kiadások alakulása 2005-ben (pps, vásárlóerő egység) (KSH, 2007)

Hazánkban évek óta nő azoknak a betegeknek a száma, akik korunk rohamosan terjedő, nem fertőző betegségeiben szenvednek, mint a II-s típusú diabetes, a magas vérnyomás szövődményeiként kialakuló agyi és érrendszeri betegségek, a daganatos megbetegedések, a csontritkulás stb. Ennek eredménye, hogy a halálozás, valamint a megbetegedések alapján Magyarország az elsők között áll a tagállamok között (KSH, 2009a).

Mindezek kialakulásában szerepet játszik a helytelen életmód, a túlzott só- és kalóriabevitel, a környezetszennyezés, a mozgás hiánya, a stressz (szociális, munkahelyi stb.) (Ghiselli és mtsai., 2000; Wu és mtsai., 2004). A stressz levezetése gyakran együtt jár az önmagában is káros dohányzással, az alkoholfogyasztással, de sokszor a mértéktelen evéssel, édességfogyasztással is. Az adatok kedvezőtlen alakulásához hozzá tartozik az is, hogy a különböző szűrővizsgálatok látogatottsága nem megfelelő, az egészségügyi ellátás minősége a törekvések ellenére erősen kifogásolható, a lakosság a megelőzésre még nem igazán fektet kellő hangsúlyt. Hazánkban a 2008-as évet tekintve a születéskor várható átlagos élettartam a nőknél 78, a férfiaknál 70 év volt. Ezen adatok még mindig jelentősen (5-6 évvel) elmaradnak a nyugati országokétól (KSH, 2009a). A halálozások feléért a szív-, és érrendszeri megbetegedések, a negyedéért, pedig a különböző daganatos betegségek felelősek (**2. ábra**). Ezek az összes halálozás közel 75%-át teszik ki.



2. ábra. A legfőbb halálokok Magyarországon 2007-ben (KSH, 2007)

Európában is ezek a nem fertőző, rohamosan terjedő betegségek az elsődleges halálokok (WHO, 2004), amelyek megelőzéséért mi magunk is tehetünk valamit, hiszen kialakulási kockázatukat kiegyensúlyozott étrenddel, antioxidánsokban és vitaminokban gazdag zöldség és gyümölcs fogyasztással, valamint megfelelő testmozgással csökkenteni tudjuk (Block és mtsai., 1992; Liu és mtsai., 2000; Hung és mtsai., 2004). Tudományos vizsgálatok sorozata igazolta, hogy a fent említett betegségek és egyéb megbetegedések (mint az Alzheimer, Parkinson kór)

háttérben is bizonyítottan szabadgyökös reakciók húzódnak meg (Hollman és Katan, 1999b; Rice-Evans, 2001; Garcia-Lafuente és mtsai., 2009).

A fent említett betegségek kialakulásához vezető szabadgyökös reakciókat az antioxidánsok gátolni, vagy késleltetni tudják, így ezen kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően számos kutatási munka és tanulmány főszereplőivé váltak. A következő fejezetben a szabadgyökökkel, valamint az antioxidánsokkal kapcsolatos ismeretek rövid áttekintését szeretném adni, részletesebben kitérve a kutatás fő vonalát képező tényezőkre.

2.2. Szabadgyökök és antioxidánsok

A sejtekben természetes körülmények között lejátszódó biokémiai folyamatok, jellemzően az oxidációs folyamatok során keletkeznek szabadgyökök, amelyek egy bizonyos részének fontos szerepe van a szervezet normális működésének fenntartásában, többek között a sejtciklus szabályozásában, a sejt metabolikus folyamataiban, illetve a szervezet védekező mechanizmusában (Davies, 2000). A szabadgyökök olyan reaktív oxigén-, nitrogén-, kén- vagy szénközpontú molekulák, illetve molekularészletek, amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, ezért rendkívül agresszívak és rövid életidejűek, hiszen nagyon gyorsan kémiai reakcióba lépnek más vegyületekkel elektronszerzés céljából (Cadenas, 1989). A legfontosabb szabadgyökök, illetve reaktív formák a következő táblázatban kerülnek bemutatásra (1. táblázat).

1. táblázat. A legjelentősebb szabadgyökök és reaktív formák (Cornetti, 2009 nyomán)

Oxigén	O ₂	Klór	Cl ₂
Szinglet oxigén	O [•]	Atomos klór	Cl [•]
Ózon	O ₃	Hipokórossav	HOCl
Szuperoxid gyök	O ₂ ^{•-}	Szerves peroxidok	ROOH
Hidrogénperoxid	H ₂ O ₂	Nitrogénmonoxid	NO [•]
Hidroxil gyök	OH [•]	Salétromossav	HNO ₂
Peroxil gyök	RO ₂ [•]	Peroxinitrit	ONOO ⁻
Alkoxil gyök	RO [•]	Peroxinitrites sav	ONOOH

A szabadgyökök képződése a normális anyagcsere folyamatokhoz, így a terminális oxidációhoz köthető, másrészt a szervezetben lejátszódó biokémiai reakciók következményei:

- Haber-Weiss-reakció: $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{\bullet} + HO^{\bullet}$
- Fenton-reakció: $Me^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Me^{3+} + OH^{\bullet} + HO^{\bullet}$

A szabadgyökök külső és belső tényezők, biotikus és abiotikus stresszhatások következményeiként is indukálódhatnak (Benzie, 2000).

Sejten belüli források lehetnek a hemoglobin, riboflavin, flavoproteinek, mono-oxidázok, átmeneti fémionok. Külső tényezők (Toporcov és mtsai., 2004) közül megemlíthető többek között:

- az ultraibolya és radioaktív sugárzás,
- a dohányfüst, szmog,
- a túlzott alkoholfogyasztás,
- a stressz (munkahelyi, szociális stb.),
- a vegyi anyagok,
- környezetszennyezés,
- toxinok

A keletkező szabadgyökök a lipideket alkotó zsírsavmolekulákat, a szénhidrátokat, fehérjéket és nukleinsavakat is károsíthatják, gyökös mechanizmusú láncreakcióval. A lipidek károsodása a lipidperoxidáció, amely során elsősorban hidroperoxidok keletkeznek, amelyek agresszívan támadják meg az egyéb molekulákat, mint az enzimeket, fehérjéket és aminosavakat stb. (Cadenas, 1989; Djuric és mtsai., 1998; Heinonen és mtsai., 1998). Következésképpen a membránok kilyukadhatnak, felszakadhatnak, ami a destruktív lizoszómás enzimek kiszabadulását eredményezheti, így a szövet károsodhat (Lugasi és Blázovics, 2004). A lipidperoxidáció következtében esszenciális zsírsavhiány alakul ki, amely károsítja a membránok (elsősorban a mitokondrium, lizoszóma, plazmamembrán) finom szerkezetét, funkcióját, zavart okozhatnak a sejtek közötti kommunikációban, végső esetben a sejtek nekrotikus pusztulásához vezethetnek.

Szabadgyökös reakciók felelősek számos élelmiszer romlásáért is. Ezek közül a legismertebb a zsírok avasodása, amely kellemetlen íz-, szín- és szagváltozással jár. A különböző kémiai reakciók következtében káros komponensek (ketonok, aldehidek) is keletkezhetnek, valamint a vitaminok és egyéb biomolekulák szerkezete is megváltozhat.

A szabadgyökök okozta károsodásokkal szemben összetett, integrált védelmi rendszer biztosítja a sejtalkotó molekulák védelmét (Benzie, 2000). Az antioxidánsok olyan molekulák, amelyek csekély mennyiségben vannak jelen az oxidálandó szubsztráthoz képest, és jelentős mértékben csökkenteni, vagy akár gátolni is képesek annak oxidációját (Halliwell és Gutteridge, 1995). A legfőbb antioxidáns komponenseket a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. Az emberi szervezetben az antioxidáns védelmi rendszer részeként működő legfontosabb komponensek (Cornetti, 2009).

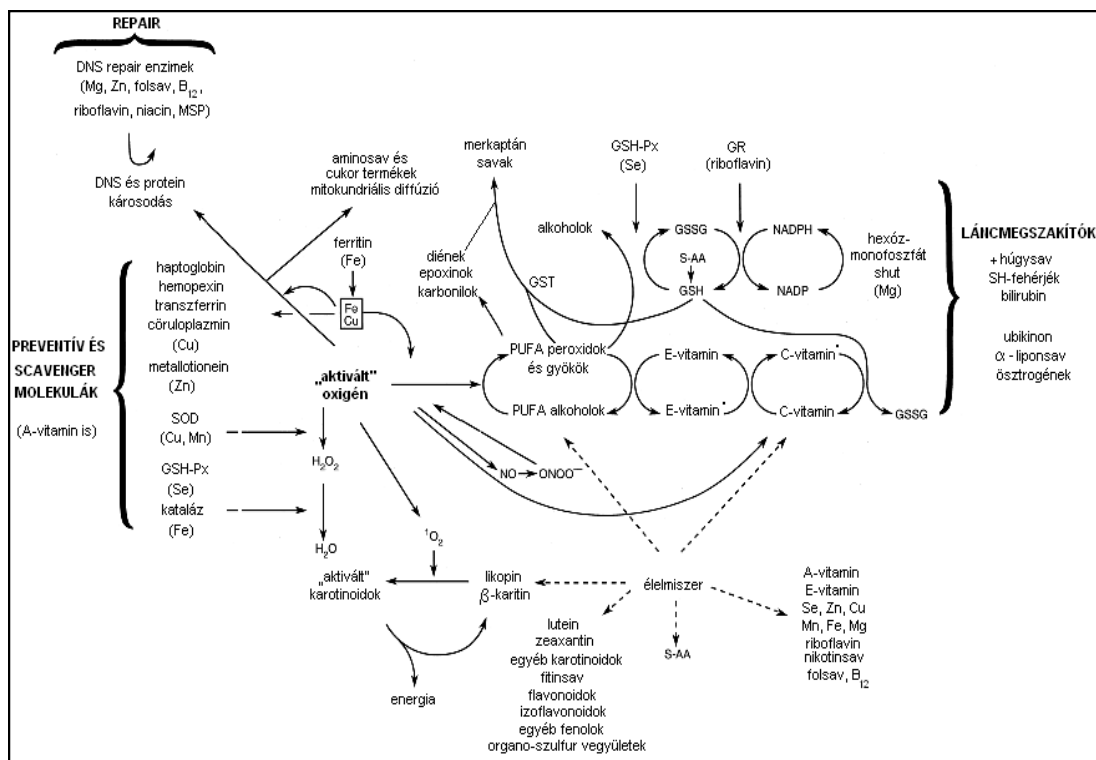
funkció/szerkezet	példa
vitaminok	E-vitamin, C-vitamin, A-vitamin, riboflavin, niacin, nikotinamid
zsírok	ω -3, ω -6 zsírsavak
aminosavak, tiolok	hisztidin, glicin, glutamin, cisztein, taurin, N-acetil-cisztein,
proteinek enzimek	albumin, transferrin, kataláz, peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz
növényi metabolitok	polifenolok: flavonoidok, karotinoidok: β -karotin, likopin, lutein
ásványi anyagok	cink, vas, réz, szelén
anyagcseretermékek	húgysav, liponsav

Az antioxidánsok lehetnek lipofilek (E-vitamin, β -karotin, A-vitamin), hidrofilek (C-vitamin, aminosavak, polifenolok), citoszol antioxidánsok (Q10 koenzim), valamint szerkezeti antioxidánsok (nyomelemek, szelén, cink, aminosavak, szelenocisztein) (Cornetti, 2009).

Emellett létezik olyan csoportosítás is, miszerint az antioxidánsok vagy láncreakciót megszakító (elsődleges), mint például a C-vitamin, a húgysav, vagy védő (másodlagos) antioxidánsok lehetnek, mint a transferrin vagy a polifenolos vegyületek (Apak és mtsai., 2007). A védőhatásukat a fémion kelátorok például a Fenton-reakció gátlásával fejtik ki, amely végeredményként a rendkívül agresszív hidroxilgyök keletkezne (Apak és mtsai., 2007). Az antioxidánsok az ilyen típusú reakciókat gátolva, közvetetten a gyökök kialakulását gátolják, vagy magukat a gyököket képesek megkötni. Meg kell jegyezni, hogy a gyök befogására való képesség az antioxidáns koncentrációjával, valamint a reakciókészségével is szoros összefüggésben van (Cornetti, 2009).

A rendszer egyes elemeit maga a szervezet is elő tudja állítani, ilyenek az enzimek, a kismolekulájú vegyületek nagy része (enzimatis rendszer elemei), azonban számos molekulát nem tudunk szintetizálni, úgymint az aszkorbinsavat, a karotinoidokat, a tokoferolokat, a flavonoidokat (nem enzimatis rendszer elemei). Ezekhez csakis külső forrásból, a táplálkozás útján juthatunk hozzá (Vertuani és mtsai., 2004).

Az emberi szervezetben az antioxidánsok szinergens, egymást erősítő, regeneráló hatással rendelkeznek (**3. ábra**), így az antioxidánsok együtt jóval hatékonyabbak a szabadgyökökkel szemben, mint külön-külön (Chaudiere és Ferrari-Iliou, 1999; Benzie, 2000; Vertuani és mtsai., 2004).

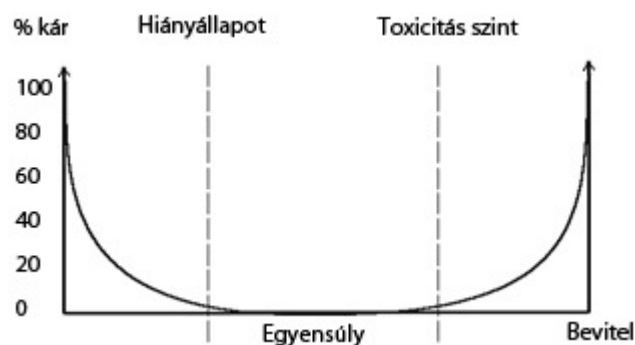


3. ábra. Az antioxidánsok szinergens hatása (Benzie, 2000)

Az egyik legalapvetőbb példa, hogy a glutation regenerálja az aszkorbátot, és az aszkorbát regeneálja az α -tokoferolt. Mindezek miatt a teljes antioxidáns kapacitás jóval hasznosabb és reálisabb információt ad, mint az egyes antioxidánsok koncentrációja a mintában, illetve az antioxidáns kapacitásuk külön-külön (Ghiselli és mtsai., 2000).

A nem jól, vagy a nem megfelelő dózisban alkalmazott antioxidánsokat tartalmazó étrend-kiegészítők szedésénél is számolni kell a prooxidáció kialakulásával és károsító hatásával. A szervezetbe való túlzott bevitelük esetén az antioxidánsok maguk is prooxidánsokká válhatnak és hasonlóan a szabadgyökökhöz a szervezet károsodásához vezethetnek (Cao és mtsai., 1997; Vertuani és mtsai., 2004).

A Cornetti által (2009) szerkesztett tápanyag diagram összefüggései (4. ábra) a táplálék összetevőire, így az antioxidánsokra is igazak, vagyis a táplálékkal bevitt komponensek mennyisége közvetlen vagy közvetett módon hatással van a szervezet megfelelő működésére. Ha a védelemhez szükséges mennyiséget a napi bevittel nem tudjuk fedezni, az adott komponensből hiány alakulhat ki, következményeként működési és szabályozási zavarok léphetnek fel, de hasonlóképpen problémát jelenthet a túlzott mennyiség bevitel is.



4. ábra. Tápanyag diagram (Cornetti, 2009 nyomán)

Az előbb említettek alapján mindkét eset súlyos következményekkel járhat, ezért fontos megtalálni az egyensúlyt, és ügyelni arra, hogy étrend-kiegészítők, multivitaminok szedésével és ásványvízfogyasztással stb. a szervezet normál egyensúlyát ne zavarjuk meg.

2.3. A védelmi rendszerek rövid bemutatása

2.3.1. Enzimes védelmi rendszer

A szervezetben számos enzim járul hozzá a normális anyagcsere útján is keletkező szabadgyökök semlegesítéséhez, vagy kevésbé káros molekulává való átalakításukhoz (Valko és mtsai., 2006). A legfontosabb enzimek és reakcióik a **3. táblázat**ban kerültek összefoglalásra:

3. táblázat. Az enzimes védelmi rendszer legfontosabb enzimreakciói (Boots és mtsai., 2008)

Enzimek	Reakciók
Szuperoxid-dizmutáz (SOD)	$2\text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Kataláz	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
Glutátion-peroxidáz (GSHpx)	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$
	$2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$

Ezek mellett azonban fontos feladata van azoknak az enzimeknek is, amelyek a káros végtermékeket bontják, például az alkoholokat, aldehideket, alkánokat. Végül kiemelkedő a DNS és egyéb, már károsodott molekulák „kijavítását” rekonstrukcióját végző (ún. repair) enzimrendszerek (DNS-javító enzimek, aldózreduktázok, aldehydreduktázok stb.) szerepe is (Valko és mtsai., 2006).

2.3.2. Nem enzimatisz védelemi rendszerek

Ebbe a csoportba sorolhatók a kis molekulatömegű vegyületek, úgymint a flavonoidok (kvercetin, miricetin), a vitaminok (A-, C-, E-, K-vitamin), a karotinoidok, a tioltartalmú vegyületek (cisztein, metionin), nyomelemek (vas, cink, szelén) stb. (Valko és mtsai., 2006). Ezt a területet részletesebben mutatom be, hiszen a doktori munkám során is a nem enzimatisz védelemi rendszer néhány elemével, azok hatásaival, méréseivel foglalkozom.

2.3.2.1. C-vitamin (aszkorbinsav)

A C-vitamint csupán néhány állatfaj és az ember nem képes szintetizálni, ezért alapvető fontosságú, hogy a táplálékból pótoljuk hiányát. A C-vitamin hazai vonatkozása kapcsán feltétlenül meg kell említeni Szent-Györgyi Albert nevét, akinek nagyobb mennyiségben először a paprikából sikerült izolálni a kezdetben még hexauronsavnak nevezett vitamint (Svirebely és Szent-Györgyi, 1932). Munkásságát 1937-ben orvosi és élettani Nobel-díjjal ismerték el.

Elsőrendű antioxidánsként hat, megóvjaa a sejtmembránokat a szabadgyökök káros hatásaitól (Kalt és mtsai., 1999; Valko és mtsai., 2006; Li és Schellhorn, 2007). Semlegesíteni tudja például a szuperoxid-, a hidroperoxid-, a hidroxil, az NO és az NO₂ gyököket, valamint a szinglet oxigént (Brown és Jones, 1996). A dohányzás, a műtéti beavatkozások, a környezeti stresszhatások, egyes gyógyszerek növelik a bevitel szükségességét (Cameron és Pauling, 1976).

2.3.2.2. E-vitamin (tokoferol)

Az E-vitamint Evans és Bishop amerikai kutatók fedezték fel 1922-ben. Jelentése „gyermekszületést elősegítő”. A nyolc különböző tokoferolból az első négynek (alfa, béta, gamma, delta), de különösen az alfa tokoferolnak van gyakorlati jelentősége. Az E-vitamin az egyik legkiválóbb zsíroldekony antioxidáns, a szív-érrendszeri és a daganatos megbetegedések megelőzésében, gyógyításában elengedhetetlen (Sigounas és mtsai., 1997; Pryor, 2000). Elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavakat, membránlipideket védi meg az oxidációtól (Pryor, 2000; Jiang és mtsai., 2001). Sejtszinten fejti ki a hatását, ezért az öregedés lassításában is szerepet játszik. Az E-vitamin *in vitro* körülmények között gátolja mind a prosztata-, mind a mellrákos sejtek növekedését (Sigounas és mtsai., 1997). Más antioxidánsokkal, különösen a C-vitaminnal együtt gátolják az érlelmeszesedés kialakulását és csökkentik számos megbetegedés kockázatát (Lee és mtsai., 2006; Cook és mtsai., 2007). Alkalmas a Parkinson-kór kezelésére és lassítja az Alzheimer-kór lefolyását (Klipstein-Grobush és mtsai., 1999).

2.3.2.3. Karotinoidok és az A-vitamin

A karotinoidok az A vitamin provitaminjaiként ismertek, amelyek közül a természetben leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben a béta-karotin található meg (Mortensen és mtsai., 2001). Elsőrendű antioxidánsként hatástalanítani képes az UV-sugárzás hatására keletkezett szabadgyököket (Lee és mtsai., 2006), így elősegíti a bőrünk védelmét a nap sugaraival szemben (Bíró és Lindner, 1999; Prior és mtsai., 2004). Az A vitamin nélkülözhetetlen a látóbíbor felépítésében, az immunrendszer megfelelő működésében valamint a szabadgyökökkel szembeni védekezésben. Mivel a túlzott A-vitamin bevitel súlyos toxikus tüneteket okoz, ezért a karotinoidokat (provitamin) tartalmazó növények fogyasztása ajánlott (Semba, 1994).

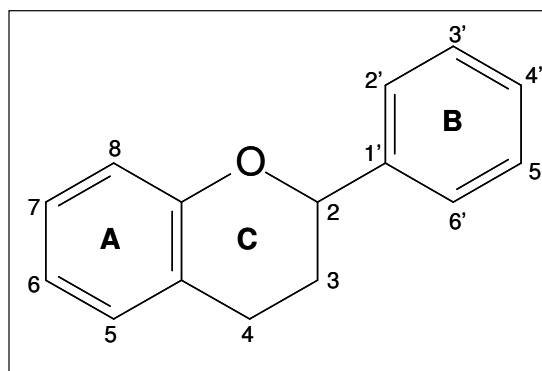
2.3.2.4. Polifenolos vegyületek

Ez idáig több, mint 8000 természetes polifenolos vegyületet azonosítottak növények gyökeréből, leveléből, virágszirmából, terméséből (Havsteen, 2002). Ez a nagy szám a szerkezetükből adódó sokféleségnek köszönhető (hidroxilcsoportok száma, helyzete, kapcsolódó komponensek stb.). Legfontosabbak ezen belül a *fenolos savak*, a *flavonoidok*, a *sztilbén* és *lignánok* (**I. melléklet**).

Szerepükről, szerkezetükről, metabolizmusukról, az emberi szervezetre gyakorolt hatásukról számos összefoglaló tanulmány jelent meg (Hollman és Katan, 1999a; Harborne és Williams, 2000; Hollman és Arts, 2000; Lugasi, 2000; Pietta, 2000; Mojzis és mtsai., 2008; Yang és mtsai., 2008). A következőkben azon polifenolos vegyületek kerülnek csak részletesebb bemutatásra, amelyek doktori munkámhoz szorosan kapcsolódnak.

A főként szabad formában előforduló *fenolos savakon* belül a *hidroxi-fahéjsav származékok* (kumársav, kávéssav, ferulasav stb.) sokkal elterjedtebbek, mint a másik nagy csoport, a *hidroxi-benzoésav származékok* (protokatechin sav, galluszsav stb.) (Mojzis és mtsai., 2008). Ezek mennyisége a kertészeti növényekben meglehetősen kicsi, ami alól a bogyós gyümölcsök, a fekete retek és a hagyma a kivétel. A galluszsav nagy mennyiségben található meg teákban (Manach és mtsai., 2004). A hidroxifahéjsav-származékok közül a kávéssav a legtöbb gyümölcsben jelentős mennyiségben fordul elő, érés alatt mennyisége csökken (Manach és mtsai., 2004). A ferulasav inkább a gabonafélékre jellemző, amelyek esetében az összes polifenol tartalom csaknem 90%-t adja (Lempereur és mtsai., 1997; Zhao és Moghadasian, 2008).

A flavonoidok olyan másodlagos növényi anyagcseretermékek, amelyek hidroxilcsoportokat tartalmazó fenilkromon- és fenil-4-kromanon-származékok (Robards és Antolovich, 1997). Nevüket sárga színükről kapták (latinul a sárga flavus). Szerkezetük a szénatomok száma alapján C6-C3-C6 képlettel (**5. ábra**) írható fel (Manach és mtsai., 2004).



5. ábra. A flavonoid alapváz

A flavonoidokon belül számos osztályt lehet elkülöníteni (**II. melléklet**). A katechintól eltekintve a flavonoidok általában glikozidként fordulnak elő (aglikon alapváz + szénhidrát) (Hollman és Arts, 2000). A cukor komponensek közül a legelterjedtebb a D-glükóz, de az arabinóz, galaktóz, glükoramnóz, lignin, L-rhamnóz és a xilóz is gyakori. A 3-O-glükozid-rhamnóz más néven a quercitrin, illetve a glükoramnóz más néven a rutin (Robards és Antolovich, 1997). A flavonoidok elsősorban a zöltségek gyümölcsök külső rétegeiben találhatók meg nagyobb mennyiségben (Lugasi és Blázovics, 2004), koncentrációjuk a központi rész felé haladva jelentősen csökken (Aherne és O'Brien, 2002). Ez alól kivétel a hagyma, ahol a föld alatti növényi rész is igen gazdag flavonoidokban.

A flavonoid vegyületeken belül különösen fontosak az antocianidinek, amelyek az antociánok aglikonjai. Ez idáig több mint 500 antocianint tartanak számon (Castaneda-Ovando és mtsai., 2009). A magasabb rendű növényekben az antocianidineken belül, különösen a cianidin (50%), a delphinidin (12%), a malvidin (12%), a pelargonidin (12%), valamint a peonidin (7%) és a petunidin (7%) fordulnak elő (Castaneda-Ovando és mtsai., 2009). Ezen vegyületeknek köszönhetik a sötét, vöröses-kékes színüket a bogyós gyümölcsök (fekete és piros ribiszke, málna, áfonya stb.) a bordó színét a cékla, a meggy, vagy a mélylila színét a padlizsán (Slimestad és Solheim, 2002; Pantelidis és mtsai., 2007). Az antociánok kimondottan pH-érzékeny vegyületek. A pH-növekedés hatására az enyhén lúgos tartományba érve a pirosból kékes árnyalatúvá változik színük (Castaneda-Ovando és mtsai., 2009).

Az antocianinokról elmondható, hogy gyökfogó-, kelátképző-, illetve a lipidperoxidációt gátló hatásuk kiemelkedően fontos (Wang és Lin, 2000; Viskelis és mtsai., 2009). Könnyen képeznek fémkomplexet, ha a megfelelő körülmények adottak (pH, molekulaarányok). A fémiont megkötve, annak oxidációt katalizáló hatása nem érvényesül, ezért indirekt antioxidánsoknak is tekinthetjük őket.

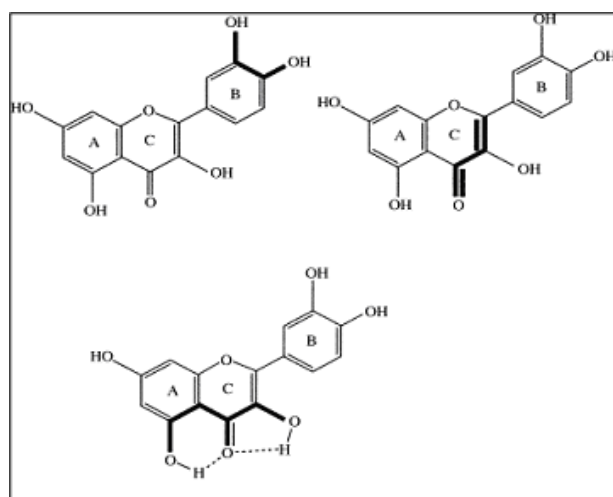
2.3.2.4.1. A fenolos savak és a flavonoidok bioszintézise

A fenolos savak valamint a flavonoidok bioszintézise fenilalanin és tirozin aminosavakból történik (**III., IV. melléklet**). A bioszintézis első lépéseiben a fenilalaninból, fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) enzim által katalizált dezaminálással fahéjsav képződik, melynek hidroxilezését membránhoz kötött P450 monooxygenáz végzi (tirozin esetén tirozin ammónia-liáz enzim (TAL) katalizál) (Winkel-Shirley, 2001). Az így kialakult *p*-hidroxikumarilsav aktiválását 4-kumaroil-Co-A-vá a 4-kumarát-koenzim-A ligáz (4CL) végzi. A flavonoidalapváz a kalkon-4-szintáz (CHS) enzim katalitikus hatására 4-kumaroil-CoA-ból és malonil-CoA-ból keletkezik. A hidroxikalkonok sztereospecifikus gyűrűzáródás lépését kalkon-izomeráz (CHI) enzim segíti, aminek hatására flavanonszármazékok keletkeznek. Ezek a továbbiakban megfelelő enzimkatalízissal izoflavonokká, flavonokká stb. alakulnak tovább. A flavon-szintáz (FSI és FSII) enzimek katalizálják a flavanon → flavon átalakulást. A dihidroflavonolokból dihidroflavonol-4-reduktáz (DFR) segítségével alakulnak ki a leukoantocianidinek, majd a későbbiekben deoxigenáz és transzferáz enzimek katalitikus hatására a jellemző antocianinokká alakulnak. A keletkező termékek további enzimek (hidrolázok, hidroxilázok, transzferázok, reduktázok, stb.) hatására különböző biokémiai folyamatokon mennek keresztül, amelyek során a flavonoidok változatos szubsztitúciós származékai (acil, hidroxil, glikozil metil, prenil stb.) alakulnak ki (Winkel-Shirley, 2001). A bogyós gyümölcsök flavonoid bioszintézisében szerepet játszó enzimekkel illetve az ezeket kódoló génekkel kapcsolatos ismereteink még hiányosak (Halbwirth és mtsai., 2006; Almeida és mtsai., 2007). A kutatások azonban abba az irányba mutatnak, hogy flavonoid enzimeket kódoló géneket, génszakaszokat más növénybe beültetve kedvezőbb biológiai értékkel rendelkező terményt, zöldséget, gyümölcsöt hozzanak létre (Winkel-Shirley, 2002; Rist és mtsai., 2006).

2.3.2.4.2. A flavonoidok kémiai-biokémiai tulajdonságai

1. **Antioxidáns hatásuk** kiemelkedőnek tekinthető (Guo és mtsai., 1996; Arora és mtsai., 1998), hiszen hatásosabb antioxidánsnak bizonyultak, mint a C- vagy az E-vitamin (Rice-Evans és mtsai., 1996). Az antioxidáns aktivitásukat elsődlegesen a szerkezetük (**6. ábra**) befolyásolja:

- az OH csoportok pozíciója, száma,
- az orto- 3',4'-dihidroxi csoportok elhelyezkedése a B gyűrűn
- az A gyűrű meta-5,7 dihidroxi szerkezete (kempferol, apigenin) a fémkomplex képzésnél fontos szerepet játszik,
- az o-difenolos csoport a 3',4'-dihidroxi pozícióban,
- a C gyűrű 4-keto, 3-hidroxi, vagy 4-keto-5-hidroxi szerkezete.



6. ábra. Az antioxidáns hatásért felelős molekularészletek (Soobrattee és mtsai., 2005)

2. **Gyökfogó képességükről** is számos kutató számolt be (Hanasaki és mtsai., 1994; Wang és mtsai., 1997).
3. **Fémionokkal kelátképzésre** is hajlamosak, ezzel azok prooxidáns hatását képesek kivédeni (Robards és Antolovich, 1997; Garcia-Lafuente és mtsai., 2009).
4. **Enzimekkel interakcióba** léphetnek, aminek számos kedvező tulajdonságuk köszönhető. Egyes enzimek gátlásával (reverz transzkriptáz, proteináz, integráz) hozzájárulnak többek közt egyes betegségek kialakulási valószínűségének csökkenéséhez (Robards és Antolovich, 1997).
5. **Daganatok kialakulását, a sejtburjánzást gátolják** (Agullo és mtsai., 1997; Galati és O'Brien, 2004). A proantocianidinek (vörösbor, csonthéjas gyümölcsök, bogyós gyümölcsök, mogyoró, diófélék) csökkentik a sejtburjánzást, bizonyos sejtekben apoptózist indukálnak, valamint a még egészséges sejtek esetén védelmi feladatot látnak el (Wen és Walle, 2005). A kémiai előidézett emlő- (Galati és O'Brien, 2004), vastagbél- (So és mtsai., 1996), és húgyhólyag karcinogenezist (Miyagi és mtsai., 2000) is gátolni képesek.
6. **HIV vírus ellenes** hatásukról is több kutató számolt már be; e tulajdonságuk a reverz transzkriptáz enzim gátlásában keresendő (Critchfield és mtsai., 1996; Williams és mtsai., 2004).
7. **Szív- és érrendszeri betegségek kialakulásának gátlásában** is jelentős szerepük van (Petti és Scully, 2009).
8. **Az Alzheimer-, Parkinson-kór kialakulását képesek gátolni**, illetve a lefolyásukat lassítani (Bravo, 1998; Lang és Lozano, 1998; Garcia-Lafuente és mtsai., 2009).
9. **Antimikrobás hatásuk** is bizonyított (Rigano és mtsai., 2007).

10. **Gyulladáscsökkentő hatással** is rendelkeznek (Petti és Scully, 2009).
11. **UV sugárzás elleni védelemben** kedvező szerepet játszanak (Halliwell, 2001; Ishige és mtsai., 2001).
12. **Allergia, asztma, szénanátha ellen** is eredményesen használhatók (Ueda és mtsai., 2002; Petti és Scully, 2009).
13. **Angiogenezist** (új véredények képződése) **gátló hatásuk** is bizonyítást nyert (Mariani és mtsai., 2008).

2.3.2.4.3. A flavonoidok felszívódása

A flavonoidok emberi szervezetben való felszívódása a mai napig tisztázatlan. Az azonban már biztos, hogy az egyes komponenseknek más és más mind a hozzáférhetősége, mind a felszívódása (Hollman és Katan, 1999a). A nemek közötti eltérésekre is fény derült már egyes tanulmányok során, de a bélflóra összetétele, a testtömeg is egyénenként változik, amelyek szintén hatással vannak a felszívódásra (Walle, 2004). Molekuláris szinten is vannak különbségek, mint például a transzporterek szintézise, az enzimek aktivitása, de erősen meghatározóak a genetikai különbségek, amelyek szintén kihathatnak a fent említettekre (Borradaile és mtsai., 1999).

A kutatási eredmények azt mutatják, hogy az emberi szervezetben a flavonoidok nehezen és alig szívódnak fel glikozidos formában (a cukor komponens a molekula hidrofilitását növeli). Az aglikonok (lipofilebb) ennél jóval egyszerűbben jutnak át a bél falon, de mint köztudott a növényekben, és így az élelmiszereinkben az aglikon forma nem, vagy csak kis mennyiségben található meg. Feltételezik azt is, hogy a vastagbél mikroorganizmusai a glikozidos kötésekkel hidrolizálják (Erlund és mtsai., 2000; Walle, 2004). A keletkezett aglikon így már könnyen abszorbeálódni képes a vastagbélben, majd ezt követően a májba jut, ahol O-metiláción, glukuronidáción, szulfáción mehet keresztül.

Érdekes az a tény, hogy a flavonoidok esetleges prooxidáns hatásukat ezen átalakítások következtében elvesztik, de antioxidáns tulajdonságaik megmaradnak (Erlund, 2004). A legjobban abszorbeálódó polifenolok közé tartozik a galluszsav, majd a flavononok, a katechin, illetve a kvercetin-glikozidok. A legkevésbé felszívódó komponensek a proantocianidinek és az antocianinok (Hollman és Katan, 1997).

2.3.2.4.4. Flavonoidmintázat

A zöldségekben, gyümölcsökben a flavonoid mintázat, vagyis a növényben előforduló flavonoidok jelenléte elsősorban genetikailag szabályozott (Murota és Terao, 2003; Walle, 2004), de a külső tényezők befolyásoló hatása sem elhanyagolandó. Ilyen például a hőmérséklet, a fényviszonyok, a csapadék mennyisége, a gyümölcs érettségi állapota, a talaj típusa, az évszak stb. Általánosságban e tényezők inkább a mennyiségi-, míg a genetikai eltérések a minőségi különbségeket erősítik fel (Murota és Terao, 2003). Egy adott fajon belül a fajták között is jelentős eltéréseket lehet kimutatni flavonoidmintázat tekintetében (Hollman és Arts, 2000).

A fény, különösen az ultraibolya sugárzás a flavonoidok mennyiségét növeli. Az üvegházban termesztett növények flavonoidtartalma elmarad a hagyományos módon termesztett növényekétől (McDonald és mtsai., 1998; Aherne és O'Brien, 2002). Az érés során a flavonoidtartalom és -összetétel is megváltozik (Hakkinen és Torronen, 2000; Vuorinen és mtsai., 2000). Egy tárolási kísérletben (9 hónap -20 C°), megfigyelték, hogy egyes fajoknál a kvercetin tartalom nőtt (szamóca 32%-kal), másoknál csökkent (áfonya 40%-kal) (Vuorinen és mtsai., 2000), illetve akadtak olyan fajok is (hagyma), amelyeknél nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni (Ewald és mtsai., 1999). A konyhatechnikai eljárások drasztikusan is csökkenthetik az adott gyümölcs vagy zöldség flavonoid tartalmát: a nagy hőmérséklet, különösen a főzés, az oxigén jelenléte és a savas közeg, a hámozás stb. akár 50%-os csökkenését eredményezhet a flavonoidtartalomban (Stewart és mtsai., 2000).

2.3.2.5. Ásványi anyagok

Az élő szervezet megfelelő működéséhez az ásványi elemek nélkülözhetetlenek. Híg elektrolitként jelentős szerepet töltenek be az ozmózis, elektrokémiai, illetve a sav-bázis egyensúlyok fenntartásában (Na, K, Ca, Mg stb.). Aktiválják és gátolják a különféle enzimreakciókat (Zn, Cu, Mn, Mg stb.), részt vesznek a támasztószövetek felépítésében (Ca, P).

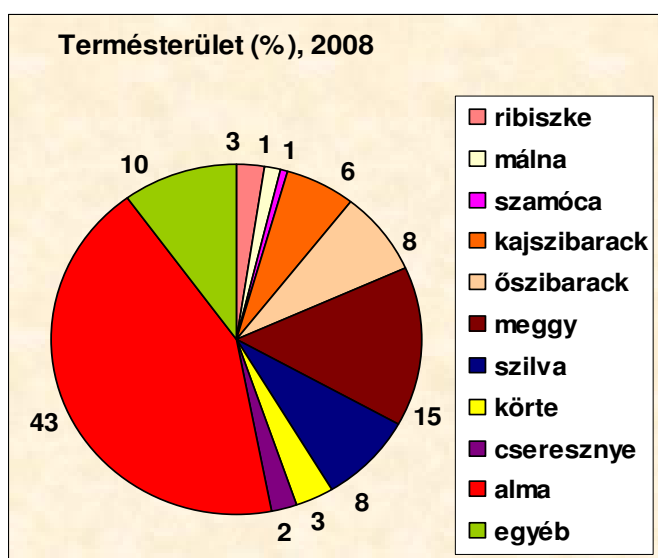
Az esszenciális mikroelemek közül különösen fontos a *vas*, a *cink*, a *réz*, a *molibdén*, a *mangán*, illetve a makroelemek közül a *magnézium*, amelyek az enzimek, koenzimek működésében, illetve a biokémiai folyamatok katalizálásában töltenek be létfontosságú feladatot, és így szerepet játszanak a szervezet antioxidáns védelmében is, ugyanis az antioxidáns hálózatban fontos feladatokat játszó enzimes védelmi rendszer tagjainak zavartalan működését biztosítják (Prasad és Kucuk, 2002).

2.4. A bogyós gyümölcsök jelentősége

A gyümölcsök fogyasztása elengedhetetlen az egészségmegőrző étrend kialakításában. Táplálkozás-élettani szempontból kiemelkedő helyen állnak a dolgozat témáját adó bogyós gyümölcsök, amelyek jelentősége ebben a fejezetben kerül bemutatásra. Munkám során a szamóccal, málnával, piros- és a feketeribizskével kapcsolatban végeztem vizsgálatokat, ezért ezen gyümölcsökkel és a táplálkozásban betöltött szerepükkel részletesebben foglalkozom.

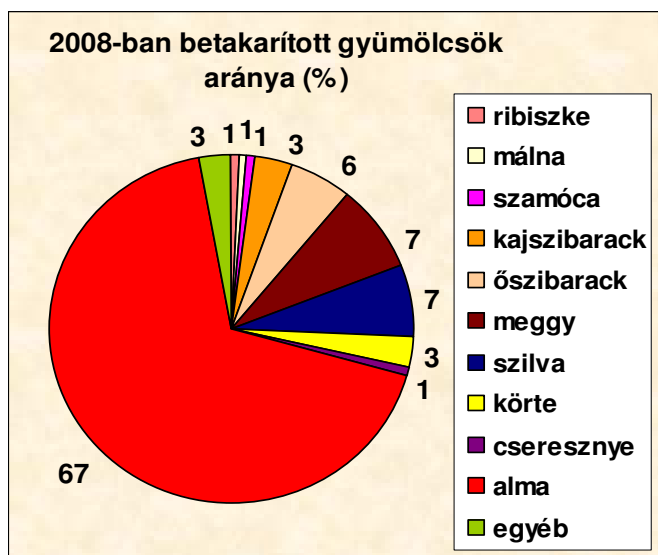
A bogyós gyümölcsöknek különösen fontos a szerepe a szabadgyökök káros hatásaival szemben, ugyanis a többi gyümölcshez viszonyítva (alma, őszibarack, kajszi, cseresznye, szilva, cseresznye stb.) kiemelkedően nagy -akár tízszer nagyobb- az antioxidáns hatásuk (Wang és mtsai., 1996; Wu és mtsai., 2004; Capocasa és mtsai., 2008). Ennek a nagy eltérésnek az oka, a bennük jelentős mennyiségben megtalálható vitaminoknak és flavonoidoknak köszönhető (Hakkinen és mtsai., 1999a; Wang és mtsai., 2009; Zulueta és mtsai., 2009). Kivonataikkal végzett kutatások bebizonyították, hogy gátolni képesek a vastagbél daganatsejtek növekedését (Stoner és mtsai., 2007). Bőséges fogyasztásukkal a mellrák, valamint a szív-, és érrendszeri megbetegedések kialakulási kockázata csökkenthető (Capocasa és mtsai., 2008).

A Központi Statisztikai Hivatal adataiból kiderül (KSH, 2009b), hogy kedvező hatásaik ellenére hazánk gyümölcsöseiben még mindig az alma az uralkodó, a termésterület közel felén termesztik. A csonthéjasokon belül a meggy foglalja el a legnagyobb területet (7. ábra). Magyarországon 2008-ban kevesebb, mint 4500 hektáron termesztettek bogyós gyümölcsöket, így a termésterületük az összes gyümölcshez viszonyítva csak néhány százalék.



7. ábra. Magyarországon az egyes gyümölcsök termésterülete 2008-ban (KSH, 2009b)

Alig 20 ezer tonnát takarítottak be ribizskékből számócából és málnából, ami csupán 3 %-át adja az összes gyümölcsnek (8. ábra). Ennek közel 25%-t dolgozzák fel kis- és nagyüzemekben, míg nagyobb hányadát piacon értékesítik. A többi gyümölcs esetén a feldolgozásra szánt gyümölcsök aránya ennél jóval nagyobb, alma és meggy esetén több, mint 70% (KSH, 2009b).



8. ábra. A betakarított gyümölcsök aránya, 2008-as évet tekintve (KSH, 2009b)

Friss fogyasztásuk mellett kiemelhető a mélyhűtött bogyós gyümölcsök jelentősége is, hiszen a vitaminok és egyéb biológiailag aktív anyagok, a fagyasztás után is megtalálhatók bennük nagyobb mennyiségben. A konzervipari termékek közül első helyen állnak a dzsemek, szörpök, gyümölcslevek, pürék, sűrítmények. Növekszik a feldolgozásuk a tej- és édesiparban a fagylalt- és joghurtkészítésnél, ugyanis kitűnő zamatok, illetve a természetes színezőanyag tartalmuk alapján különleges, változatos termékek készíthetők belőlük. Mindemellett különféle mártásokhoz, szószokhoz, gyümölcslevesekhez, tésztákhoz, tortákhoz, gyümölcsborokhoz, likőrökhöz is használhatók (Szajdek és Borowska, 2008).

2.4.1. A szamóca jelentősége, élettani hatása

A szamóca latin neve: *Fragaria x ananassa* DEUCH, a rózsafélék (*Rosaceae*) családjába és a *Fragaria* nemzetségbe tartozik. Világszerte az egyik legnépszerűbb és legelterjedtebb gyümölcs (Qin és mtsai., 2008). Az elmúlt években egyre keresettebbek a folyton termő és többször termő fajták. A friss fogyasztásra szánt gyümölcsnél kiemelkedően fontos a méret, a szín és a zamat. Már több mint 360 aromakomponensét azonosították. Ezek közül csak néhány, elsősorban a metil- és etilészterek tűnnek a legmeghatározóbbnak (Zabetakis és Holden, 1997).

A szamóca kedvező beltartalmi értékei miatt fontos szerepet tölt be a korszerű és egészséges táplálkozásban. Kicsi a szárazanyag és energiatartalma, de C-vitamint, káliumot, kalciumot, vasat, foszfort nagy mennyiségben tartalmaz (Bíró és Lindner, 1999). Kiváló az étrendi hatása nagy szervessav- és élelmi rost tartalma miatt (Qin és mtsai., 2008). Serkenti a gyomor és a bél működését (Seeram, 2008). A szamóca nagy mennyiségben tartalmaz antioxidánsokat, úgymint antocianinokat, flavonoidokat, fenolos savakat (Hakkinen és mtsai., 1999a; Hakkinen és Torronen, 2000). Meghatározó mennyiségben található benne kempferol, kvercetin, miricetin, ellágsav, kisebb mennyiségben kávéssav és kumársav (Hakkinen és mtsai., 1999a).

Számos kutatás bizonyítja, hogy ezen összetevőknek is köszönhetően, rendkívül nagy szabadgyökfogó hatás jellemzi (peroxilgyök, szuperoxidgyök, hidroxilgyök), ezért kiemelkedő antioxidáns és antikarcinogén sajátosságokkal rendelkezik (Hakkinen és mtsai., 1999a; Simirgiotis és mtsai., 2009). Ezen tulajdonságai nagymértékben függnak a genotípustól, a hőmérséklettől, a környezet széndioxid-tartalmától, valamint a termesztés módjától (Wang és mtsai., 2002; Capocasa és mtsai., 2008).

2.4.2. A málna jelentősége, élettani hatása

A málna botanikai neve *Rubus idaeus*. L. A *Rubus* nemzetségbe, rózsafélék (*Rosaceae*) családjába tartozik, gyümölcstermő félcserje. Kerti termesztése a 15-16. században kezdődött.

A cukrok és savak harmonikus aránya (Seeram, 2008), valamint az átlagosnál nagyobb C-vitamin, folsav- és rutintartalma következtében a málna gyümölcsének biológiai és élvezeti értéke egyaránt jelentős (Bíró és Lindner, 1999; Papp, 2004).

Epidemiológiai vizsgálatok bizonyították, hogy a málna kivonata hatással van az emlődaganat-sejtek növekedésére, elősegíti azok programozott sejthalálát, valamint szerepet játszhat a vastagbél karcinogenezis gátlásában is (Coates és mtsai., 2007). Számos kutatási munka épült a málna antioxidáns kapacitásának, illetve polifenolos komponenseinek vizsgálatára is (Zafra-Stone és mtsai., 2007). Az eredményekből egyértelműen kitűnik, hogy a genetikai háttérnek döntő szerepe van ennek vonatkozásában (Anttonen és Karjalainen, 2005; Capocasa és mtsai., 2008). Elsődlegesen kvercetin-glükozidokat tartalmaz (Hakkinen és mtsai., 1999a), míg a legjellemzőbb antocianinjai a cianidin-3-szulfurozid valamint a cianidin-3-glükozid (de Ancos és mtsai., 1999).

2.4.3. A ribizskék jelentősége, élettani hatása

A piros (*Ribes rubrum* L.) és a fekete ribizske (*Ribes nigrum* L.) két különböző faj, ezért éghajlati igényeik és elterjedésük is különbözik.

Nagy pektintartalmuk miatt szerepet játszanak nemcsak az emésztőszervrendszeri megbetegedések megelőzésében, de gyógyításukban is (Zafra-Stone és mtsai., 2007). A fekete ribiszke kedvező hatását kimutatták az érlemeszesedésben, a szívelégtelenségben szenvedő betegeknél is. Mindezek mellett kiváló gyomorfekélyre, gyomorhurutra, depresszióra, valamint bélbántalmakra (Lengsfeld és mtsai., 2004; Seeram, 2008). Cseranyagai remek gyulladásgátlók. Magjának olaja gazdag gamma-linolénsavban, amelynek a neurodermatitisz kezelésében egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak (Bushman és mtsai., 2004).

A polifenolos komponensek közül mind a piros, mind a fekete ribiszkénél a kvercetin fordul elő legnagyobb mennyiségben. A fekete ribiszkénél ezt követi a miricetin és a kempferol, de a piros ribiszkében ezen összetevők koncentrációja meglehetősen kicsi (Hertog és mtsai., 1992; Hakkinen és mtsai., 1999a). A feketeribiszke fenolos sav összetételét tekintve kiemelhető kumársavtartalma. Színanyagában az antocianinok dominálnak, úgymint a cianidin-3-rutinozid 33-38%, delphinidin-3-rutinozid 27-34%, delphinidin-3-glükózid 8-10% és cianidin-3-glükózid 8-10% arányban (Hong és Wrolstad, 1990). A piros ribiszkében csupán a cianidin-monoglükózidot és cianidin-rhamnoglükózidot lehet kimutatni.

Összességében elmondható, hogy a dolgozat tárgyát képező bogyósgyümölcsűeknek kimagasló jelentősége van/lehet a szervezet zavartalan működésének, antioxidáns státuszának biztosításában, kiváló beltartalmi értékeiknek köszönhetően.

2.5. A legelterjedtebben alkalmazott antioxidáns kapacitást mérő módszerek elvei, előnyei és hátrányai

Az elmúlt években megnőtt azon kutatások száma, amelyek a különböző élelmiszerek, biológiai rendszerek természetes antioxidánsaival és mérésükkel kapcsolatosak (Frankel és Finley, 2008; Gokmen és mtsai., 2009). Az antioxidáns kapacitás az adott rendszerre vonatkozó összes antioxidáns vegyület együttes hatását jelenti. Ennek pontos, számszerű meghatározására egyre nagyobb igény jelentkezik, így számos analitikai módszert, mérőrendszert fejlesztettek ki (Cornetti, 2009). Folyamatosan tart a metodikák módosítása, finomítása, így napjainkra az alkalmazott módszerek száma már meghaladja a százat (Cornetti, 2009). Mégis a legtöbb irodalom nemcsak egy, hanem többféle módszert használ az antioxidáns kapacitás meghatározására (Ghiselli és mtsai., 2000). Ennek oka a fogalom összetettségében rejlik, hiszen egyik módszer sem képes a valódi – a természetes módon lezajló reakciók összességét modellezni (Frankel és Meyer, 2000). Minden metodika specifikus bizonyos antioxidánsokra,

illetve reakció(k)ra, de egyik sem képes az összes antioxidáns valódi antioxidáns erejét mérni. A különböző laboratóriumok más és más méréseket alkalmaznak, így a kapott eredmények sokszor nehezen, vagy alig összevethetők. Egyes módszerek között vannak összefüggések, ezt sokszor a hasonló elvvel magyarázzák (Frankel és Meyer, 2000; Ou és mtsai., 2002b; Pellegrini és mtsai., 2003), de számos esetben a kapott eredmények még ekkor sem korrelálnak (Niki, 2002).

Egy 927 zöldségmintát felhasználó tanulmány, amely ORAC és FRAP módszerrel határozta meg az antioxidáns kapacitásokat, nem tudott szoros összefüggéseket kimutatni (Ou és mtsai., 2002b), amelyre magyarázatnak szolgál a minta összetettsége. Ha a minta komplexebb, tehát valódi mintáról van szó és nem egy standard oldatról, akkor az összefüggések keresése még több nehézségbe ütközik. Ilyen esetben zavaró lehet a lezajló reakciókra nézve például a minta cukor-, ásványi elem-, sav-, fehérjetartalma stb. (Cao és Prior, 1998; Ou és mtsai., 2002b; Pellegrini és mtsai., 2003). A kapott eredmény, illetve a felállított sorrend a minták között, még egyszerű standard oldatoknál is különböző lesz, más és más módszereket, tesztek alkalmazva.

Egy tanulmányban tiszta, azonos flavonoid standardok antioxidáns kapacitását (V., VI. **melléklet**) vizsgálták 6 féle módszerrel (Tabart és mtsai., 2009). Minden esetben más volt a kapott érték és a sorrend is a vizsgált komponensek között, például a TEAC és a DPPH módszerrel meghatározva a naringenin antioxidáns kapacitását, igen kis értékeket kaptak, míg ORAC esetén nagyot. Ez is rámutat arra, hogy nem mindegy, hogy vizsgálatainkat milyen céllal végezzük, és melyik módszert választjuk a méréshez. Ugyanazon komponens más rendszerben máshogy fog viselkedni. Többféle mérési módszert alkalmazva vonhatunk le csak következtetést, arra vonatkozólag, hogy egy minta mennyire 'jó' antioxidáns, a mi általunk felállított mesterséges körülmények között. Az emberi szervezetben való viselkedésük és pontos hatásmechanizmusuk a különböző komponensek egymással való kölcsönhatásától és a felszívódásától is nagymértékben függ, ami még jobban megnehezíti a kutató feladatát annak megítélésében, hogy melyik módszerrel mért adatok jellemezhetik legjobban a szervezetben kifejtett hatásukat.

Az eddig kifejlesztett mérési módszereket csoportosítani lehet (Frankel és Meyer, 2000):

- hidrogénatom átmenettel (HAT-hidrogen atom transfer) és
- elektronátmenettel (ET-electron transfer) kapcsolatos módszerekre.

A HAT módszerek szabadgyökökre vonatkoznak és elsősorban *reakció kinetikán* alapszanak. A tesztek azt mérik, hogy egy adott szabadgyökkel szemben a minta mennyire hatásos, milyen a szabadgyökbefogó képessége (Ghiselli és mtsai., 2000).

Az ET reakciók általában *színváltozással* járnak, ennek mértékéből lehet az antioxidáns kapacításra következtetni (Apak és mtsai., 2007).

Mindkét 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 (Apak és mtsai., 2007).

Az emberi szervezetet károsító legfontosabb reaktív formák a szuperoxid anion, hidrogén-peroxid, peroxilgyök, hidroxilgyök, szinglet oxigén és a peroxinitrit. Az első kettő ellen enzimek védnek (szuperoxid-dizmutáz, kataláz és a peroxidázok), míg a többi ellen a nem enzimátikus antioxidáns védelmi rendszer elemei, mint a C- és E-vitamin, karotinoidok, flavonoidok stb. lépnek fel. A peroxilgyök megkötésére épül a legtöbb reakció, egyrészt a lipidperoxidáció miatt (ezzel foglalkoztak legelőször), másrészt egyszerű az azofestékek termolízise következtében a gyökök előállítása.

További ismert módszerek :

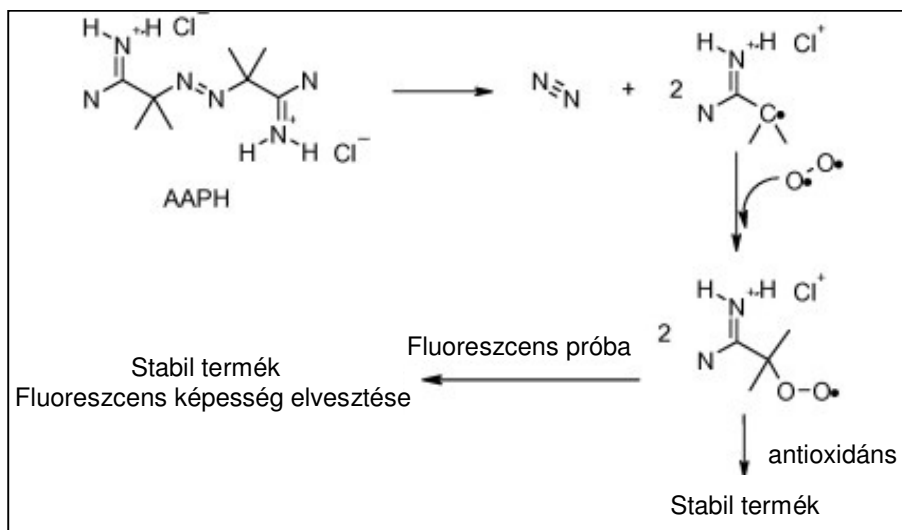
- a szuperoxid anion megkötésével (Ewing és Janero, 1995)
- a hidrogén-peroxiddal (Martinez-Tome és mtsai., 2001)
- a hidroxilgyökkel (Ou és mtsai., 2002a)
- a szinglet oxigénnel (Wilkinson és mtsai., 1995)
- a peroxi-nitrittel (Pryor és Squadrito, 1995)
- voltametriával (Chevion és mtsai., 2000) stb. kapcsolatosak.

A következő fejezetben a legelterjedtebben használatos módszerek kerülnek bemutatásra, melyben először a mérés elvéről esik szó, majd a módszer előnyeinek és hátrányainak tárgyalására kerül sor.

2.5.1. Hidrogénatom átvitelén alapuló, antioxidáns kapacitást mérő módszerek bemutatása

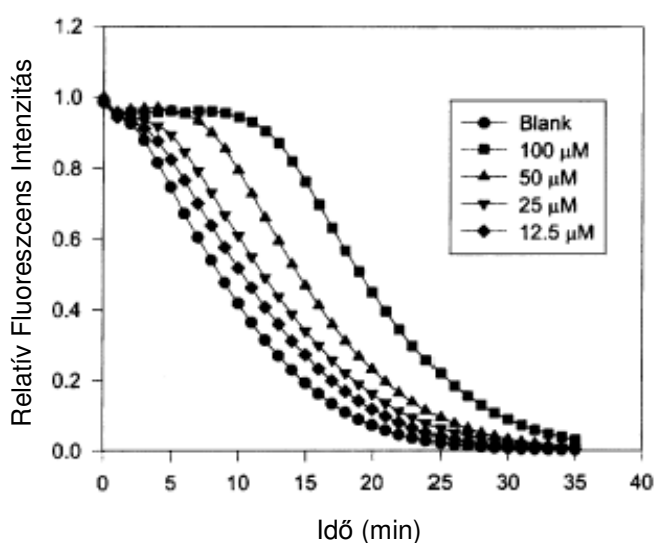
2.5.1.1. Oxigéngyök Abszorpciós Kapacitás-ORAC-Oxygen Radical Absorbance Capacity

Az ORAC módszert Cao és munkatársai fejlesztették ki 1993-ban. A mérés során a próba molekula (fehérje) a peroxilgyökökkel (ROO[•]) reagálva oxidatív sérülést szenved, ezért az általa kibocsátott fluoreszcens jel intenzitása csökkeni fog (**9. ábra**). Antioxidánsok jelenlétében ez a reakció gátlódik. A peroxilgyököket az AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropán)-dihidroklorid) azofesték termolízise következtében nyerik (Cao és mtsai., 1993). Az eredeti módszerben használt fehérjének, a β -fikoeritrinnek számos hátránya volt, mint például a fényérzékenység, a polifenolos vegyületekkel való reakció stb. (Ou és mtsai., 2001), ezért e hátrányok kiküszöbölésére a fluoreszcein használatát vezették be (Huang és mtsai., 2005). Reakció körülmények: pH=7,4, 37 °C.



9. ábra. Az ORAC esetén lejátsszódó reakció (Fernandez-Pachon és mtsai., 2006)

Ezen módszernél a műszer által kirajzolt görbe (**10. ábra**) alatti terület a vonatkoztatási alap (Huang és mtsai., 2005), vagyis az antioxidáns kapacitás eredményben a gátlás ideje és mértéke is megmutatkozik (Frankel és Meyer, 2000; Wu és mtsai., 2004). Zsír- és vízzoldható antioxidánsok vizsgálatára egyaránt alkalmas. Automatizált változata is létezik, ami nagy mintaszám esetén gyors eredményt ad, rutinszerűen használható (Huang és mtsai., 2005).



10. ábra. Jellegzetes kinetikai görbék az ORAC módszerrel

Minden minta esetében 35 percn keresztül történik a fluoreszcens jelintenzitás nyomon követése (Huang és mtsai., 2005). A módszer pH érzékeny és lassú (Apak és mtsai., 2007). Fluorimétert igényel, ami a legtöbb laboratóriumban nem áll rendelkezésre (Kranl és mtsai., 2005). A reakció kinetika a koncentrációtól és az antioxidánsoktól függően változik, illetve mintafüggő is (Huang és mtsai., 2005). A fehérje-, valamint az aminosav tartalom zavarhatja a mérést, mert hamis pozitív eredményt okoz (Perez-Jimenez és mtsai., 2008). Az etanoltartalom

interferenciát okoz (Fernandez-Pachon és mtsai., 2006). Gondot jelenthet továbbá az is, hogy a fluoreszcens jel és az idő között nincs lineáris összefüggés. A fluoreszcein nem eléggé zsíroldékony, és a kibocsátott fluoreszcens jel intenzitása is meglehetősen kicsi (Frankel és Meyer, 2000).

2.5.1.2. Összes peroxilgyök befogására vonatkozó paraméter-TRAP-Total peroxil Radical Trapping Parameter

Az eredeti TRAP módszert Wayner és munkatársai fejlesztették ki (1985). Peroxilgyök generálóként ABAP-ot (2,2'-azobis-2-amidinopropán) használtak. A szabadgyökök oxidáló hatását az antioxidánsok késleltetni tudják. Az oxidáció az oxigénfogyással nyomon követhető. A mérés során ún. lag görbe figyelhető meg, ennek az indukciós időnek a hosszát (lag fázis hossza) ismert koncentrációjú trolox (trolox=6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxil sav, az E-vitamin vízoldható formája) oldat lag fázis hosszával hasonlítják össze, amelyből az antioxidáns kapacitásra lehet következtetni (Wayner és mtsai., 1985). Később lecserélték a gyökgenerálót AAPH-ra (2,2'-azo-bis(2-amidinopropán)-dihidroklorid), illetve lipidszubsztrátként, linolénsavat adtak a mintához (Prior és Cao, 1999).

Az elmúlt évtizedben ez a módszer volt a legelterjedtebb, majd rámutattak arra (Rice-Evans és Miller, 1994), hogy az oxigénelektrod a megkövetelt időtartam alatt nem stabil, 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 (Delange és Glazer, 1989). A módszer időigényes, (2 óra/minta), így naponta kevés minta megmérése van lehetőség. 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 (Wu és mtsai., 2004). A méréseknél a fehérjék jelenléte is interferenciát okozhat, hiszen például a fehérjék szulfhidril csoportjai részt vesznek a redox egyensúlyban és módosítani képesek az eredményeket (Ghiselli és mtsai., 2000).

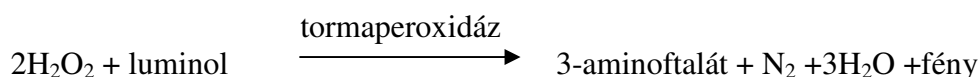
2.5.1.3. Kemilumineszcencián alapuló módszerek- CL-Chemiluminescence

Az antioxidáns kapacitás meghatározásának kemilumineszcenciás módszerét többek közt Alho és Leinonen (1999) írta le részletesen. A módszer alapja a szabadgyökök generálása, elsődlegesen azofestékek például ABAP, AAPH termolízisével. A luminol (próba) szabadgyökökkel reakcióba lépve luminolgyökké alakul és fényt bocsát ki. Ha antioxidánst adunk a mintához, a fénykibocsátás gátlódik, a fény intenzitása csökken. A reakció kémiaiilag

nyomon követhető. Ha elfogy a rendszerből az antioxidáns a kemilumineszcens jel intenzitása visszaáll (Diaz és mtsai., 1998).

A reakció gyors, érzékeny, könnyen automatizálható (Alho és Leinonen, 1999). A továbbfejlesztett módszer esetén para-idofenolt adnak a rendszerhez a luminol mellé. Így a módszer érzékenyebb lesz, illetve az emittált fény stabilabb és hosszabb idejű (Robinson és mtsai., 1997).

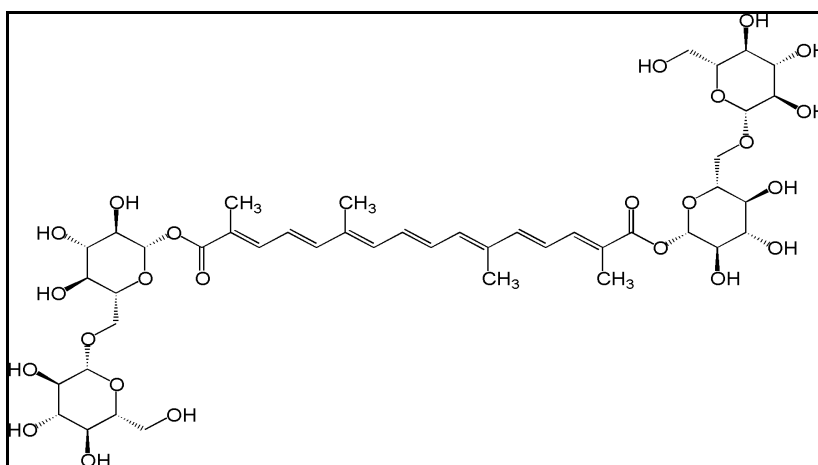
Történtek módosítások arra vonatkozólag is, hogy a luminolt hidrogén-peroxiddal oxidálják, tormaperoxidáz alkalmazásával (Whitehead és mtsai., 1992; Chapple és mtsai., 1997).



A módszer hátránya, hogy luminométert igényel, ami nem tartozik laboratóriumi alapfelszereléshez, valamint a mérések nagyon időigényesek (Said és mtsai., 2003).

2.5.1.4. Krocín elszíntelenedésén alapuló módszer

A mérési módszer azon alapszik, hogy a krocín (**11. ábra**) egy természetes karotinoid mély narancssárga színnel, így a látható fénytartományban intenzív abszorbanciája van (Bors és mtsai., 1984). Ha a krocín peroxilgyökökkel reagál, akkor elszíntelenedik, de antioxidánsok jelenlétében ez a reakció gátlódik. Ezen módszer esetében is lag fázis figyelhető meg a reakció során.



11. ábra. A krocín molekula

A reakció nyomon követése 443 nm-en történik 10 percig 7-es pH-n (Prior és Cao, 1999). Gyökgenerálónak az AAPH-t használják.

A módszer olcsó, gyors, nem igényel drága műszert, a fiziológiai pH-hoz közeli a reakcióelegy pH-ja (Prior és Cao, 1999).

Az alkalmazott hullámhosszon sok az interferenciát okozó egyéb komponens is (Huang és mtsai., 2005). Az élelmiszer-mátrix túl komplex ehhez a méréshez, egyes komponensek adnak lag fázist, míg mások nem, így nagyon nehéz az összehasonlítás. Ebben a rendszerben a C-vitaminnak különösen nagy az antioxidáns kapacitása, hétszer nagyobb, mint az ORAC módszerrel mérve (Prior és Cao, 1999). Sok növényi pigmentnek van hasonló fényelnyelése, ami interferenciát okozhat, ezért ilyen esetekben korrekció szükséges (Huang és mtsai., 2005).

2.5.1.5. Béta-karotin elszíntelenedésén alapuló módszer

Az elv az előzővel hasonló (vonGadow és mtsai., 1997). A különbség annyi, hogy a rendszerben a linolén sav autooxidációja következtében keletkeznek a gyökök. Béta-karotint használnak a méréshez.

2.5.1.6. Fotokemilumineszcencián alapuló antioxidáns kapacitás mérés- PCL – Photochemiluminescence

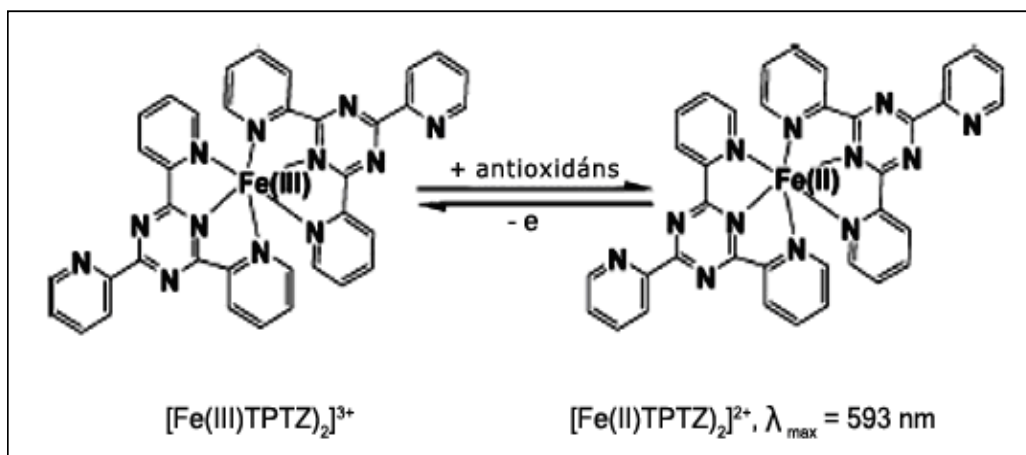
A fotokemilumineszcencián alapuló módszert Popov és Lewin (1994, 1996) írták le. A mérés elve: a fényérzékeny komponensből UV fény hatására szuperoxid anionok válnak szabaddá. Ezek egy részét a minta antioxidánsai eliminálják, míg a másik részük reagálni fog egy „detektor” vegyülettel, amely hatására fotonok emittálódnak (Popov és Lewin, 1994, 1996). A készülék ezt a fotokemilumineszcenciát méri, így az antioxidáns kapacitást közvetetten kapjuk meg.

A gyártó cég (Analytic Jena, Németország) kiadványában az szerepel, hogy a készülék képes a zsír (ACL, Lipid soluble Antioxidant Capacity) és vízzoldható (ACW Water soluble Antioxidant Capacity) antioxidáns kapacitás meghatározására. A szoftver automatikusan meghatározza a vak és a kalibrációs oldatok összefüggéséből az adott minta antioxidáns kapacitását troloxra nézve lipídzoldható- és aszkorbinsavra, vízzoldható- antioxidáns kapacitás esetében. Ehhez a vízzoldható antioxidáns kapacitás esetében a műszer által kirajzolt lag fázis időben való eltolódását használja fel, míg zsírzoldható antioxidáns kapacitásnál a kirajzolt görbe alatti terület segítségével kapjuk meg az értékeket. A gyártó állítása szerint a mérés gyors és egyszerű, nem igényel bonyolult és hosszas minta-előkészítést, komplex minták rutinszerű mérésére is alkalmas. A megfelelő reagensek, kiték (gyártótól rendelhető) összeöntését követően a mérés automatikus. A mérésekhez szükséges kitékkel a kivitelezés egyszerű és kényelmes. A gyártó a műszer felhasználási körének jelöli meg többek közt az élelmiszerminőség, a gyártásfolyamatok, a technológia területeit, a stabilitási-, eltarthatósági vizsgálatokat, a termékek, készítmények gyökfogóképesség-, az oxidatív stressz vizsgálatokat stb.

2.5.2. Elektronátmeneten alapuló antioxidáns kapacitás mérési módszerek

2.5.2.1. Vasredukálóképességen alapuló módszer -FRAP-Ferric Reducing Ability of Plasma

A módszer kidolgozása Benzie és Strain (1996) nevéhez köthető. A mérési elv értelmében a vas-2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ) komplexet az antioxidánsok (AH) redukálják (12. ábra), mely reakció színváltozással jár (Huang és mtsai., 2005). A reakcióidő 5 perc, amely a lejátszódó kinetikára jellemzően lett meghatározva.



12. ábra. A FRAP módszer mérési elve

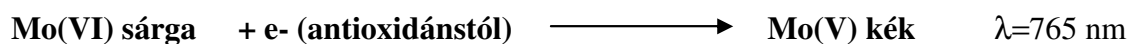
A keletkező kék szín spektrofotometriásan nyomon követhető 593 nm-en (Benzie és Strain, 1996). Mint ahogy a módszer neve is mutatja, a vas redukálóképességet méri 3,6-os pH-n (Prior és Cao, 1999).

Olcsó, egyszerű, gyors, reprodukálható, nem igényel drága laboratóriumi felszerelést. A legelterjedtebb és a legtöbb laboratóriumban használatos mérési módszerek közé tartozik (Apak és mtsai., 2007; Perez-Jimenez és mtsai., 2008).

A mérés jóval kisebb pH-n történik, mint a fiziológiai pH. A módszer nem érzékeny a tiol típusú (SH csoportot tartalmazó) antioxidánsokra, mint például a glutátion (Kranl és mtsai., 2005). A karotinoidoknak nincs vasredukálóképességük. Más komponensek is okozhatnak interferenciát az alkalmazott hullámhosszon. Minden komponens, amely redoxpotenciálja 0,77 V-nál kisebb redukálhatja a vasiont, tehát a módszer nem csak antioxidánsokat detektál (Cao és Prior, 1998). Vannak komponensek, amelyek reakcióideje a módszerben meghatározottnál (5 percnél) jóval hosszabb pl. kávésav, ferulasav, akár néhány óra is lehet, ezért e komponensek antioxidáns kapacitása nem járul hozzá a kapott értékhez (Apak és mtsai., 2007).

2.5.2.2. Összes polifenol tartalom meghatározása Folin-Ciocalteu reagenssel TPC -Total Polyphenol Content

Az eredeti metodikát Singleton és Rossi (1965) fejlesztették ki. A módszer nevével ellentétben redukálóképességen alapuló antioxidáns kapacitás meghatározás. A mérés pH=10 történik. A keletkező kék szín spektrometriásan nyomon követhető 765 nm-en.

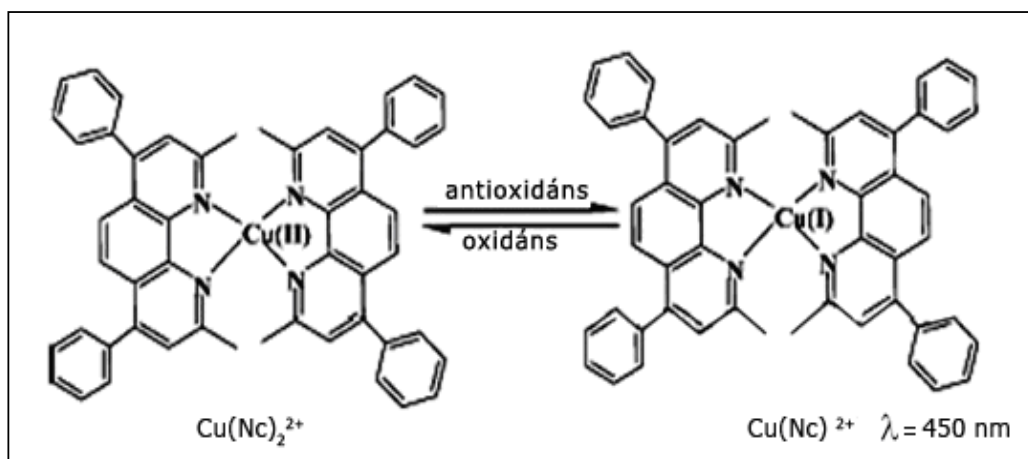


Olcsó, egyszerű, reprodukálható, nem igényel drága laboratóriumi felszerelést, rutinszerű mérésekre alkalmas (Huang és mtsai., 2005). Az alkalmazott hullámhosszon egyéb interferáló komponensek fényelnyelése elhanyagolható (Apak és mtsai., 2007).

Lúgos pH-n történik a mérés, amely a fiziológiai pH-hoz képest nem reális (Frankel és Meyer, 2000). A teljes kémiai háttér nem ismert. Nem szelektív a polifenolos komponensekre, független a szerkezetüktől. Az aszkorbinsav, a Cu (I) is hozzájárul a kapott értékekhez (Apak és mtsai., 2007).

2.5.2.3. Rézion redukálóképességen alapuló antioxidáns kapacitás mérés -CUPRAC-CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity

A módszer Apak és munkatársai (2007) nevéhez fűződik. Redukálóképességet határoz meg ez a metodika is (13. ábra), 7-es pH-n 450 nm-en. A reakcióidő 30 perc.



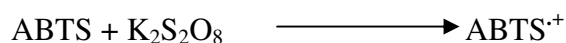
13. ábra. A Cuprac módszer mérési elve

Olcsó, egyszerű, nem igényel drága felszerelést. A fiziológiai pH-hoz közel történik a mérés. Víz-, és zsírolható antioxidánsokat is képes mérni. A tiol típusú antioxidánsokat is érzékeli (Apak és mtsai., 2007).

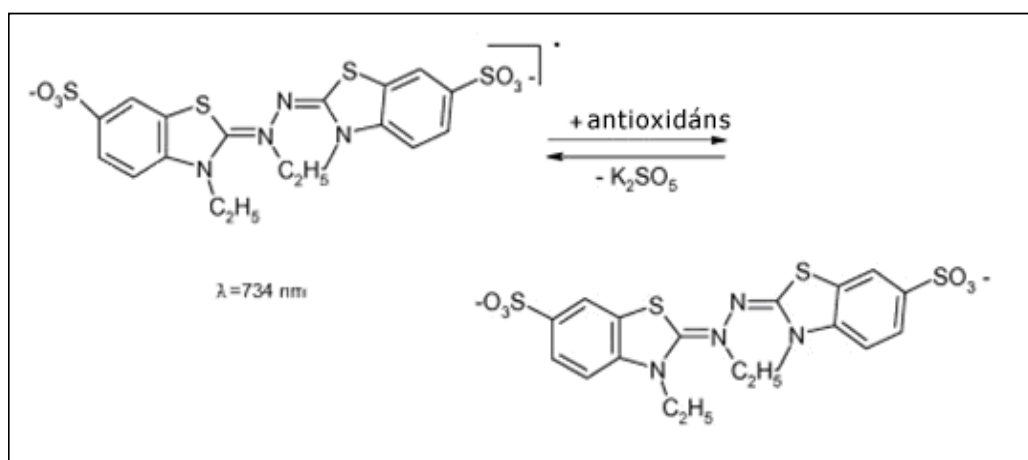
Ezen a hullámhosszon interferenciát okozhatnak egyéb komponensek. Lassú, egyes komponensek, mint a naringin, vagy naringenin több időt igényelnek- ezért 20 perces 50 C°-on történő inkubálás előzi meg a mérést (Apak és mtsai., 2007).

2.5.2.4. Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás -TEAC –Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

A módszer Miller és munkatársai nevéhez (1993) fűzhető. A reakció az ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav) oxidációján alapszik.



Hidrogén-peroxid és metmiogloblin jelenlétében sötétzöld színű $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -kation gyök keletkezik. Ha a mintában antioxidánsok vannak jelen, akkor a szabadgyökökkel reagálva a színintenzitás csökkeni fog, a minta elszíntelenedik (Stratil és mtsai., 2007). A reakció spektrofotometriásan nyomonkövethető 734 nm-en (14. ábra).



14. ábra. Antioxidáns és az ABTS gyök reakciója

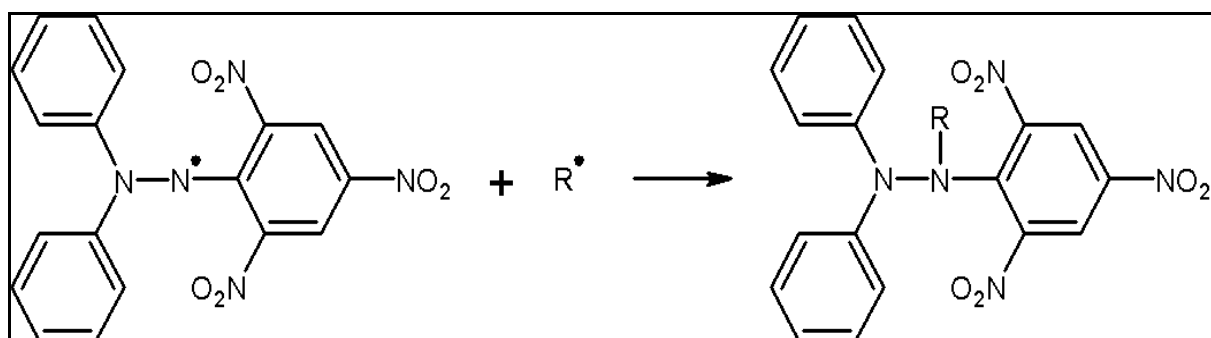
Az antioxidáns koncentrációtól függően ez a színváltozás időben eltolódik, lag fázis figyelhető meg, amiből az adott minta antioxidáns kapacitására, pontosabban az $\text{ABTS}^{\cdot+}$ gyök befogásának a képességére lehet következtetni. A reakció 7,4-es pH-n zajlik (Miller és mtsai., 1993). Vannak módosítások, miszerint mangán-dioxidot vagy kálium-perszulfátot alkalmaznak a hidrogénperoxid és a metmiogloblin helyett (Frankel és Meyer, 2000).

A módszer olcsó, egyszerű és gyors (van den Berg és mtsai., 1999), a gyök viszonylag stabil (Prior és Cao, 1999). Az alkalmazott 734 nm-en a természetes növényi pigmentek kicsi interferenciát okoznak.

Hátránya, hogy nem a sejtben normál anyagcsere során keletkező gyököt használ, hanem egy stabil- az élő szervezetben nem képződő gyököt (Miller és mtsai., 1996; Frankel és Meyer, 2000). Ezt a módszert alkalmazva nem lehet képet kapni arról, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak. A mérést 12-16 óra időtartamú inkubálás előzi meg, így a minta-előkészítés hosszúnak mondható. A minták közötti sorrend felállítható, de mennyiségi meghatározásra nem alkalmas, illetve a gyökképzés extra lépést igényel (van den Berg és mtsai., 1999). Az antioxidánsok más-más reakcióidejük ebben a rendszerben is: a C-vitamin az ABTS gyökkel gyorsabban reagál, és egy perc alatt eléri gátlásának maximumát, míg a galluszsav, az albumin, vagy a karotinoidok lassabban reagálnak. Célszerű lenne valamilyen időintervallumot létrehozni, ami egységes lenne minden laboratóriumban az adatok összevethetősége miatt (Zulueta és mtsai., 2009). A szerkezeti különbségek illetve hasonlóságok, például a leadható elektronok száma és a kapott eredmények között nincs összefüggés (Huang és mtsai., 2005), hiszen például az aszkorbinsav, az α -tokoferol és a glutátion hasonló eredményt ad, de az α -tokoferol és az aszkorbinsav 2, míg a glutátion 1 elektron leadásra képes.

2.5.2.5. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés

A stabil DPPH gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés (Blois, 1958) a legkorábbi módszerek közé tartozik. A reakció (15. ábra) a következőképpen zajlik (Frankel és Meyer, 2000): a sötétlila színű gyök antioxidánsokkal reagálva elveszti a színét.



15. ábra. A DPPH gyök megkötésén alapuló módszer elvi alapja

Széles körben alkalmazzák ezt a módszert, mert a 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), a mérés egyszerű (Prior és Cao, 1999).

Hátránya, hogy nem a sejtben normál anyagcsere során keletkező gyököt használ, hanem egy stabil-az élő szervezetben nem fellelhető gyököt (Frankel és Meyer, 2000). Ezt a módszert

alkalmazva nem lehet képet kapni arról, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak. Fény-, oxigén-, pH- és oldószerfüggő (Prior és Cao, 1999). További problémát jelent a szerkezetből adódó rossz hozzáférhetőség. A kis molekulák jobban odaférnek a DPPH gyökhöz, így nagyobb antioxidáns kapacitás értéket mutatnak. A karotinoidok interferálnak a mérési hullámhosszon 517 nm-en (Apak és mtsai., 2007).

Az előzőekben bemutatott néhány mérési módszerből is egyértelműen kitűnik a téma összetettsége, valamint a kapott eredmények sokféleségének az oka. A következőkben azok a befolyásoló tényezők kerülnek felsorolásra, amelyek az antioxidáns kapacitás eredményeket a leginkább befolyásolják.

Az antioxidáns mérések eredményét nagymértékben befolyásolja:

1. Mintaelőkészítés.
2. Extrakció (hatásfok, hőmérséklet stb.).
3. Alkalmazott oldószer (metanol, etanol, víz, acetón, kloroform), hiszen nincs olyan oldószer, amely alkalmas lenne egy élelmiszeripari mintában található összes antioxidáns kivonására (Frankel és Meyer, 2000; Becker és mtsai., 2004; Perez-Jimenez és Saura-Calixto, 2006), illetve nehezíti a helyzetet a fehérjékkel, szénhidrátokkal kialakult komplexek kérdése is (Ghiselli és mtsai., 2000; Gokmen és mtsai., 2009). Mindez azt jelenti, hogy a mintában mindig lesznek ki nem oldott, vagy nem hozzáférhető komponensek, amelyeknek szintén fontos szerepe lehet az emberi szervezetben, ahol a különböző enzimek, mikrobiális tevékenységek hatására már hozzáférhetőek lesznek. A kémiai hidrolízissel az a probléma, hogy a minta eredeti szerkezete megváltozik, és így már nem az eredeti formában lehetne a komponenseket kinyerni, ezzel nem lesz reprezentatív a kapott érték az eredeti mintára (Gokmen és mtsai., 2009).
4. Választott módszer (elektronátmenettel, hidrogénatom-átadással jár).
5. Méréshez használt szabadgyök (peroxilgyök, DPPH gyök, hidroxilgyök stb.). Az egyes antioxidánsok másként reagálnak a különböző szabadgyökökre (Perez-Jimenez és mtsai., 2008). Például a peroxilgyök az emberi szervezetet tekintve a leggyakoribb. De a hidroxilgyök, a szinglet oxigén, a szuperoxid gyök és az egyéb nitrogéntartalmú gyökök is mind jelen vannak a biológiai rendszerekben. Ennek ellenére vannak olyan elterjedten alkalmazott módszerek is, amelyek nem ezeket a gyököket használják fel az antioxidáns kapacitás meghatározására, hanem például a DPPH illetve az ABTS gyököket. Ezek stabilak, kevésbé reakcióképesek és agresszívak, jobban kezelhetőek, könnyebben kézben tarthatóak a reakciók során a fent említett gyökökhöz képest (Cao és mtsai., 1993; Halliwell és Gutteridge, 1995). A gyökök befogása függ a közegtől is, hiszen például a

C-vitamin hatásos hidrofil gyökök ellen, de nem a lipofilekkel szemben (Wu és mtsai., 2004).

6. Mintamátrix – sav, cukor, fehérje, aminosav stb. tartalom, egyéb interferenciát okozó komponensek, amelyeknek az alkalmazott hullámhosszon van elnyelése.
7. Fényérzékenység.
8. Hőmérséklet érzékenység.
9. pH
10. Idő, hiszen egyes komponenseknek nagyobb lehet az időigénye, akár több óra is.
11. Reakciósebesség, reakció kinetika.
12. Méretből, illetve szerkezetből adódó különbség, például a kisebb antioxidánsok hozzáférése a nagyobb szabadgyökhöz.
13. Additív, szinergens hatások stb.

Több kutatási munka is kimutatta, hogy a gyümölcs vagy zöldség fajok, valamint az azonos fajon belüli fajták között többszörös antioxidáns kapacitásbeli különbséget lehet kimutatni. Ezek egy része a genetikai háttérnek tulajdonítható, de ugyanakkor az eredmények kialakításában fontos szerepet játszanak a különböző környezeti tényezők, éghajlat, csapadék mennyisége, napsütéses órák száma, fényviszonyok, származási hely, talaj tápanyag-ellátottsága, betegségek, növényi kártevők jelenléte stb. is (Girodon és mtsai., 1999; Duthie és Crozier, 2000; Gardner és mtsai., 2000).

Ha egy növényi mintát antioxidáns kapacitás szempontjából szeretnénk jellemezni, akkor erre számos lehetőségünk van, amint az az előzőekből kiderült. Fontos azonban azt is hangsúlyozni, hogy egy minta bizonyos komponenseinek a mennyisége is értékes információt nyújthat számos vonatkozásban. Ilyen például a C-, az E vitamin-, karotintartalom, össz-polifenol-illetve antocianin tartalom, fenolos savak – egyéb flavonoidok minősége és mennyisége. Ezen vizsgálatok az előzőeknél kézben tarthatóbbak, hiszen mindig csak egy-egy komponensre, vagy vegyületcsoportra fókuszálnak. Meghatározásuknál elsősorban a kromatográfiai módszerek terjedtek el. A következőekben a polifenolos vegyületek analízisével kapcsolatban szeretnék áttekintést adni a különböző lépések és lehetőségek rövid bemutatásával, hiszen doktori munkám során polifenolos komponensek vizsgálatával is foglalkoztam.

Polifenolos vegyületek vizsgálata:

Vizsgálatok irányvonala: A polifenolos/flavonoid komponensek vizsgálatait alapvetően kétféleképpen lehet csoportosítani:

- 1) kimondottan egy-egy komponens, vagy bizonyos komponensek jelenlétének kimutatása, illetve mennyiségi meghatározása, vagy
- 2) a minta teljes mintázatának minél szélesebbkörű megismerése a cél.

Ezek alapján megkülönböztetünk célkomponens („target”) és scannaló (kereső) módszereket (de Rijke és mtsai., 2006).

A célkomponens módszerek esetében a mintában előre meghatározott vegyületeket vizsgálunk, és a minőségi valamint a mennyiségi analízishez standardokat használunk. Ebben az esetben a minta-előkészítés során ügyelni kell arra, hogy a választott eljárás a célkomponensek kivonásához igazodjon (de Rijke és mtsai., 2006).

A scannaló vagy ún. profilozó módszereknél ezzel szemben a mintában megtalálható polifenol/flavonoid készlet minél teljesebbkörű megismerése a cél. Emellett az is fontos, hogy képes legyen a módszer fel nem fedezett komponensek/származékok kimutatására, illetve azonosítására (de Rijke és mtsai., 2006) is.

Mintaelőkészítések: Mindkét módszernél rendkívül fontos a megfelelő mintaelőkészítés, amelyeknél a következő - előzőekhez kapcsolódó - alapkérdéseket kell mérlegelni (Robards és Antolovich, 1997; Tura és Robards, 2002).

- célkomponenst keresünk vagy profilozni szeretnénk
- az aglikonok és/vagy a származékok is érdekesek számunkra
- a kötött formákat is vizsgálni szeretnénk, vagy csak a szabadon előfordulókat.

A mintaelőkészítést az előző támpillérek mellett természetesen, a lehető legjobban a mátrix határozza meg. Folyadékok (pl. bor) esetén sokszor csak egy egyszerű szűrést és többnyire hígítást alkalmaznak. Itt ügyelni kell a szűrő anyagára (ne kössön meg az analizálandó anyagból), a hígító pufferre, ami esetében fontos, hogy ne csapjon ki komponenseket stb. Minél egyszerűbb a minta-előkészítés, annál hitelesebb képet kapunk a minta eredeti összetételére vonatkozóan, azonban számos komponens kieshet az analízisből a mátrixhoz való kötöttsége vagy nem jól oldódása miatt (de Rijke és mtsai., 2006). Elsődlegesen a szilárd minták esetén bonyolódhatnak a lépések akár több órán át tartó extrakcióval, bepárlással, visszahígítással, tisztítással, viszont az analizálandó komponensek szélesebb körét lehet oldatba vinni. A legelterjedtebben alkalmazott oldószerek a metanol, etanol, víz, acetonitril és az etil-acetát. A hőmérséklet emelése, az ultrahangos vízfürdő segíthetik az extrakciót. Ha a kötött formákat vagy az aglikonokat vizsgáljuk, akkor elengedhetetlen a hidrolízis lépés, amire szintén többféle megoldás létezik (savas, lúgos, enzimés) (Robards és Antolovich, 1997).

Korábbi kutatómunkák során a mintákat elhidrolizálták, majd utána már csak az aglikonok alapján végeztek mennyiségi és minőségi analízist (Hakkinen és mtsai., 1999b). Ebben az esetben lényeges információvesztés történik, hiszen nem tudjuk, hogy a különböző komponensek

alapvetően milyen formában voltak jelen (Robards és Antolovich, 1997). Előnye az volt, hogy az azonosításhoz valamint a mennyiségi analízishez szükséges beszerzendő standardek mennyisége (elegendő csak az aglikonok) igen lecsökkenthető, és végeredményképp információ nyerhető például a minta összes kvercetin tartalmát, vagyis az aglikonként előforduló kvercetin + kvercetin glikozidokból/származékokból keletkező kvercetin mennyiségét illetően (ezek a vegyületek a hidrolízist követően már csak kvercetin aglikonként detektálhatók).

Komponensek elválasztása: A polifenolos vegyületek elválasztására leginkább a nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás technikák terjedtek el (de Rijke és mtsai., 2006). Ez általában gradines elúción alapszik, amely esetében az oldószer erőssége az idő előrehaladtával növekszik. Az alkalmazott oldószerek szerves (acetonitril, metanol, propanol) és vizes fázisból állnak. A megfelelő oszlop kiválasztása is elengedhetelen a komponensek elválasztásához, de az alapvető különbség a célkomponensek keresésével szemben az, hogy az esetben tudjuk mit keresünk (melyik komponenst/eket), míg profilozás esetén nem, vagy csak sejthetők a mintában előforduló komponensek minőségi paraméterei.

Komponensek detektálása: A detektálás során szívesen használatos az UV detektor, hiszen minden egyes polifenolos vegyület szerkezetéből adódóan rendelkezik legalább egy UV abszorpciós maximummal. Léteznek még fluorszcenciás, elektrokémiai, kapilláris elektroforézisen alapuló vagy gázkromatográfiás stb. detektálási lehetőség is, de helyettük inkább a tömegspektrometriás detektorok használata terjedt el (de Rijke és mtsai., 2006). Az ún. MS/MS vagy az MSⁿ rendszerek kitűnően alkalmasak bonyolultabb detektálási feladatok elvégzésére. Ionforrásként elsődlegesen APCI-t (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) légköri nyomáson történő kémiai ionizációt vagy az ESI-t (Electrospray Ionisation) elektroporlasztásos ionizációt használnak, általában negatív ionizációs módban. Ezekkel a rendszerekkel a kérdéses molekula ionizációja, majd ezt követően fragmentálása érhető el (Molnar-Perl és Fuzfai, 2005). A keletkező fragmensekből következtetni lehet a molekulához kapcsolódott szubsztituensekre. Ezzel összefüggésben számos tanulmány jelent meg az egyes flavonoidok jellegzetes fragmentációs útjáról (de Rijke és mtsai., 2006; March és mtsai., 2006). A fragmentációs utak az alkalmazott ionforrás típusától döntőre szét függetlenek, azonban a készülék paramétereinek megválasztása a keletkező fragmensek relatív intenzitásában jelentős különbséget okozhat (de Rijke és mtsai., 2006). A legfejlettebb laboratóriumokban, kutató intézetekben lehetőség van a HPLC-MS-NMR csatolt rendszer használatára is, ami a mai szerkezetkutatás csúcspontjának számít (Molnar-Perl és Fuzfai, 2005).

A továbbiakban flavonoid származékok, elsősorban flavonoid mono- és diglikozidok azonosítását célzó módszer elvét szeretném röviden bemutatni, mert munkám során én is ezt a

háromlépéses HPLC-ESI-MS/MS módszert (Rak és mtsai., 2010) alkalmaztam a mintáim flavonoid glikozid profiljának a meghatározásához.

A három lépéses HPLC-ESI-MS/MS módszer elméleti alapját képezi az a megállapítás, hogy a flavonoidszármazékok mindegyike jól definiálható „építőkövekből” épül fel (különböző szacharid alegységek, fenolos savak) továbbá, hogy részegységeként tartalmazzák magát a flavonoid aglikont (Rak és mtsai., 2010). Ezen flavonoidszármazékok tömegspektrometriás vizsgálatokor, a molekulák fragmentációjakor jellemzően az építőegységek közötti kötések hasadásával keletkező termékionok dominálnak a spektrumban (Vukics és Guttman, 2010). E fragmentációs szabályszerűségeket kihasználva kellő biztonsággal becsülhető a flavonoidszármazékban megtalálható aglikon és a molekula felépítésében résztvevő további részegység. Az említett jellegzetes fragmentációs viselkedésen alapuló minőségi azonosítás alapvető feltétele azonban, hogy az elméletben adódó lehetőségeket egy megfelelő tömegspektrometriás vizsgálati protokoll segítségével valósítsuk meg. Ehhez a már említett háromlépéses HPLC-ESI-MS/MS módszert alkalmaztam. A módszer „lépéseinek” menete és a lényege röviden a következő (Rak és mtsai., 2010):

1. lépés. A mintában megtalálható flavonoidszármazékok körének behatárolása az aglikon részegységek monitorozásával. E lépés során a forrásban történő fragmentáció eredményeként kizárólag a képződő aglikon fragmensekre összpontosít a módszer. Ez alapján információhoz jutunk arról, hogy a vizsgált mintában hányféle olyan származék található, mely egy adott aglikonhoz köthető. Ebben a lépésben egy kromatográfiás futás alatt gyakorlatilag tetszőleges számú aglikon monitorozható.

2. lépés. Ebben a lépésben történik azon további részegységek, illetve magának a kiindulási molekula tömegének azonosítása, amelyekből az előző lépés során azonosított aglikon részegység származhat. Az azonosítás itt oly módon történik, hogy az MS vizsgálat eredményeképpen kapott tömegszámokhoz elméleti alapon lehetséges származékokat rendelünk. Ezt a hozzárendelést az adott aglikonnak a különböző elméleti származék-kombinációit tartalmazó adatbázis alapján végezzük. Megjegyzendő, hogy az azonosítás korlátait döntő mértékben az adatbázis kiterjedtsége szabja meg.

3. lépés. Ebben a lépésben a 2. lépésben feltételesen azonosított származékok megerősítő igazolása történik. Ennek során a feltételezett származékokat – immáron ismertnek tekintett tömegük alapján – célkomponensként vizsgáljuk. A megerősítés akkor tekinthető pozitívnak, ha a vizsgált célkomponens fragmentációs képe a feltételezett molekulára jellemző fragmenseket tartalmazza.

Mindezek kapcsán azt is lényeges szem előtt tartani, hogy az imént bemutatott technikák drágák, általában hosszabb mintaelőkészítést igényelnek stb. viszont a minták összehasonlításánál kifinomultabb információt nyújtanak. Az így felszínre kerülő különbségek (például az egyes vegyületek-komponensek szerkezetében rejlő különbségek) hasznosak lehetnek nemcsak az egyes minták antioxidáns kapacitásukban való eltérésének magyarázatánál, hanem az emberi szervezetben való hasznosulásuk vonatkozásában is (Stevenson és Hurst, 2007).

Ezen felül fontos megemlíteni, hogy a vizsgálataink többnyire a táplálékból szerzett antioxidánsok mérésére korlátozódnak, holott az antioxidáns kapacitáshoz a különböző enzimek is nagymértékben hozzájárulnak (Ghiselli és mtsai., 2000). Emellett nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az antioxidánsoknak az emberi szervezetben való felszívódása, hozzáférhetősége is szerepet játszik valódi hatásosságukban (Roginsky és Lissi, 2005).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A bogyós gyümölcsök kiemelkedő antioxidáns hatása jól ismert számos nemzetközi irodalmi adat alapján. Ehhez csatlakozva munkám célja a Magyarországon azonos körülmények között termesztett, jelentősebb bogyósgyümölcs-fajok és -fajták antioxidáns kapacitásának felmérése illetve összehasonlítása volt, különös tekintettel arra, hogy az adott különbségek kialakulása milyen vegyületeknek köszönhető.

1. Elsődleges célom az volt, hogy a különböző elveken alapuló (elektronátmenettel járó, hidrogénatom-átmenettel járó), illetve más-más szabadgyököket (DPPH, ABTS, szuperoxid anion, hidroxilgyök) alkalmazó módszerek segítségével átfogó jellemzést tudjak adni a vizsgált gyümölcsök aktuális antioxidáns kapacitásáról, valamint feltárjam a kapott eredmények közötti összefüggéseket.
2. További fontos cél volt, az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó aszkorbinsav mennyiségi meghatározása és a polifenolos vegyületek minőségi és mennyiségi vizsgálata is (ezen belül antocianinok, fenolos savak és flavanolok [epicatechin és katechin]), amelyek magyarázatot adhatnak a különböző antioxidáns kapacitást mérő módszerekkel kapott eltérő eredményekre.
3. Emellett célul tűztem ki az alkalmazott antioxidáns kapacitást mérő módszerek és a mennyiségileg meghatározott komponensek közötti összefüggések feltárását is.
4. Ahhoz, hogy a bogyós-gyümölcsök szuperoxid-anionnal szembeni viselkedését vizsgálni tudjam, az ehhez szükséges viszonylag új, kereskedelmi forgalomban kapható, fotokemilumineszcenciás elven működő antioxidáns kapacitást mérő készülék (Photochem, Analytic Jena) tesztelését kellett először elvégeznem néhány standard (aszorbinsav, citromsav, galluszsav, trolox) esetében. Ezen belül az alkalmazott metodika előnyeinek és hátrányainak megismerését, a készülék használhatóságát tűztem ki célnak, mivel az erre vonatkozó irodalmi adatok meglehetősen hiányosak.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérletek, mérések helye

Az analitikai mérések a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszékén, a Semmelweis Orvostudományi Egyetem 2. számú Belgyógyászati Klinikáján és a Mendel Egyetem Kémia és Biokémia Tanszékén történtek.

4.2. Növényanyag

Munkám során a bogyós gyümölcsökön belül a szamóca (*Fragaria x ananassa* DUCH.), a málna (*Rubus idaeus* L.), a piros (*Ribes rubrum* L.) és fekete ribiszke (*Ribes nigrum* L.) fajokat és azon belüli fajtákat (4. táblázat) vizsgáltam.

4. táblázat. A vizsgálatok során felhasznált gyümölcsfajok és -fajták felsorolása

Szamóca (<i>Fragaria x ananassa</i> DEUCH)	Málna (<i>Rubus idaeus</i>)
Elsanta	Malling Exploit
Honeoye	Fertődi Zamatos
Onebor	Glen Ample
Piros ribiszke (<i>Ribes rubrum</i> L.)	Fekete ribiszke (<i>Ribes nigrum</i> L.)
Rondom	Fertődi 1
Detvan	Fertődi 11
Jonhkeer van Tets	Titánia
	Otelo

Minták származása: A minták azonos termőhelyről (Agárd, 2008) származtak, termesztésük azonos körülmények között valósult meg.

Növényi mintavétel: A gyümölcsök mintavételezése piaci érettségben történt. Minden egyes fajtából 1,5-2 kg gyümölcs gyűjtésére került sor (a szamócánál 30 tő, a málnánál 20 tő, a ribiszkék esetében 20 bokor mintázása során).

Növényanyag feldolgozása: A friss gyümölcsök azonnal feldolgozásra kerültek. Első lépésben a gyümölcsöket fajtánként 3 részre osztottam majd a mintákat homogenizáltam (háztartási turmixgép). A homogenizált minták egy részét elkülönítettem szárazanyagtartalom meghatározásának céljából másik részét a minták liofilizálásig (ScanVac liofilizáló, Dánia) fagyasztóban tároltam (-32°C). Az analitikai vizsgálatokig a már liofilizált minták tárolása szobahőmérsékleten fénytől elzártan történt.

4.3. Felhasznált vegyszerek, reagensek

A Folin-Ciocalteu reagenst, az ABTS-t (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav), a DPPH-t (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), a nátrium karbonátot, a TPTZ-t (2,4,6-tripiridil-S-triazin), a kristályvizes vaskloridot, a mikroperoxidázt, továbbá az apigenin, luteolin, miricetin, naringenin, kvercetin, daidzein, genisztein, heszperitin, fizetin, 4-hidroxi-benzoészav, t-fahéjsav, p-kumársav, vanilinsav, galluszsav, kávéészav, ferulasav, sziringinsav, szinapinsav, ellágsav valamint katechin és epikatechin standardokat a Sigma (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) cégtől vásároltuk. A HPLC tisztaságú metanolt, acetonitrilt és hangyasavát a Scharlau cégtől (Barcelona, Spanyolország) szereztük be. Az L(+)-aszkorbinsavát, az L-ciszteint, a metafoszforsavát, oxálsavát, a káliumperszulfátot, a citromsavát, luminolt, a hidogénperoxidot valamint a troloxot a Merck Chemicals Hungary cégtől vásároltuk. A fotokemilumineszcenciás antioxidáns kapacitás méréséhez szükséges reagenseket (kitteket) a BPS Business Power System Kft.-n keresztül a gyártótól (Analytic Jena, Németország) vásároltuk. A nagytisztaságú vizet (18 M Ω) a tanszéken üzembe helyezett Milli-Q rendszerből nyerjük.

4.4. A mérések során használt készülékek

A spektrofotometriás méréseket az alábbi spektrofotométereken végeztem el: Nicolet Evolution 300, valamint a TEAC módszer esetén egy Evolution 200 (Thermo Scientific Electron, Hollandia) típusú spektrofotométert használtam. A fotokemilumineszcenciás mérések a Photochem készülékkel (Analytic Jena, Németország) történtek. A luminometriás mérések elvégzéséhez Lumat 9501 (Berthold, Németország) luminométert használtam. A C-vitamin tartalom meghatározását Agilent 1200 HPLC-n végeztem el, míg a flavonoid valamint a fenolos savak meghatározását Agilent 1100 HPLC rendszer és hozzacsatlakoztatott Applied Biosystem által forgalmazott 3200 Q-Trapp hibrid triple quadrupol/linear ion trapp MS/MS rendszer segítségével végeztem el. Az ionforrás Turbo-V ESI rendszerű volt (negatív ionizációs mód).

4.5. Mintaelőkészítések és vizsgálati módszerek

A vizsgálatokoz kidolgozott mintaelőkészítések rövid bemutatását az arra vonatkozó módszerleírás követi. Az egyes irodalmakban részletesen leírt módszereket csupán nagyvonalakban ismertetem, azonban a kromatográfiás technikákkal és a módosított mintaelőkészítésekkel részletesen foglalkozom.

4.5.1. Szárazanyagtartalom meghatározása

A korábbiakban említett módon homogenizált (lásd növényanyag feldolgozás) gyümölcsök szárazanyagtartalmának meghatározás az MSZ:2429-1980 szabvány alapján történt.

4.5.2. Mintaelőkészítések és összzantioxidáns kapacitás meghatározások

A fotokemilumineszcencia elvén működő Photochem készülék tesztelésére aszkorbinsav, citromsav, galluszsav és trolox standardakat használtam. A szilárd standardakat feloldottam a módszerhez megkívánt oldószerben (vízoldható antioxidáns kapacitás meghatározása esetén, vízben, zsíroidható antioxidáns kapacitás esetén metanolban) és a továbbiakban az így keletkező törzsoldatot használtam a mérésekhez. Az eredmények kiértékelésénél ismertett adatok három független bemérés három – három párhuzamos mérési eredményeit tartalmazzák.

A gyümölcsök összzantioxidáns kapacitás vizsgálatához a következő mintaelőkészítést alkalmaztam: minden egyes összzantioxidáns kapacitás meghatározásához a korábbi tapasztalataimnak megfelelően 10 mg/ml töménységű minta-törzsoldatot készítettem. (A módszerekhez megkívánt oldószer a víz volt, illetve a zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározásához (az ACL módszerhez) a metanol). Ezt követően a mintát centrifugáltam (Hettich Mikro 22 R, 13 500 rpm, 25 perc, 4 °C). A további vizsgálatokat a tiszta felülúszóból végeztem el a módszereknek megfelelően. Az eredmények kiértékelésénél ismertett adatok három független bemérés három – három párhuzamos mérési eredményeit tartalmazzák.

Itt kívánom megjegyezni, hogy a vizsgálataim során más oldószert (aceton) valamint különböző arányú metanol:víz elegyet (30:70, 50:50) is kipróbáltam néhány mérés alkalmával, de ezen adatokat a dolgozat nem tartalmazza. Végso soron azért döntöttem a vizes és csupán egy módszerhez megkövetelt metanolos kioldás (fotokemilumineszcenciás módszer, zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározás) során kapott adatok közlése mellett, mert a gyümölcsöket elsősorban magában (vizes közeg) és csak igen ritkán alkohol kíséretével (kivétel például a szőlő vonatkozásában a bor) fogyasztjuk.

4.5.2.1. Hidrogén atom átvitelen alapuló (HAT) módszerek

4.5.2.1.1. Víz- és zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározása

A víz- és zsíroidható antioxidáns kapacitás meghatározása Popov és Lewin (1994,1996) által leírt fotokemilumineszcencia elvén történt. Az eredményeket vízoldható antioxidáns kapacitás esetében mg aszkorbinsav/g szárazanyag, míg zsíroidható antioxidáns kapacitás esetében mg trolox/g szárazanyagban adtam meg. A mérés menete a gyártó cég által kiadott dokumentációban megfogalmazottak alapján történt (Analytic Jena, 2003).

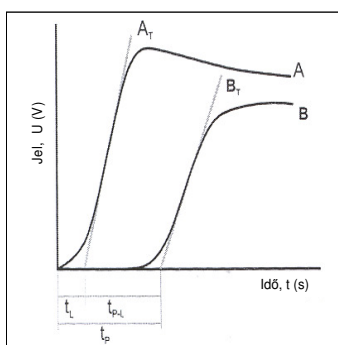
A vízzoldható antioxidáns kapacitás (ACW) vizsgálatához szükséges reagenseket a **5. táblázat** foglalja össze.

5. táblázat. Az ACW méréshez szükséges reagensek (kittek)

Reagens 1	hígító oldat
Reagens 2	puffer
Reagens 3	fényérzékenyítő és detektor reagens
Reagens 4	kalibrációs standard (aszorbinsav)

A reagensek pontosabb összetétele, koncentrációjára a gyártó nem tesz utalást, és nem ad ki több információt. A gyártó által ajánlott irodalmak kapcsán Popov és Lewin (1994, 1996) írásai alapján sejteni lehet, hogy a fényérzékenyítő és detektor reagens (reagens 3) a luminol, valamint, hogy EDTA-t tartalmazó karbonát pufferről pH= 10,6 (reagens 2) lehet szó. A készülék szoftvere a minta és a vak oldat ún. lag fázisának (**16. ábra**) meredeksége felhasználásával automatikusan koncentrációt (nmol aszorbinsavra vonatkoztatva) számol, az alábbiak alapján:

- A görbe első deriváltjának meghatározása
- Az inflexiós pont meghatározása, ezen keresztül érintő meghúzása
- A x tengelyen kimetszett szakasz meghatározza a lag fázis idejét
- A vak és a minta lag fázis ideje közti különbség megadja az antioxidáns kapacitásra jellemző paramétert
- A kalibrációnak megfelelően a standardra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás meghatározása



16. ábra. A vak (A) és a minta (B) lag fázisa közti idő eltolódás (Analytic Jena, 2003)

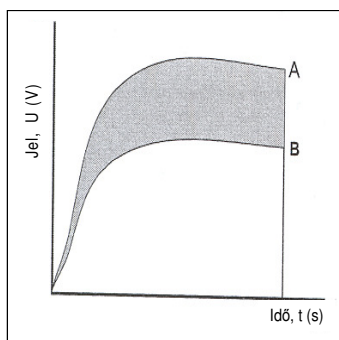
A zsírozható antioxidáns kapacitás (ACL) vizsgálatához szükséges reagenseket a **6. táblázat** foglalja össze.

6. táblázat. Az ACL méréshez szükséges reagensek (kittek)

Reagens 1	metanol
Reagens 2	puffer
Reagens 3	fényérzékenyítő és detektor reagens
Reagens 4	kalibrációs standard (trolox)

A reagensek ennél pontosabb összetétele nem ismert. A mintákat szükség szerint metanollal kell hígítani a kalibrációnak megfelelő mértékben. Az eredmények kiértékelését a szoftver automatikusan elvégzi a vak- és a minta görbe alatti területének (17. ábra) felhasználásával, nmol troloxra vonatkoztatva. A gátlás meghatározását a szoftver az alábbi összefüggés alapján számolja ki:

$$\circ (\int \text{vak} \text{ átlag} - \int \text{minta}) / \int \text{vak} \text{ átlag}$$



17. ábra. A vak (A) és a minta (B) integráltjának különbsége a mérés során (Analytic Jena, 2003)

4.5.2.1.2. Összantioxidáns kapacitás meghatározása kemilumineszcencia elvén (TRSC módszer, Total Radical Scavenger Capacity)

A minták össz-gyökbefogó kapacitását Berthold Lumat 9501 készülékkel, kemilumineszcenciás módszerrel $\lambda = 420$ nm határoztam meg (Blázovics és mtsai., 1999). A kémiai reakció a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^\bullet$ mikroperoxidáz-luminol rendszer gátlásán alapszik. A $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^\bullet$ mikroperoxidáz-luminol rendszer lúgos pH-n fényt bocsát ki, mert a komplex vas hatására a H_2O_2 -ből $\text{OH}^\bullet$ gyök keletkezik Fenton-típusú reakcióban, és a gyök gerjeszti a luminolt. A luminol aminosftalát stabil anionná alakul át és $h\nu$ kvantum ($\lambda=420$ nm) távozik. Ha a rendszerhez bármilyen szöveti mintát, szuszpenziót adunk, akkor a kemilumineszcencia gátlódni fog. A gátlás mértéke és a vizsgált biológiai anyag redox tulajdonsága között kapcsolat igazolható. Az ún. össz-scavenger kapacitás értéke annál kisebb, minél gyengébb a szöveti antioxidáns aktivitás, és minél nagyobb a vizsgált mintában a gerjeszthető szabadgyökös reakció. Az eredményeket az RLU %-ban adtam meg (RLU = relative light unit), amit a következő képlet alapján számolható: $\text{RLU}\% = \text{RLU}_{\text{minta}} * 100 / \text{RLU}_{\text{vak}}$

4.5.2.2. Elektron átvitelen alapuló (ET) módszerek

4.5.2.2.1. Összantioxidáns kapacitás FRAP módszerrel

A FRAP értékek meghatározása Benzie és Strain módszere (1996) alapján történt spektrofotometriásan ($\lambda=593$ nm). A FRAP módszer lényege, hogy a ferri-(Fe^{3+})-ionok az antioxidáns aktivitású vegyületek hatására ferro-(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). Az abszorbanciát 5 perc eltelté után mértem. Az eredményeket aszkorbinsavval készített kalibrációs görbe segítségével értékeltem ki, így azokat mg aszkorbinsav/g szárazanyagban adtam meg.

4.5.2.2.2. Összpolifenoltartalom – TPC módszer

A módszer alapján a következő lépésekben történt a mintaoldat összeállítása: 1250 μl Folin-Ciolteau reagenst, 200 μl metanol-víz elegyet (4:1) és 50 μl mintát összekevertem, majd 1 perc után 1000 μl nátrium karbonát oldatot (0,7 M) adtam az oldathoz. A kalibrációs egyenest galluszsav segítségével vettem fel. Az összeállított kémcsöveket 5 percre 50 °C-os vízfürdőbe tettem. A reakció során keletkező kék színű vegyület mennyisége fotometriásan meghatározható $\lambda=760$ nm-en (Singleton és Rossi, 1965). Az eredményeket mg galluszsav/g szárazanyagban adtam meg.

4.5.2.2.3. TEAC módszer

Az ABTS gyök semlegesítésén alapuló módszert Stratil és munkatársai leírása alapján (2006) végeztem el. Az ABTS gyökképzés a következők szerint történt: kálium perszulfát (4, 95 mmol/L) és ABTS (7 mmol/L) 1:1 arányú oldatát 12 órára sötétben, szobahőmérsékleten állni hagytam. Az oldatból 980 μl -t 20 μl mintaoldattal egészítettem ki, majd 1000 μl desztillált vizet adtam hozzá. Az abszorbanciát $\lambda=734$ nm-en 20 perc eltelté után mértem. Trolox oldatot használtam kalibrációs standardnak, az eredményeket mg trolox/g szárazanyagban adtam meg.

4.5.2.2.4. DPPH megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás módszer

A minták antioxidáns kapacitása meghatározható 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) stabil szabadgyök semlegesítésének vizsgálatával is, spektrofotometriásan $\lambda=517$ nm-en (Hatano és mtsai., 1988). A mérés menete: 1 ml metanolos DPPH oldathoz (100 ml metanolban 9 mg DPPH van feloldva) 50 μl mintát és 950 μl vizet adtam, majd a mintaelegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltam. Az eredményeket gátlás %-ban adtam meg.

4.5.3.Összantocianin tartalom

20 mg liofilizált mintát 10 ml desztillált vízben feloldottam, majd a mintákat centrifugáltam (Hettich Mikro 22 R, 13 500 rpm, 25 perc, 4 °C). Ezt követően két oldatot készítettem: 2 ml tiszta felülúszóhoz 2 ml kálium-klorid puffert (pH=1), illetve 2 ml tiszta felülúszóhoz 2 ml nátrium-acetát puffert (pH=4,5) adtam. Negyed óra eltelte után az abszorbanciájukat $\lambda=520$ és $\lambda=700$ nm-en mértem meg (Giusti és Wrolstad, 1996). Az eredményeket mg cianidin-3-glükozidra/g szárazanyagra vonatkoztattam. Az eredmények kiszámítása a következők alapján történt: $\text{Abszorbancia}=(A_{520}-A_{700})\text{pH}_{1,0}-(A_{520}-A_{700})\text{pH}_{4,5}$
 $\text{Összantocianin tartalom (mg/L)}=(A \cdot M \cdot \text{hígítás} \cdot 1000)/(\epsilon/l)$, ahol $M=449,2$ g/mol és $\epsilon=26900$

4.5.4. C-vitamin-tartalom meghatározása

A C-vitamin meghatározásához a mintaelőkészítés a következők szerint történt: A 100 mg liofilizált mintából 10 ml 2%-os metafoszforsav oldattal összerázás után 10 percre ultrahangos vízfürdőbe helyeztem, majd a mintákat 8 °C-on, 6000 rpm fordulatszámon, 20 percig centrifugáltam. A felülúszót 0,45 μm -es pórusátmérőjű membrán szűrővel szűrtem. A szűrletből 5 ml-t sötét üvegedénybe tettem és 2,5 ml 4%-os L-ciszein oldatot adtam hozzá. Az oldat pH-ját 12,5 %-os ammónia oldattal 7 és 7,2 közötti értékre állítottam, és öt percen keresztül mágneses keverővel kevergettem. Az öt perc elteltével 20%-os metafoszforsavval a pH- t 2,5 és 2,8 közé állítottam be. A kívánt pH elérése után az oldatot MilliQ vízzel 10 ml-re egészítettem ki, majd 0,22 μm -es pórusátmérőjű membrán szűrővel szűrtem. Ezt az oldatot használtam a HPLC-s elválasztás során.

Az L(+)-aszkorbinsav mintában történő beazonosítása retenciós ideje alapján történt (Engel és mtsai., 2010). Az eredményeket mg aszkorbinsav/g szárazanyagban adtam meg. Az elválasztás és a mennyiségi meghatározás a következő kromatográfiás feltételek között valósult meg:

- Állófázis: 3,2 x 150 mm Restek Ultra Aqueous C18, 5 μm oszlop
- Mozgófázis: A: H₂O + 0,1% HCOOH
B: Metanol+ 0,1% HCOOH
- Áramlási sebesség: 500 μl /perc
- Időtartam: 4 perc
- Injektálási mennyiség: 5 μl
- Oszlop hőmérséklete: 30 °C
- Nyomás: 100 bar
- Detektálás: 285 nm

4.5.5. Fenolos savak, katechin és epikatechin mennyiségi vizsgálata

A minta-előkészítések Harbaum és munkatársai (2007) leírásának módosítása alapján történtek. A fenolos savak meghatározásához: 0,3 g liofilizált mintát 4 ml vizes metanolban feloldottam (50% metanol:50% víz, amely tartalmaz 1% m-foszforsavat és 0,5% oxálsavat). Az 1 perces ultrahangos feltárást 5 perc 6000 rpm-en 4 °C-on centrifugálás követett. A felülúszó szűréséhez 0,45 µm-es membránszűrőt használtam. A membránszűrés után azonos mennyiségű 2 M-os NaOH hozzáadásával 15 óra időtartamú kevertetés mellett az oldatot lúgosan hidrolizáltam, majd cc. HCl-ot adtam hozzá, hogy a kívánt 2-es pH alatti pH-t elérjem (Harbaum és mtsai., 2007).

A bogyós gyümölcsök fenolos sav vizsgálata standard addíciós technika segítségével történt. A **7. táblázat**ban összefoglaltak alapján az elválasztás gradiens elúcióval történt és a következő kromatográfiás feltételek között valósult meg:

7. táblázat: A fenolos savak, a katechin és epikatechin elválasztásához alkalmazott gradiens program

Idő (perc)	A (%)	B (%)
0-2	98	2
2-11	70	30
11-12	1	99
12-15	98	2

- Állófázis: 2,1 x 50 mm Agilent Zorbax, 1,8 µm oszlop
- Mozgófázis: **A:** H₂O + 0,1% HCOOH
B: Acetonitril+ 0,1% HCOOH
- Áramlási sebesség: 400 µl/perc
- Injektált mennyiség: 3 µl
- Nyomás: 240 bar

A következő standardok álltak rendelkezésemre:

4-hidroxi-benzoésav, t-fahéjsav, p-kumársav, vanilinsav, galluszsav, kávésav, ferulasav, sziringinsav, szinapinsav, ellágsav, valamint katechin és epikatechin

4.5.6. Flavonoid mono- és diglikozidok meghatározása

A minta-előkészítést a következőképpen végeztem el (Chen és mtsai., 2007): 500 mg liofilizált mintát 30 ml 80% víz : 20% metanolban feloldottam, majd 30 percig szobahőmérsékleten ultrahangoztam. A felülúszó szűréséhez 0,45 µm-es membránszűrőt használtam, az így kapott szűrletet használtam a további vizsgálatokhoz.

A bogyós gyümölcsök flavonoidvizsgálata nontarget HPLC-ESI-Ms/Ms módszerrel-három lépéses technika MRM-Fullscan-EPI módok alkalmazásával történt (Rak és mtsai., 2010).

A **8. táblázat**ban összefoglaltak alapján az elválasztás gradiens elúcióval történt, és a következő kromatográfiás feltételek között valósult meg:

8. táblázat. A flavonoidok elválasztásához alkalmazott gradiens program

Idő (perc)	A (%)	B (%)
0-1,5	97	3
1,5-35	70	30
35-40	1	99
40-45	97	3

- Állófázis: 2,1 x 50 mm Agilent Zorbax, 1,8 µm oszlop
- Mozgófázis: **A:** H₂O + 0,1% HCOOH
B: Acetonitril + 0,1% HCOOH
- Áramlási sebesség: 300 µl/perc
- Időtartam: 45 perc
- Injektált mennyiség: 3 µl
- Oszlop hőmérséklet: 40°C
- Nyomás: 190 bar

Az alkalmazott módszer nontarget-módszer, amelynek segítségével az alábbi flavonoid-aglikonok származékainak (glikozidok) kimutatására is képes: apigenin, daidzein, fizetin, genisztein, heszperetin, kempferol, kvercetin, luteolin, miricetin, naringenin, vagyis a felsorolt aglikonok minden előforduló cukorszármazékának felkutatására lehetőség van. A három lépés lényege röviden, a következő:

1.lépés MRM mód (multiple reaction monitoring)

Ebben a módban az aglikonok 2 kiválasztott legjellemzőbb átmenetének (**9. táblázat**) a mérés alatti intenzitását lehet nyomon követni. A mérés során a műszer jelet ad akkor is, ha az aglikonhoz valamilyen -például cukor-komponens kapcsolódik. Ezzel nyílik lehetőség arra, hogy ne csak az aglikonokat, hanem egyéb, az aglikonra jellemző 2 átmenetet adó komponensek is detektálhatók legyenek.

2.lépés Fullscan

Ebben a lépésben egy teljes scant kell lefuttatni az m/z = 250-900 tartományban. Az előző módban, ahol bejelzett a műszer a 2 átmenetre, azoknál a retenciós időknél a fullscanból a kérdéses komponens tömegszáma megismerhető.

3.lépés EPI módszer (enhanced product ion)

Ebben a módban lehetőség van a harmadikszintű megerősítő lépésre. Itt ugyanis az adott aglikonra jellemző fragmentációs kép segítségével meg lehet erősíteni a molekulának a beazonosítását.

9. táblázat. A módszerben szereplő aglikonok jellemzői

Aglikon	MW	Quantifier	Qualifier
apigenin	270	117	149
daidzein	254	133	132
fizetin	286	135	121
genisztein	270	133	159
heszperetin	302	164	136
kemferol	286	117	93
kvercetin	302	151	179
luteolin	286	133	151
miricetin	318	151	137
naringenin	272	177	119

4.5.7. Statisztikai elemzések

Az ábrákon feltüntetett eredmények a párhuzamos mérések átlagait és a szórásokat tartalmazzák. Az egyszempontos varianciaanalízist, a szignifikancia-vizsgálathoz a Tuckey's tesztet ($p < 0,05$), valamint a korrelációs analízist a Statistica 6.0 program Stat Soft segítségével végeztem el. Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$).

A méréseim során a flavonoid-mintázattal kapcsolatban főkomponens analízist (PCA, Principal Component Analysis) is végeztem. A főkomponens analízis széles körben alkalmazott többváltozós statisztikai módszer, amely nagyméretű adatmátrixokban lévő változók számának a csökkentésére alkalmas. A PCA algoritmus a flavonoidokra vonatkozó adatmátrixot néhány ortogonális vektorral (főkomponenssel) helyettesíti, úgy, hogy az első vektor (első főkomponens) reprezentálja az eredeti adatmátrix varianciájának a legnagyobb százalékát, a második vektor (második főkomponens) reprezentálja az adatmátrix varianciájának második legnagyobb százalékát, és így tovább.

A flavonoid mérések során arra volt lehetőségem, hogy a flavonoidok minőségi vizsgálatait végezzem el, ezért egyes komponensek meglétét 1-es számmal, míg azon komponenseket, amelyeket a kifejlesztett analitikai lépések nem tudtak megerősíteni, vagy egyszerűen nem voltak kimutathatóak az adott mintában, 0-s számmal jelöltem. Azokat a csúcsokat vettem figyelembe a **21. táblázat** készítése során, amelyek intenzitása eléri a minimum, 500 cps-t (beütésszám/másodperc). Az e módon kialakult mátrixot használtam a statisztikai elemzés elvégzéséhez.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az eredményeket két külön alfejezetben értékelem a könnyebb áttekinthetőség érdekében.

Az első alfejezetben tárgyalom az Alkalmazott Kémia Tanszékre került Photochem készülékkel történt fotokemilumineszcencia elvén működő antioxidáns kapacitás mérésének eredményeit, az azzal kapcsolatos problémákat, nehézségeket, a standard oldatokra vonatkozólag, mind az ACW (vízoldható antioxidáns kapacitás), mind az ACL (zsíroidható antioxidáns kapacitás) rendszerben.

A második alfejezetben a gyümölcsmintákkal kapcsolatban kapott több módszerrel mért antioxidáns kapacitás mérések, illetve az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó komponensek vizsgálata során kapott eredmények kerülnek bemutatásra.

5.1. A Photochem készülék tesztelése

A Photochem készülék teszteléséhez 4 standardot választottam, az aszkorbinsavat és a troloxot, annak érdekében, hogy e két vegyület visszamérhetőségét teszteljem, a galluszsavat, azért, mert jelentős antioxidáns a bogyós gyümölcsökben, a citromsavat - lévén, hogy nem elsődleges antioxidáns, csupán azért, hogy nyomon követhessem viselkedését a mérések során. A mérések egyrészt a készülék használhatóságát, másrészt egyes analitikai paramétereinek, teljesítményjelzőinek felderítését célozzák (pontosság, érzékenység). A Photochem készülékkel kapcsolatos eredmények a következő logika szerint kerülnek bemutatásra:

Aszkorbinsavval végzett kísérletek:

- A készülék a vízoldható antioxidáns kapacitás esetén (ACW) aszkorbinsavra vonatkoztatja a kapott eredményeket. Céлом az volt, hogy általam készített, ismert koncentrációjú aszkorbinsav oldatokat mintaként bejuttatva a rendszerbe (visszamérés), megtudjam, hogy azt milyen koncentrációjúnak, vagyis mekkora aszkorbinsavra vonatkoztatott antioxidáns kapacitásúnak határozza meg (pontosság).
 1. Első lépésben céлом az volt, hogy választ kapjak arra, hogy az aszkorbinsav törzsoldatának különböző hígításaival azonos mennyiség bevitele esetén az eredmények hogyan viszonyulnak egymáshoz ACW módban (érzékenység).
 2. A következő lépésben azt vizsgáltam, hogy a mérési tartományba eső aszkorbinsav koncentráció esetén, a protokoll által is javasolt (10-40 µl), különböző mintamennyiség a kapott eredményekre milyen hatással van ACW módban (érzékenység).

- Miután a készülék ACL módban is képes mérni (zsíroldható antioxidáns kapacitás), ezért azt szerettem volna megtudni, hogy az aszkorbinsav oldat reagál-e, illetve „ad-e jelet” ebben a módban, vagyis a leírás szerinti minta-előkészítést követve a készülék képes-e a zsíroldható antioxidánsokra jellemző görbét kirajzolni, és így troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitást számolni.

Galluszsavval végzett kísérletek:

- Elsődleges célom volt, hogy választ kapjak, hogy Photochem készülékkel mérve a galluszsavnak mennyi az aszkorbinsavra vonatkoztatott antioxidáns kapacitása ACW módban.
- Érdekelt továbbá az is, hogy galluszsav esetén a minta mennyisége a kapott eredményekre milyen hatással van ACW módban (érzékenység).

Citromsavval végzett kísérletek:

- Elsősorban arra kerestem a választ, hogy a műszer szerint a citromsav képes-e szuperoxid anion gyök befogására mind ACW, mind ACL módban, valamint ezek értelmében mennyi az aszkorbinsavra, valamint a troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitása.

Troloxszal végzett kísérletek:

- Arra kerestem a választ, hogy általam készített, ismert koncentrációjú trolox oldatokat mintaként bejuttatva a rendszerbe, megtudjam, hogy azt milyen koncentrációjúnak, vagyis mekkora troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitásúnak határozza meg (visszamérés) ACL módban (pontosság).

A standardoknak 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatát (minta) készítettem el az Anyag és módszerek fejezetben feltüntetett protokoll alapján, ezt követően a vak, a kalibrációs oldatok és a mintaként megmért standard oldatok görbéit felvettem a készülékkel. A táblázatokban feltüntetett adatok három független bemérés három-három párhuzamos mérésének átlagát tartalmazzák.

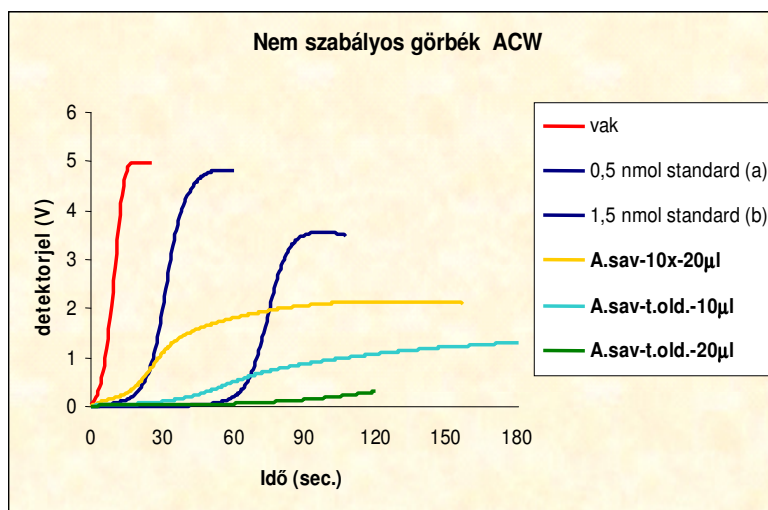
5.1. 1. ACW mérések

5.1.1.1. Vízoldható antioxidáns kapacitás meghatározása aszkorbinsav esetén

A kérdés elsősorban arra irányult, hogy ismert mennyiségű aszkorbinsavat megmérve ACW módban (visszamérés), a szoftver által számított érték mennyire tér el az általam bevitt mennyiséggel.

A hígítás hatása-pontosság

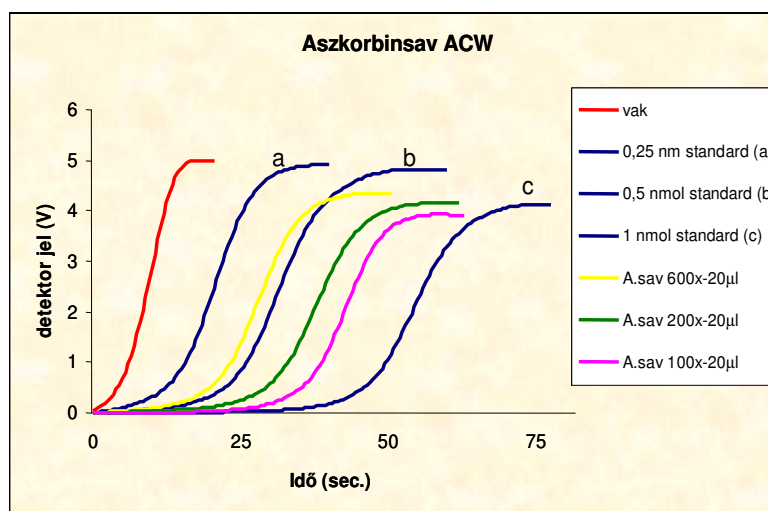
A törzsoldat illetve annak 10-szeres hígítása esetén a minta töménység bizonyult, ezért „nem szabályos” görbe lefutást (**18. ábra**) tapasztaltam. A gyártó által kiadott gépkönyv (Analytic Jena, 2003) leírásai alapján a mérés során jellegzetes lag fázis (**18. ábra**) figyelhető meg. Ezekben az esetekben ez a lag fázis elmaradt (**18. ábra**). Azonban ha a törzsoldatot 100-, 200- és 600-szorosra hígítottam (**19. ábra**) a mérések értékelhetők lettek.



18. ábra. Nem szabályos görbe lefutások ACW rendszerben

(Jelmagyarázat: A.sav 10x-20 µl, A.sav t.old.-10 µl, illetve A.sav t.old.-20 µl: 10-szeresre, hígított aszkorbinsav oldatból, valamint az 1 mg/ml-es törzsoldatból bevitt mintamennyisége 10 ill. 20 µl)

Ezek után minden hígításból 20-20 µl-t használtam fel a protokollnak megfelelően a mérésekhez. Azt vizsgáltam, hogy a hígítás milyen különbséget okoz a kapott eredményekben.



19. ábra. Az aszkorbinsav antioxidáns kapacitása ACW rendszerben

(Jelmagyarázat: A.sav 600x-20 µl, A.sav 200x-20 µl, illetve A.sav 100x-20 µl: 600-szorosra, 200-szorosra illetve 100-szorosra hígított aszkorbinsav oldatból bevitt mintamennyisége 20 µl)

A számolt mennyiség, amit a szoftver automatikusan kiszámol, 1000 µg aszkorbinsavra vonatkozik (**10. táblázat**). Ennek alapján 1000 µg aszkorbinsavat az első esetben a 100-szoros hígításnál a műszer átlagosan 920, 928, illetve 976 µg aszkorbinsavként érzékelt, a 200-szoros hígításnál 1017, 1042 és 1009 µg aszkorbinsavnak. Ezen esetekben a különbség 10% alatti, tehát elhanyagolható.

10. táblázat. Az 1 mg/ml-es aszkorbinsav törzsoldat esetében a hígítás hatása a szoftver által számolt értékre 1000 µg elméleti tömeghez viszonyítva.

Hígítás	Minta mennyiség (µl)	Számolt mennyiség (µg)	Különbség (µg)	Különbség (%)
100	20	920	-80	-8,0
100	20	928	-72	7,2
100	20	976	-24	-2,4
200	20	1017	17	1,7
200	20	1042	42	4,2
200	20	1009	9	0,9
600	20	1465	465	46,5
600	20	1387	387	38,7
600	20	1340	340	34,0

Nagyobb mértékű hígítás esetén (600-szoros) ez a különbség nőtt, az 1000 µg elméleti értékhez képest akár 34 - 46,5 %-kal, vagyis megállapítható, hogy a hígítás mértéke jelentős befolyással

van a kapott eredményekre. Minél jobban kell egy mintát hígítani (**19. ábra**) annál nagyobb hibát követünk el és a túl híg oldat esetén eltorzított hamiseredményt kaphatunk.

A mintamennyiség hatása-pontosság

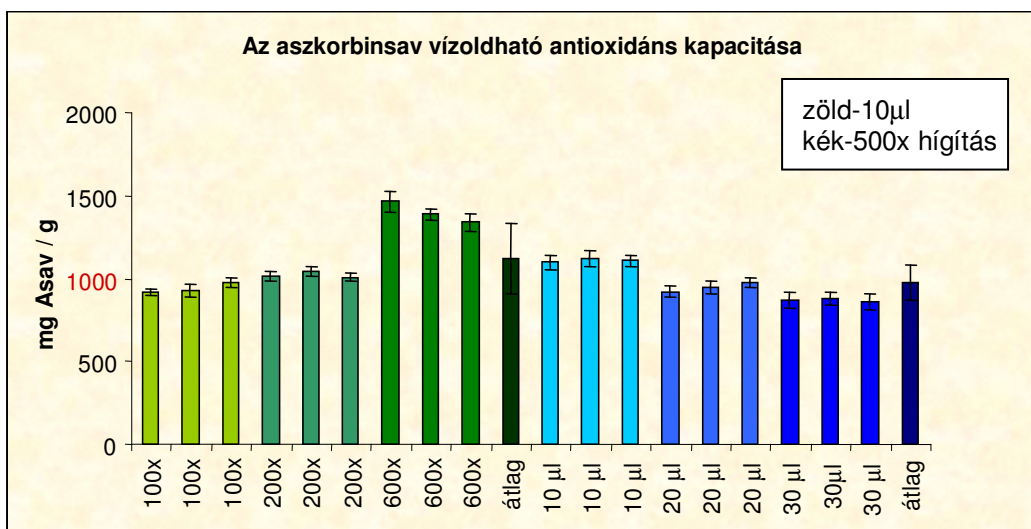
A következő esetben azt vizsgáltam, hogy egy adott hígítás esetén (100-szoros) a bevitt mintamennyisége (10-20-30 µl), milyen hatással van a szoftver által számolt eredményekre.

Amint az a **11. táblázat**ból kiderül, a bevitt mintamennyisége kihat a szoftver által számolt értékre. Itt a különbség 15% alatti minden esetben. A 20 és 30 µl mintamennyiség megmérése esetén az elméleti értékhez (elméleti érték alatt értem, az 1000 µg aszkorbinsav mennyiségét) képest kisebb értéket számol ki a szoftver.

11. táblázat. Az 1 mg/ml-es aszkorbinsav törzsoldat esetében a bevitt mintamennyiség hatása a szoftver által számolt értékre-1000 µg elméleti tömeghez viszonyítva

Hígítás	Minta mennyiség (µl)	Számolt mennyiség (µg)	Különbség (µg)	Különbség (%)
100	10	1097	97	-3,0
100	10	1121	121	12,1
100	10	1109	109	10,9
100	20	920	-80	-8,0
100	20	945	-55	-5,5
100	20	976	-24	-2,4
100	30	871	-129	-12,9
100	30	879	-121	-12,1
100	30	856	-144	-14,4

A két vizsgálatot összehasonlítva (**20. ábra**) látható, hogy a szórások, illetve az átlagok hogyan alakultak a mérések során. Amikor a mintamennyiség állandó volt, 20 µl, akkor a 600-szoros hígítás során kapott nagy értékeknek köszönhetően az átlagérték (1120 µg aszkorbinsav/mg) és a szórás is nagyobb, mint a második kísérletsorozatnál (974 µg aszkorbinsav/mg). Vagyis az 1000 µg-hoz képest az első esetben 12 %-kal nagyobb értéket kapunk, míg a második esetben 2,6 %-kal kisebbet. Megfelelő hígításnál a kapott érték és az elméleti érték közti különbség elhanyagolható (200-szoros hígítás), viszont nagy, vagy nagyobb hígításnál (600-szoros), ami nem jelenti azt, hogy a mérési görbéink a kalibrációs görbéken kívül esnének (**19. ábra**), jóval nagyobb hibával kell számolnunk.



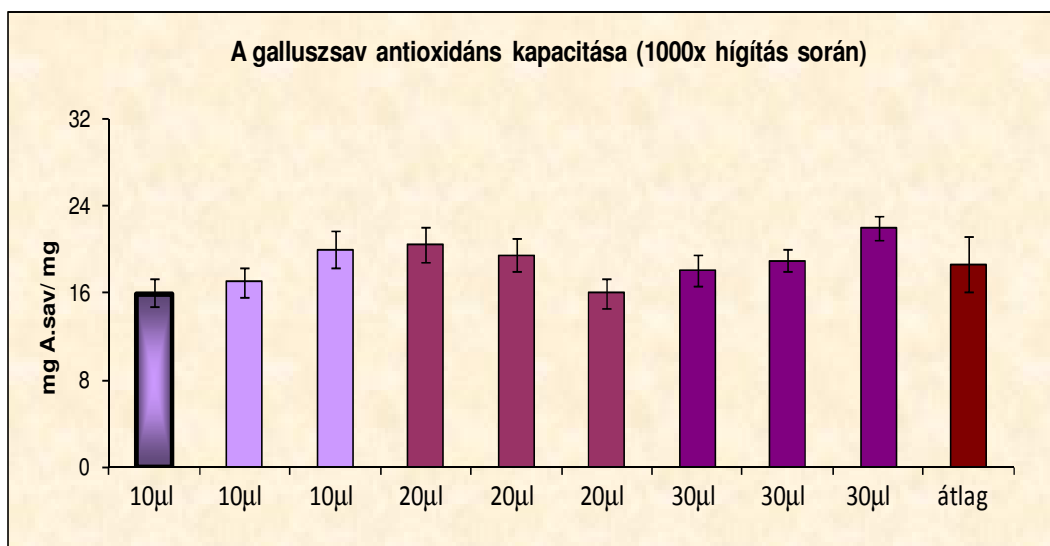
20. ábra. Az 1 mg/ml aszkorbinsav törzsoldat vízdíható antioxidáns kapacitásának alakulása a hígítás és a bevitt mintamennyiség függvényében (μg aszkorbinsav/ mg)

Itt fontos megjegyezni, hogy a hígításoknak, a mintamennyiségeknek meghatározásánál, azzal a problémával kell szembenézni, hogy egy kettő, amely 35-37 mérésre szolgál, sok esetben nem lesz elegendő egy mintasorozat végigméréséhez. Ekkor új vak oldatot és kalibrációs oldatokat kell készítenünk. Ez időigényes, és a kettők árát figyelembevéve rutinszerű mérések nem ajánlható. Abban az esetben viszont, ha két kettőt összeöntünk, hogy több mérést tudjunk megvalósítani egy kalibrációs görbével (70-74 mérés), akkor viszont számolnunk kell, a kettőkben lévő reagens fény- és hőérzékenységeivel, valamint a stabilitási problémákkal is.

5.1.1.2. Vízdíható antioxidáns kapacitás meghatározása galluszsav esetén

A mintamennyiség hatása

Az oldat készítés hasonlóan zajlott, mint aszkorbinsav esetén. Itt arra kerestem a választ, hogy 1 mg galluszsav, mennyi aszkorbinsavnak felel meg ACW módban. Ennek meghatározásához 1000-szeres hígítást készítettem és a különböző mintamennyiségek vizsgálatával a következő eredményeket kaptam (21. ábra).



21. ábra. 1 mg galluszsavra vonatkozó vízdoldható antioxidáns kapacitás mg aszkorbinsavban kifejezve

Mivel itt nincs elméleti érték, (az aszkorbinsav esetén 1 mg aszkorbinsav elméleti érték 1 mg aszkorbinsav-számolt értéknek felel meg), ezért, hogy a különbségeket valamihez viszonyítani lehessen, az első 10 µl-nyi galluszsav mérése eredményeként kapott értékekhez viszonyítottam. Eszerint a Photochem készülékkel meghatározva 1 mg galluszsav 16 mg aszkorbinsavnak felel meg (**21. ábra**). Itt fontos megjegyezni, magát a tényt, hogy a galluszsav nagyobb antioxidáns kapacitással bír, mint az aszkorbinsav, már több kutatási munka kimutatta különböző antioxidáns kapacitást mérő rendszerekkel (Tabart és mtsai., 2009). A probléma azonban az, hogy jelentős eltérések voltak a szoftver által számolt értékek között. Ez adódhat a bevitt mintamennyiségéből, és egyéb nem tisztázott tényezőkből is. Az viszont szembetűnő, hogy míg az aszkorbinsav esetén –hasonló feltételek mellett a különbségek 15% alattiak voltak (**10. táblázat**), itt csaknem eléri a 140%-ot is. A rendszer nem képes megfelelő korrekcióra ezen téren. Ez is azt mutatja, hogy nem elegendő egy minta mérésénél csupán egy hígítást és egy mintamennyiséget vizsgálni. Ennek a mérőeszköznek az eredményei rámutatnak arra, hogy bár a lag fázisok közötti idő eltérés alapján számol a szoftver, a különböző mintamennyiségből adódó lag fázisok közötti eltérés, illetve a kapott eredmény nem áll összhangban. Ez a jelenség abból is fakad, hogy a lag fázisok lefutása, és ezáltal az inflexiós pontja is, ha egy picit eltér, vagy akár a görbe alakja nem szabályos, akkor ekkora különbségek adódhatnak.

5.1.1.3. Vízdoldható antioxidáns kapacitás meghatározása citromsav esetén

A célom a citromsavval az volt, hogy teszteljem, vajon hogyan reagál ebben a rendszerben. A citromsav képes fémionokkal komplexet képezni, de a szabadgyökök befogására nem alkalmas. Ennek megfelelően reagált ACW módban. A szoftver nem számolt antioxidáns

kapacitás értéket. A citromsav lag fázisa még 100 mg/ml töménységű oldat esetén is a vak oldatéhoz konvergált. Tehát a citromsav ebben a rendszerben nem detektálható.

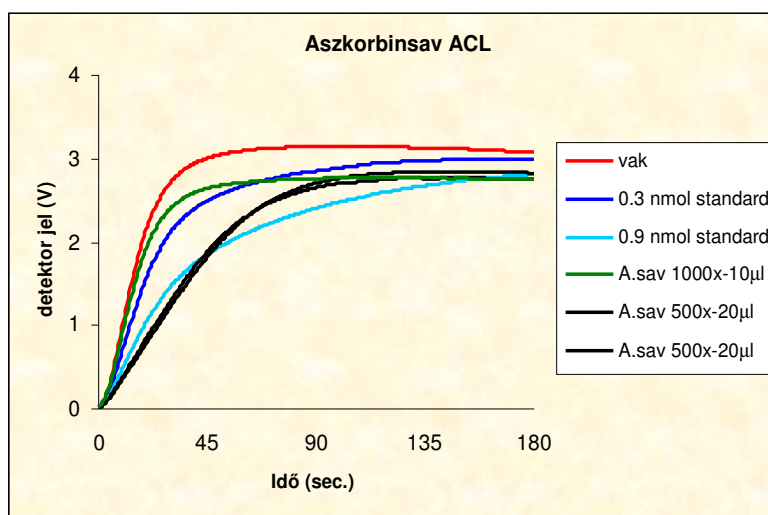
5.1.2. ACL mérések

5.1.2.1. Zsírolldható antioxidáns kapacitás meghatározása aszkorbinsav esetén

A hígítás hatása

Az ACL protokollnak megfelelően feloldottam az aszkorbinsavat az előírt oldószerben, metanolban, hogy választ kapjak, vajon a zsírolldható antioxidáns kapacitás mérésénél kapok-e troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitást.

Az aszkorbinsav ad értékelhető görbét (**22. ábra**), amiből a szoftver tud trolox ekvivalensre vonatkoztatott antioxidáns kapacitást számolni. Ez az eredmény abban jelent problémát, hogy általánosságban nem zsírolldható antioxidáns kapacitást kapunk a méréseink során, hanem zsír- és vízolldható komponensek valamilyen együttes kapacitását. Ez még pontosabban úgy definiálható, hogy a metanolban oldódó komponensek antioxidáns kapacitása. Ez egy félrevezetés, hogyha a protokollnak megfelelően készítjük elő a mintát, vagyis metanolban oldjuk fel, lesznek vízolldható komponensek, amelyek oldódnak metanolban, ezzel hozzájárulva az eredmények kialakításához, ugyanakkor például a karotinoidok nem metanololdhatóak.



22. ábra. A metanolban feloldott aszkorbinsav görbéi ACL üzemmódban

(Jelmagyarázat: A.sav 1000x-10 µl, A.sav 500x-10 µl, illetve A.sav 500x-20 µl: 1000-szeresre, illetve 500-szorosra hígított aszkorbinsav oldatból bevitt mintamennyisége 10 -20 µl)

Egyéb oldószer használatával szintén problémák léphetnek fel ugyanis interferenciát okozhatnak (DiNardo és mtsai., 2004; Perez-Jimenez és Saura-Calixto, 2006), valamint a

berendezés elemeiben esetlegesen kárt okozhatnak, amire a gyártó fel is hívja a figyelmet, és nem vállalja a felelősséget. Emellett a kittek pontos összetétele nem ismert, így a különböző komponensek más oldószerrel való kölcsönhatása ez okból szintén ismeretlen és komoly problémát okozhatnak a kapott eredmények értékelésénél

Miután bebizonyosodott, hogy az aszkorbinsav ACL módban mért értékei hozzájárulhatnak az antioxidáns kapacitás értékeihez, a következőkben azt vizsgáltam, hogy a hígítás miként hat az eredményekre ACL módban. Miután nem tudhatjuk, hogy valójában 1 mg aszkorbinsav mennyi troloxnak felel meg, ezért önkényesen a 100-szoros hígításra és 10 μ l térfogatú mintára a szoftver által számolt értékét adtam meg vonatkoztatási alapnak. Ezen módban a számolás alapja a görbe alatti terület. Miután aszkorbinsavval végzett vizsgálataim során mindig kaptam értékelhető, a kalibrációs görbék közé eső mintagörbét, ezáltal azt 'feltételeztem', hogy a szoftver által számolt görbe alatti területből mindig jó eredményt kapok.

A probléma itt összetettebb, mint az ACW, vagyis vízdoldható antioxidáns kapacitás méréseknél. Ott lag fázis alapján történt az értékelés, a kulcsfontosságú paramétert a lag fázis inflexiós pontja segítségével kaptuk meg. Az ACL módban viszont mindig fogunk tudni számolni görbe alatti területet, és mindig kapunk egy troloxra vonatkoztatott értéket, ha a mintánk görbéje a kalibrációs görbék közé esik (**22. ábra**). A hígítás, a megmért aszkorbinsav oldat térfogata, valamint az 1 mg aszkorbinsavra vonatkoztatott trolox mennyiség a következő táblázatban (**12. táblázat**) található.

12. táblázat. Az 1 mg/ml aszkorbinsav törzsoldat zsírdoldható antioxidáns kapacitása troloxra vonatkoztatva

Hígítás	Minta mennyiség (μ l)	Számolt mennyiség (μ g)	Különbség (μ g)	Különbség (%)
100	10	2039	0	0
100	10	2051	12	0,6
100	10	2042	3	0,1
200	10	2236	197	9,7
200	10	2440	401	19,7
200	10	2783	744	36,5
500	10	2731	692	33,9
500	10	2688	649	31,8
500	10	2939	900	44,1
1000	10	10132	8093	396,9
1000	10	10586	8547	419,2
1000	10	9499	7460	365,9

Ezen méréseknél fontos a görbe alakja, ami nagyban befolyásolja az eredményeket, de amint az egyértelműen látszik, a hígítás mértéke az, aminek növelésével a kapott különbségek

nagyon megugranak. Az 1000-szeres hígításnál a kapott görbe közel volt a vak görbékhez, de nem érték el azokat (**22. ábra**), így a szoftver tud számolni antioxidáns kapacitást. Miután a hígítási faktor nagy (1000-szeres), ezáltal a kapott értékek és a hibák is sokszorosuk. Egy ismeretlen minta esetén ez komoly problémát jelenthet és csak sok méréssel lehet a helyesnek vélt koncentráció-tartományt eltalálni.

Itt fel kell hívnom a figyelmet arra is, hogyha hígítást eszközöltünk, akkor a három párhuzamos esetén ugyan a szórás 10% alatti, viszont a hígítási faktoralal megszorozva az eredményeket jelentős különbségeket fogunk kapni is. Minél nagyobb a hígítás, annál nagyobb lesz a hiba, illetve a különbség.

A mintamennyiség hatása

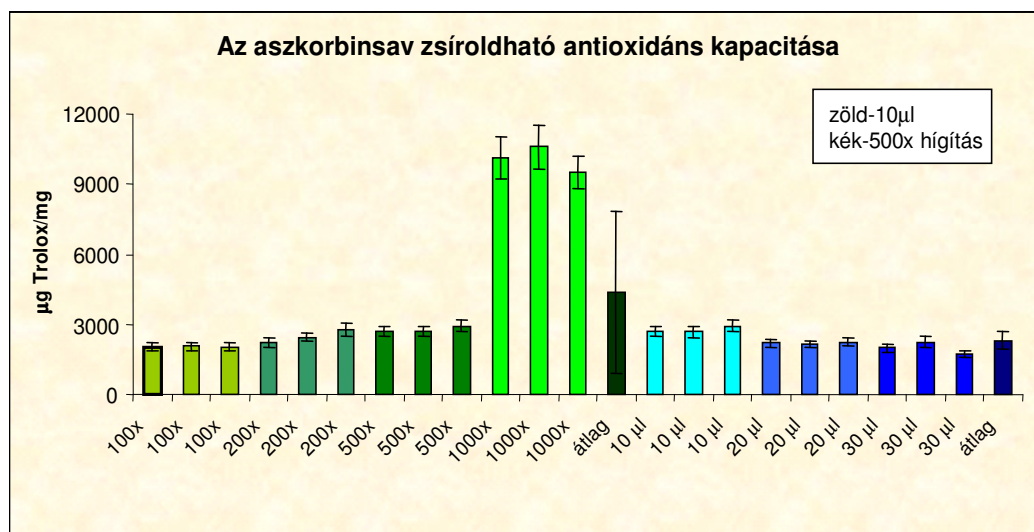
A mintamennyiségének hatását is vizsgáltam a választott 500-szoros hígításnál. A kapott eredményeket a **13. táblázat** foglalja össze. Az adatok összehasonlításához viszonyítási alapul, az előző kísérletben megválasztott 100-szoros hígítás 10 µl-nyi mintaoldat megmérésre során kapott értékét használtam.

13. táblázat. A mintamennyiségének befolyásoló hatása ACL módban aszkorbinsav esetén troloxra vonatkoztatva

Hígítás	Minta mennyiség (µl)	Számolt mennyiség (µg)	Különbség (µg)	Különbség (%)
100	10	2039	0	0
500	10	2714	675	33,1
500	10	2688	649	31,8
500	10	2939	900	44,1
500	20	2206	167	8,2
500	20	2137	98	4,8
500	20	2238	199	9,8
500	30	1989	-50	-2,5
500	30	2241	202	9,9
500	30	1723	-316	-15,5

A bevitt mintamennyiségétől függően itt is jelentős különbségek adódtak. A 10 µl mennyiségű minta esetén kaptam a legnagyobb eltérést a vonatkoztatási értékhez képest, a különbség mindhárom párhuzamos mérés esetében 30 % feletti. A bevitt 20 és 30 µl-nyi mintamennyiség esetén a különbségek 16 % alattiak. Az előzőekhez hasonlóan elkészítettem a hígítástól és a bevitt mintamennyiségétől függő troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás

értékek összefoglaló ábráját (**23. ábra**). Csakúgy, mint az ACW módban (**20. ábra**), a hígítás általánosságban jobban befolyásolja a kapott értékeket, így az átlagot, és egyúttal a szórást is.



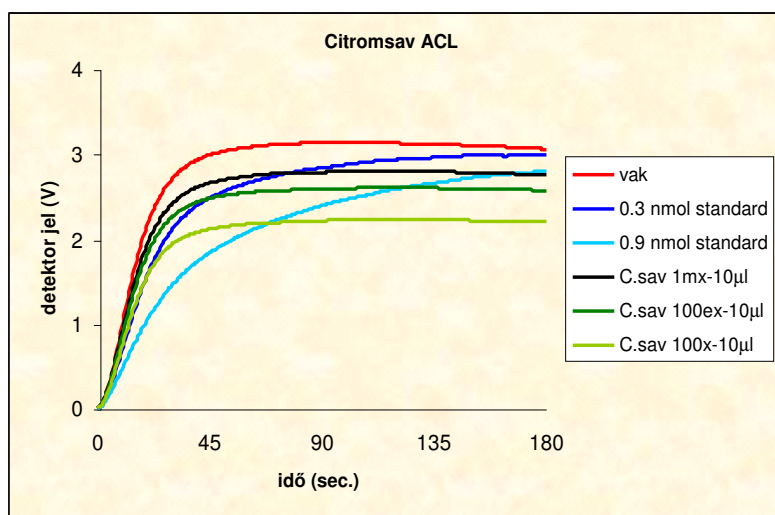
23. ábra. Az aszkorbinsav troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás értékeinek alakulása a hígítás és a bevitt mintamennyiség függvényében

5.1.2.2. Zsírolható antioxidáns kapacitás meghatározása citromsav esetén

A hígítás hatása

A citromsav esetén is hasonlóan jártam el, mint az aszkorbinsavnál azzal a különbséggel, hogy itt töményebb törzsoldatból (35 mg/ml) indultam ki. Ezen mérések esetén arra kerestem választ, hogy kapok-e értékelhető görbét, és ezáltal troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitást. A citromsav az ACW módban nem adott értékelhető görbét, mert nem képes a szuperoxid anionokat eliminálni. Ebben a módban azonban lehet görbe alatti területet számolni. Vagyis eszerint van szuperoxid anion elimináló képessége.

Ezen méréseknél arra szeretném felhívni a figyelmet, hogy eredetileg nem zsírolódó komponens a citromsav, nem elsődleges antioxidáns, mert ugyan van fémion megkötő képessége, a gyökök befogására nem alkalmas, viszont ezzel a műszerrel értékelhető eredményeket kapunk (**24. ábra**). Mindemellett kifejezetten a hiba nagyságának mértékére szeretném felhívni a figyelmet.



24. ábra. A citromsav viselkedése ACL módban

(Jelmagyarázat: C.sav 1mx- 10 µl, C.sav 100ex-10 µl, illetve C.sav 100x-10 µl: 1 milliószorosra, 100 ezer-szeresre, illetve 100-szorosra hígított citromsav oldatból bevitt mintamennyisége 10 µl)

Ennél a mérésnél is a 100-szoros hígítás 10µl mennyiségre számolt értéket választottam vonatkoztatási alapnak. A hígítások növelésével a kapott görbék egyre közelebb estek a vak oldat görbéjéhez (24. ábra), de a 14. táblázatban feltüntetett értékeket számolta ki a szoftver. Természetesen valódi minták (nem teszt) mérésekor nem fogadható el olyan 'görbe', ami a vak oldat görbéjéhez konvergál, már csak az imént bemutatottak miatt sem.

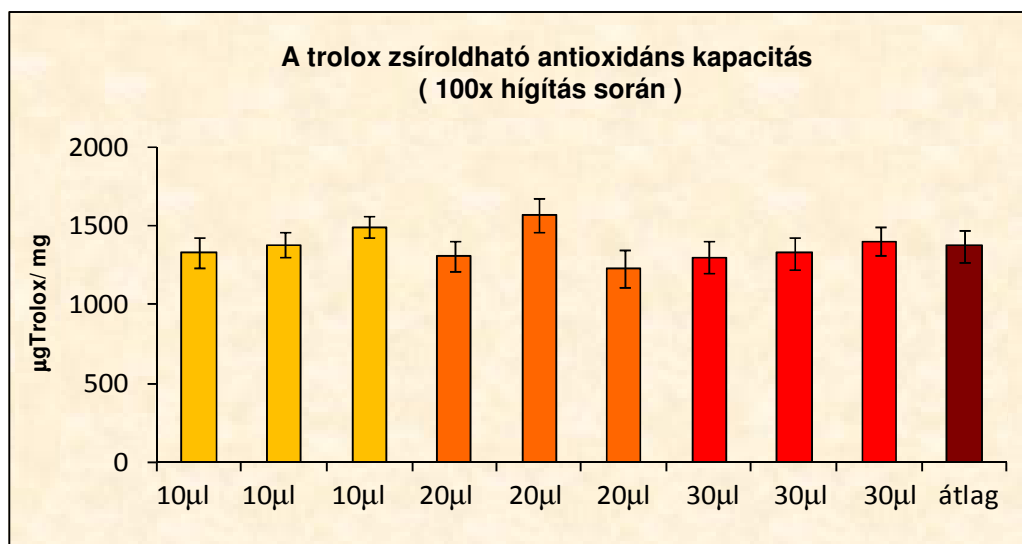
14. táblázat. A hígítás hatása a troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitásra 35 mg/ml citromsav törzsoldat esetében (µg trolox/ 35 mg citromsav)

Hígítás	Minta mennyiség (µl)	Számolt mennyiség (µg)	Különbség (µg)	Különbség (%)
100	10	1,2	0	0
1000	10	8,2	7	667
10000	10	95,2	94	7778
100000	10	816,0	815	66667
1000000	10	9418,0	9417	769444

5.1.2.3. Zsíroldható antioxidáns kapacitás meghatározása trolox esetén

A mintamennyiség hatása

Ezen mérés esetén a célom az volt, hogy szilárd troloxot metanolban feloldva és a rendszerrel megmérve teszteljem, hogy mekkora troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitást számol ki a szoftver. Ezen belül azt vizsgáltam, hogy a bevitt oldat térfogata milyen mértékben befolyásolja a szoftver által számított értéket. A kapott értékeket szemlélteti a 25. ábra.



25. ábra. A 1 mg/ml trolox törzsoldat zsíroldható antioxidáns kapacitása 1000 µg elméleti tömeghez viszonyítva (µg Trolox/mg)

Ezen méréseknél az elméleti, azaz 1000 µg mennyiségű troloxhoz képest jelentős eltéréseket kaptam. A terület, mint vonatkoztatási alap, kényesebb, nagyobb pontosságot követel meg, az ACW módhoz képest. Itt kicsi eltérés is nagy területbeli eltérést okozhat.

5.1.3. A műszerrel és a mérésekkel kapcsolatos megállapítások

A gyártó cég által meghatározott jellemzőket a következő megállapításokkal egészíteném ki.

1. A berendezést víz és zsíroldható antioxidáns kapacitás mérésére fejlesztették ki.

A vízoldható antioxidánsok mérése esetén vizet, a zsíroldható antioxidáns kapacitásnál metanolt ajánlanak. A probléma a zsíroldható antioxidáns kapacitás meghatározásánál jelentkezik. A metanol vízoldható (polárosabb) komponenseket is kivonja, így ezen komponensek is hozzájárulnak az antioxidáns kapacitás értékének kialakulásához. Ennek következménye, hogy a zsíroldható antioxidáns kapacitás értékek magukba foglalnak ismeretlen mennyiségű vízoldható komponensek antioxidáns kapacitását is. Kísérlettel bizonyítottam, hogy az aszkorbinsav, mint élelmiszermintáknál általánosan előforduló vízoldható komponens, oldódik metanolban és ACL rendszerben jelentős antioxidáns kapacitást produkál. A mérésekhez, a már említett metanolt ajánlja a cég protokollja, ezért történtek a mérések metanollal, így javasolnám a „metanol oldható komponensek antioxidáns kapacitása elnevezést”. A más oldószerek használata mellett bármilyen rendszerbeli elváltozás esetén a cég nem vállal garanciát.

2. A szoftver automatikusan számolja ki a vak és a kalibrációs görbék felhasználásával az antioxidáns kapacitás értékeket, lag fázis, illetve integrálás alapján.

A szoftver automatikusan adatokat szolgáltat, hogyha van a mért minta lag fázisának inflexiós pontja, illetve görbe alatti területe és ezek beleesnek a vak és a kalibrációs sor görbéi közé. A probléma akkor jelentkezik, hogyha például nem szabályos a görbék lefutása. Ez könnyen előfordulhat komplex minták vagy túl tömény minták esetén. Emellett itt további gondot jelent a zsírolható antioxidáns kapacitás vizsgálatoknál az is, hogy ha túl híg az oldatunk (kimutatási határ alatti), akkor is kapunk görbe alatti területet, ami a vakhoz közeli, de a szoftver így is fog számolni antioxidáns kapacitást. Így még ha kis értéket is kapunk az alkalmazott hígítással megszorozva már nagy, helytelen troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitás értéket kapunk eredménynek.

3. A rendszer lehetővé teszi, hogy a bevitt mintamennyiség változzon (10-40 µl)

Annak ellenére, hogy a bevitt mintamennyiségének változtatása megengedett, a szoftver által számolt antioxidáns kapacitás értékeknél jelentős különbségek adódhatnak, mind ACW, mind ACL módban. Ez a megállapítás a hígítás során is fennállhat.

4. A műszer komplex minták rutinszerű mérésére alkalmas.

A fent említett és bemutatott megfigyelések alapján a műszer rutinszerű mérésére nem alkalmas, hiszen ha már standardok mérésekor problémák adódnak, akkor komplex minták esetében a mátrixhatás további gondot okozhat, a nem szabályos görbe lefutás, a megfelelő hígítás, illetve megfelelő koncentráció megtalálása mellett. Egy ismeretlen minta esetén számos mérést kell végezni ahhoz, hogy a többféle hígítás és bevitt mintamennyiség alapján meg lehessen határozni az antioxidáns kapacitást. Ez idő- és pénzigényes.

5. A mérésekhez szükséges kitekkel a kivitelezés egyszerű és kényelmes.

A kitekkel kapcsolatos problémák:

- fény és hőmérséklet érzékenység
- stabilitási problémák

Ezekből következik, hogyha egyszer egy kittet felbontunk, akkor azt fel kell használni. Ha sok mintánk van, akkor több kittel több kalibrációs sorral és vakkal kell végigvinni a

méréseket. Egy kit, csak 35-37 mérésre szolgál, ami nem feltétlen elegendő egy mintasorozat végigméréséhez (vak, kalibrációs sor, megfelelő hígítás megtalálása). Ha két kittet összeöntünk, hogy több mérést tudjunk megvalósítani egy kalibrációs görbével (70-74 mérés), akkor viszont számolnunk kell, a kittek fény- és hőérzékenységeivel, valamint a stabilitási problémákkal is. Ha kevés mintánk van, akkor feleslegbe megy a kitt egy része. Mindez nem költséghatékony.

- pontos összetételük nem ismert
- kizárólag a gyártótól szerezhető be -nyomonkövethetőség problémája- hűtési lánc megszakadása-kiolvadás veszély stb.
- kiszolgáltatottság
- ár

A rendszer nem tartalmaz autosamplert, a mérés a megfelelő hígítás, mintamennyiség megtalálása miatt időigényes, a kittek ára és a mérés jellege miatt drága. Rutinmérésekhez nem megfelelő.

5.2. A bogyós gyümölcsökkel kapcsolatos eredmények

Négy gyümölcsfaj összesen 13 fajtáját vizsgáltam (**szamóca**: 'Elsanta', 'Honeoye', 'Onebor', **málna**: 'Malling Exploit', 'Fertődi Zamatós', 'Glen Ample', **piros ribiszke**: 'Rondom', 'Detvan', 'Jonkheer van Tets', **fekete ribiszke**: 'Fertődi 1', 'Fertődi 11', 'Titánia', 'Otelo') antioxidáns kapacitást mérő rendszerekkel. Az alkalmazott módszerek közé hidrogénatom átvitel (PCL, TRSC) és elektronátmenet elvén (FRAP, TPC, TEAC, DPPH) működő módszerek egyaránt tartoztak. Sor került a minták összantocianin-, C-vitamin és a legjellemzőbb fenolos savak tartalmának meghatározására is. A flavonoidok vizsgálata a non-target módszerrel meghatározott komponensek minőségi meghatározását fedte le, és ennek felhasználásával a gyümölcsök flavonoid mintázatát vizsgáltam. A kapott eredmények ezt a logikai felépítést követik, az eredmények bemutatása és kiértékelése több részletben valósul meg:

- A gyümölcsök szárazanyag tartalmának bemutatása.
- A különböző antioxidáns kapacitást mérő módszerekkel kapott eredmények elemzése és a bogyósgyümölcs fajok és fajták közötti sorrend kialakítása.
- Az alkalmazott antioxidáns kapacitást mérő módszerekkel kapott értékek közötti korrelációk elemzése, lehetséges okok, összefüggésekre való rávilágítás.
- A különböző, antioxidáns kapacitás kialakításáért felelős komponensek mennyiségi és minőségi meghatározása, a gyümölcsfajok és -fajták közötti különbségek elemzése, továbbá a mennyiségük és az antioxidáns kapacitások közötti korreláció megvitatása, a különbségek és összefüggések kimutatása.
- A bogyós gyümölcs fajok és fajták flavonoid mintázatainak összehasonlítása a különbségek és azon összefüggések keresése, amely az egyes komponensek antioxidáns kapacitás értékek kialakításában betöltött szerepére utal.

5.2.1. A gyümölcsök szárazanyag tartalma

A gyümölcsök szárazanyag tartalmának alakulása táblázatos (**15. táblázat**) formában kerül bemutatásra. A szamócák szárazanyagtartalma csupán 11%, ezt követik a piros ribiszkék és a málnák, illetve a fekete ribiszkék, amelyek esetén 18-22% szárazanyagtartalmat mértem.

15. táblázat. A gyümölcsök szárazanyag tartalmának alakulása (%)

Szamóca (<i>Fragaria x ananasa</i> DEUCH)		Málna (<i>Rubus idaeus</i>)	
Elsanta	(11,1%)	Malling Exploit	(14,7%)
Honeoye	(10,8%)	Fertődi Zamos	(15,0%)
Onebor	(10,6%)	Glen Ample	(14,9%)

Piros ribiszke (<i>Ribes rubrum</i> L.)		Fekete ribiszke (<i>Ribes nigrum</i> L.)	
Rondom	(13,0%)	Fertődi 1	(22,4%)
Detvan	(13,2%)	Fertődi 11	(18,3%)
Jonkheer van Tets	(17,4%)	Titania	(17,9%)
		Otelo	(22,4%)

A továbbiakban tárgyalt eredményeket szárazanyagtartalomban adom meg az objektív összehasonlíthatóság miatt, azonban az így kialakult eredmények, sorrendek természetesen jelentősen módosulhatnak a nagy szárazanyagtartalom különbség miatt.

5.2.2. Az antioxidáns kapacitások vizsgálatok eredményei

5.2.2.1. A hidrogénatom átvitelen alapuló (HAT) módszerek eredményei

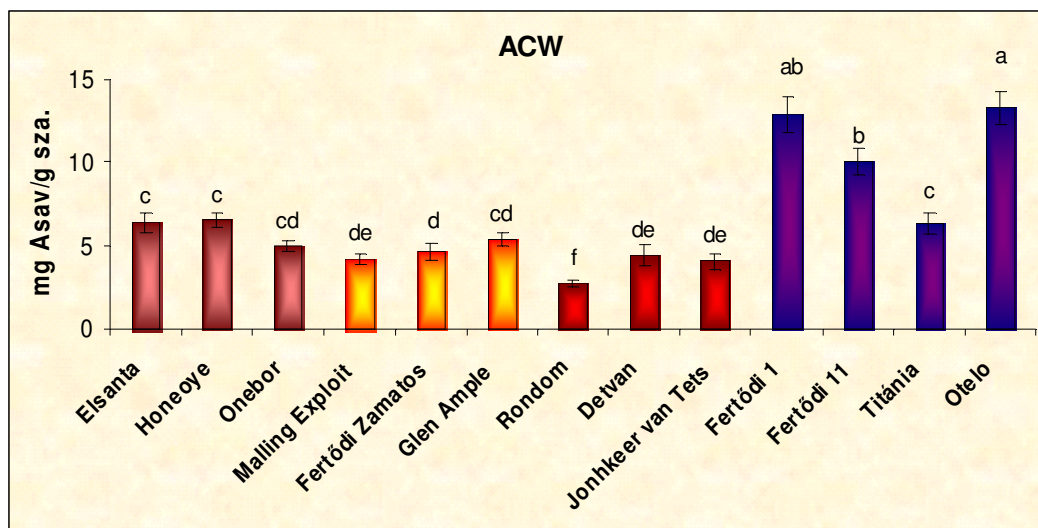
Elsőként szeretnék magyarázatot adni, hogy az előző fejezetben bemutatott készülék (Photochem) és mérési módszer (ACW, ACL) problémái ellenére miért döntöttem úgy, hogy valódi minták mérésére is kipróbálom, valamint az adatokat leközlöm. Amint az az előző alfejezetből kiderült a megfelelő hígítás esetében a készülék képes helyes eredményt is adni (Izd. aszkorbinsav visszamérés ACW rendszerben, 100 és 200 szoros hígítás).

Mérési protokollt dolgoztam ki ezekre a mintákra, amit számos tesztmérés előzött meg. A mintákat azonos módon kezeltem a mérések során, ezzel biztosítva az összehasonlítás lehetőségét. A korábbi antioxidáns kapacitás mérési tapasztalatok során a 10 mg/ml-es töménységű mintaoldatok (Izd. anyagok és módszerek fejezet) felülúszóját használtam a különböző mérések során. Ezek a törzsoldatok miután töménynek bizonyultak, százszorosra és a fekete ribiszkek esetében kétszázszorosra hígítottam az oldatokat, hogy a kalibrációs görbék megfelelő szakaszában dolgozzak. A korábbi mérési tapasztalatok azt mutatták, hogy a műszer elsősorban a nullához közeli mérési tartományban „csal”, ezért olyan tartományt választottam, ahol ez a veszély nem állt fenn. (jelen esetben ezen mintáknál a 100-szoros és a 200-szoros hígítás megfelelőnek bizonyult). Minden egyes mintánál kizárólag egy bemérési térfogatot használtam (10 µl).

A mérések során kapott értékek egymással összehasonlíthatók, a minták közti sorrend felállítható. Elsősorban az egymáshoz való arányuknak van információértéke. A továbbiakban az így kapott eredményeimet szeretném bemutatni.

A szuperoxid anion megkötésén alapuló *fotokemilumineszcencia elvén működő ACW módszer* alkalmazásánál a fekete ribiszke közel kétszer akkora antioxidáns kapacitással rendelkezik (26. ábra), mint a többi faj. A feketeribiszke-fajták között ez a módszer igen diszkrimináló (diszkrimináló módszer alatt értem: hogy a módszer hozzájárul az adott fajták statisztikai elkülönítéséhez), a fajon belüli különbségek jelentősek. A 'Titánia' csupán fele akkora antioxidáns kapacitást mutat, mint a 'Fertődi 1' és az 'Otelo' fajtákhoz képest. A többi faj esetében a fajták közötti különbség nem olyan nagymértékű, csupán 10-20 %-os. A várttal ellentétben a 'Honeoye' és 'Elsanta' szamócafajtánál kapott mérési eredmények statisztikailag ($p < 0,05$) nem különböznek a 'Titánia' fekete ribiszkétől. A további mérési eredményeim (Balogh és mtsai., 2010), valamint az irodalmi adatok általánosságban azt mutatják, hogy a fekete ribiszkék és a szamócák között szignifikáns különbségek vannak antioxidáns kapacitás tekintetében (Hakkinen et al., 1999a, Heinonen et al., 1998). ACW módszer alkalmazásával, az 1 g szárazanyagra vonatkoztatott mg aszkorbinsavban megadott értékek alapján a következő sorrend alakult ki a gyümölcsfajok között:

piros ribiszke < málna < szamóca < fekete ribiszke



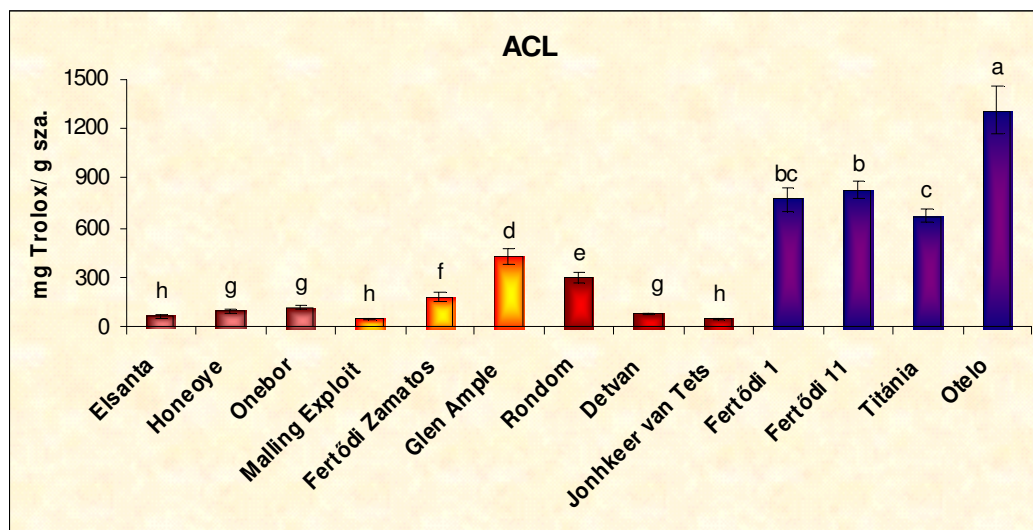
26. ábra. A vizsgált bogyós gyümölcsök vízzoldható antioxidáns kapacitása (mg aszkorbinsav/gszárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A szuperoxid anion megkötésén alapuló *zsírdoldható antioxidáns kapacitás (ACL)* a mérésénél az egyes fajok és fajták igen eltérő módon viselkedtek (27. ábra). Bár a fekete

ribiszkénél mértem a vártnak megfelelően a legnagyobb értékeket, viszont a szamócák kicsi ACL értékeket mutattak.



27. ábra. A vizsgált bogyós gyümölcsök zsírolható antioxidáns kapacitása (mg trolox/g szárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

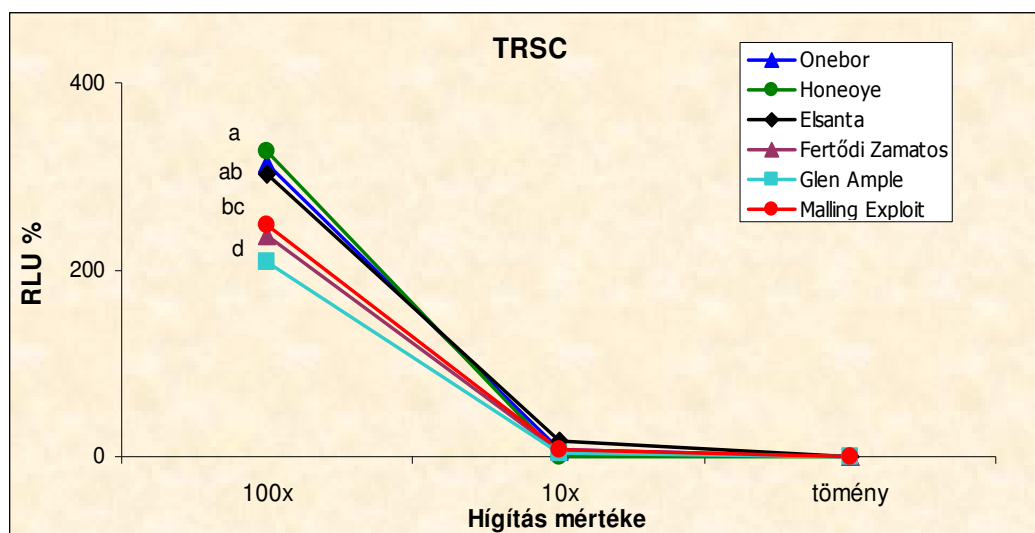
Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Ebben a rendszerben a piros ribiszkék közül a ‘Rondon’ (az ACW rendszerben a legkisebb értéket adó), a málnák közül a ‘Glen Ample’ genotípus bizonyult kiugrónak. A vízoldható antioxidáns kapacitás értékek a fajok között az alábbi sorrendet alakították ki:

szamóca < piros ribiszke < málna < fekete ribiszke

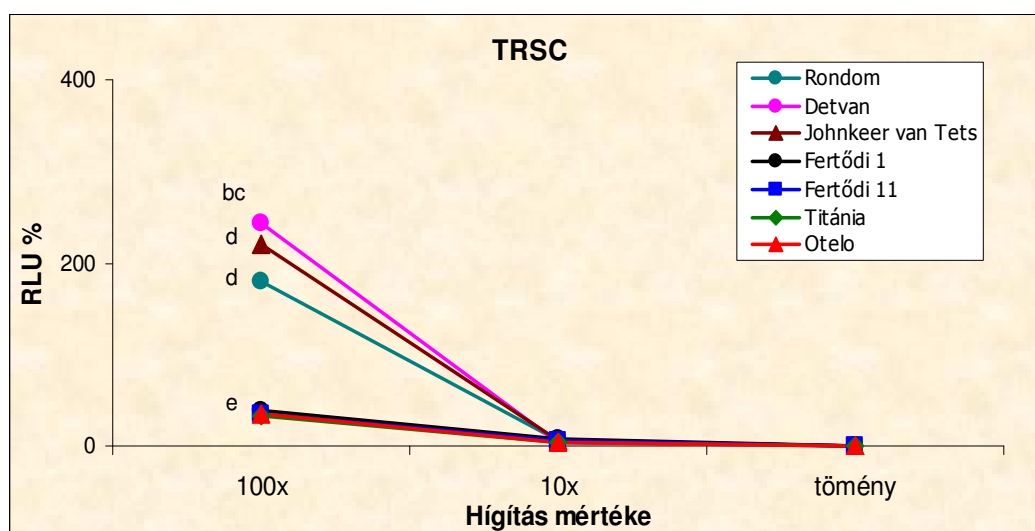
Míg az ACW-vel (26. ábra) meghatározott különbségek az egyes fajták esetében 10-50 %-osak, addig ACL módban (27. ábra) a fajták közti különbségek igen látványosak, 2-8-szorosak (például ‘Jonkheer van Tets’ és ‘Rondon’, illetve ‘Malling Exploit’ és ‘Glen Ample’). Ebből adódóan a fajok közti eltérések is meghatározóak. A legkisebb (‘Malling Exploit’) és a legnagyobb (‘Otelo’) értékek között több, mint 25-szörös a különbség. A Phochem készülékkel mért „zsírolható” antioxidáns kapacitás minden esetben szignifikánsan nagyobb értéket adott, mint a vízoldható (Balogh és mtsai., 2010). Ez többek között annak is köszönhető, hogy egyes vízoldható komponensek az ACL rendszerben is aktívak (DiNardo és mtsai., 2004), mint például a C-vitamin (19. ábra) is, ezzel hozzájárulva a kapott nagyobb érték kialakításához.

A következőkben a hidroxilgyök megkötésén alapuló *TRSC módszerrel* kapott eredmények kerülnek bemutatásra RLU%-ban megadva. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a szamócák és a málnák egy ábrában (28. ábra), míg a piros-, és fekete ribiszkék (29. ábra) másik ábrában szerepelnek.



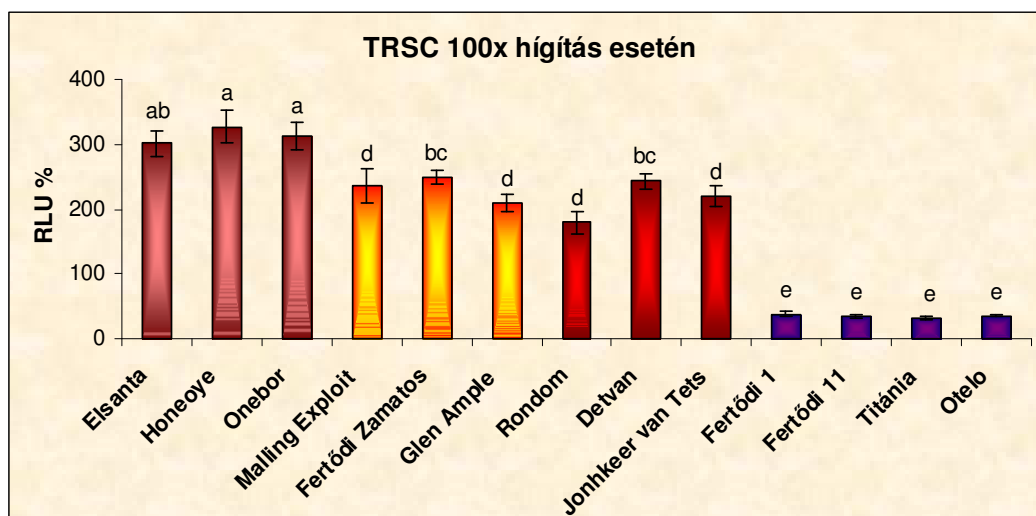
28. ábra. A hidroxilgyök és luminolgyök megkötésén alapuló módszerrel kapott eredmények számóca- és málnafajták esetében (az eredmények RLU (relative light unit) %-ban vannak megadva)
Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Ennél a módszernél a kiértékelés és az ábrázolási mód az eddig megszokottaktól eltérő. A 100% feletti értékek gyökgenerálást jelentenek. A módszer sajátossága, hogy a nagyobb antioxidáns kapacitású mintánál kisebb jelet lehet mérni. A számóca- és málna esetében nagyobb RLU % értéket kaptam, mint a málnánál (28. ábra), vagyis ebben a mérési rendszerben kisebb antioxidáns kapacitással rendelkeznek. A piros ribiszkénél kapott RLU % értékek szignifikánsan nagyobbak a fekete ribiszkénél mért értékeknél (29. ábra), kisebb antioxidáns erejük van.



29. ábra. A hidroxil- és luminolgyök megkötésén alapuló módszer eredményei fekete- és piros- ribiszkék esetében (az eredmények RLU (relative light unit) %-ban vannak megadva)
Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A luminometriás mérésnél a 100-szorosra hígított minták között szignifikáns különbség van, ennek bemutatására és részletezésére egy külön ábra segítségével kerül sor (**30. ábra**).



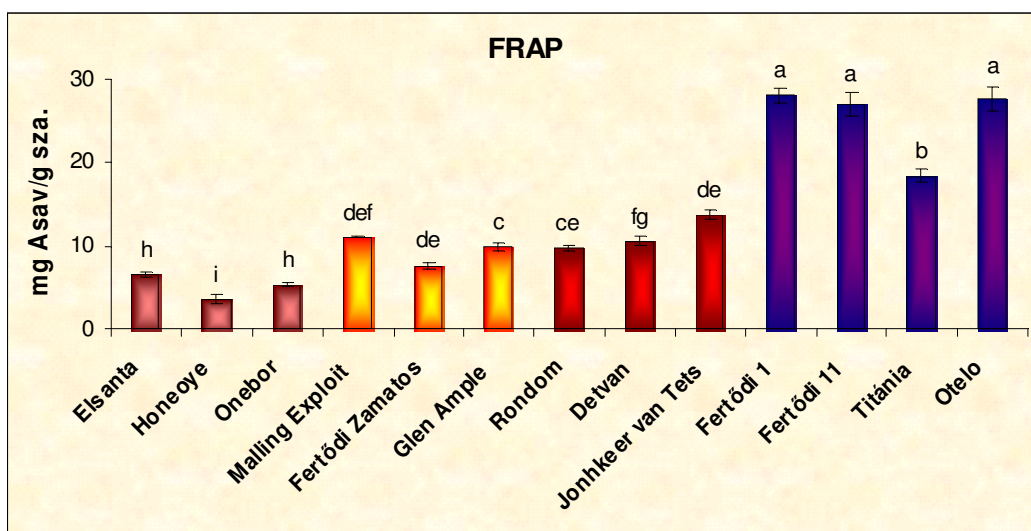
30. ábra. A hidroxilgyökök megkötésén alapuló módszerrel kapott eredmények 100x hígítás esetén (az eredmények RLU (relative light unit) %-ban vannak megadva)
 (Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)
 Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Ezzel a módszerrel a feketeribiszke-fajták között nem mutatkozik szignifikáns különbség, nem lehet kiemelni a genotípusok közti eltéréseket, mindegyik feketeribiszke-kivonat hasonlóképpen reagált a hidroxilgyökökre ($p < 0,05$). A gyümölcsfajok esetén hidroxilgyökökkel kapcsolatos antioxidáns kapacitás sorrend a következőképpen alakult:

szamóca < málna = piros ribiszke < fekete ribiszke

5.2.2.2. Az elektronátmenettel járó (ET) módszerek eredményei

A *FRAP* módszerrel, a vasredukálóképességen alapuló spektrofotometriás módszerrel meghatározott antioxidáns kapacitás értékek (**31. ábra**) összhangban vannak számos irodalmi adattal (Wu és mtsai., 2006; Hegedűs és mtsai., 2008), miszerint a fekete ribiszkék kiemelkedő antioxidáns kapacitással bírnak, amely valószínűleg a nagy polifenol, illetve antocianin tartalmuknak köszönhető (Heinonen és mtsai., 1998; Hakkinen és mtsai., 1999a).



31. ábra. A bogyós gyümölcsök FRAP módszerrel kapott eredményei (mg aszkorbinsav/g szárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A szamócákhoz képest 3-4-szer, míg a piros ribiszkékhez és a málnákhoz képest 2-szer nagyobb értékeket adtak. A legkisebb ('Honeoye') és a legnagyobb értékű ('Fertődi 1') gyümölcs közötti különbség közel 8-szoros.

A fekete ribiszkét figyelmen kívül hagyva a 'Jonkheer van Tets' piros ribiszkénél mértem a legnagyobb értéket. A fajon belüli fajták közötti eltérések akár 30-40 %-osak is lehetnek (például: 'Elsanta'-'Honeoye', illetve 'Fertődi 1' és 'Titánia' között). A vasredukálóképességet tekintve (31. ábra) a gyümölcsfajok esetében a sorrend a következőképpen alakult:

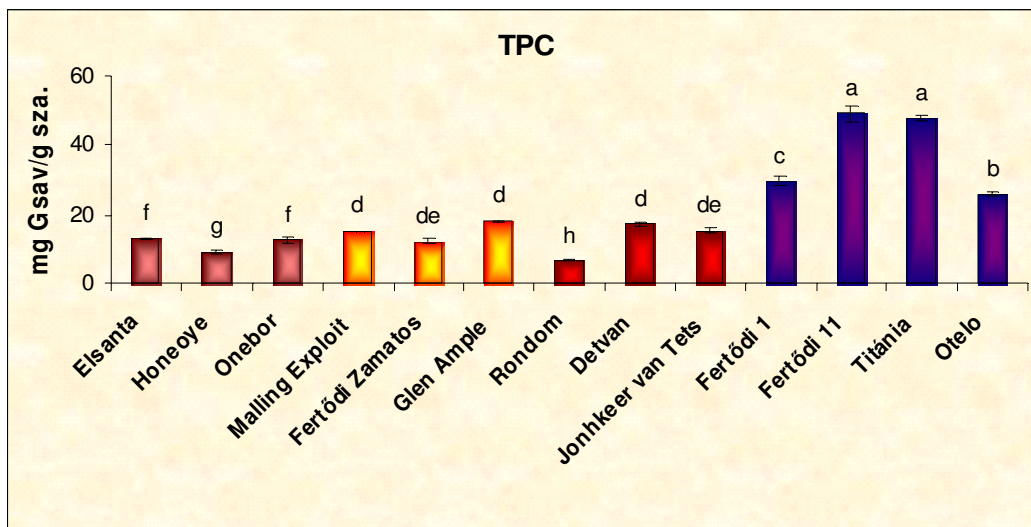
szamóca < málna < piros ribiszke < fekete ribiszke

A polifenolos komponensek a legjelentősebb antioxidáns kapacitás kialakításáért felelős vegyületek közé tartoznak (Robards és mtsai., 1999). E komponensek mérésére alkalmas módszer a Folin-Ciocalteu reagenssel spektrofotometriásan meghatározott *összpolifenol tartalom* mérés (32. ábra), amely elektronátmenettel járó antioxidáns kapacitás mérés is egyben (Huang és mtsai., 2005; Tabart és mtsai., 2009). A fekete ribiszkék közül a 'Fertődi 11' és a 'Titánia' értékei kimagaslóak, közel 50 mg galluszsav/g szárazanyag.

A kapott eredmények számos irodalmi adattal összhangban állnak (Heinonen és mtsai., 1998; Wang és Lin, 2000; Szajdek és Borowska, 2008). Az általam vizsgált többi bogyós gyümölcs polifenoltartalma nem éri el a 20 mg galluszsav/g szárazanyag szerinti értéket (Balogh és mtsai., 2010). A legkisebb mennyiséget a 'Róndom' piros ribiszkénél mértem: 7 mg

galluszsav/g szárazanyag. A kapott sorrend a gyümölcsök között a következőképpen alakult:

szamóca<piros ribiszke<málna<fekete ribiszke

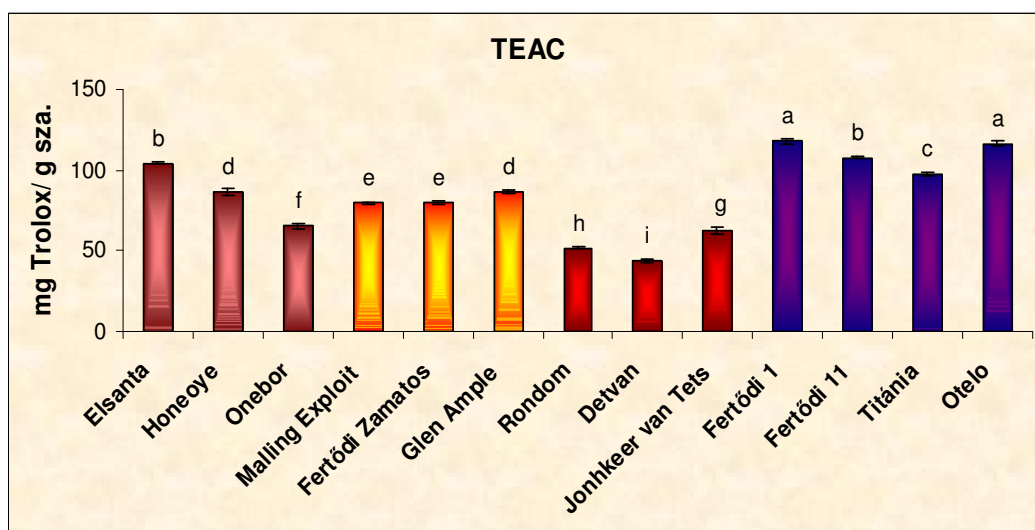


32. ábra. A vizsgált gyümölcsminták összpolicfenol tartalmának alakulása (mg galluszsav/g szárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Az ABTS gyök megkötésén alapuló spektrofotometriás *TEAC módszerrel* kapott eredmények tekintetében megállapítható (33. ábra), hogy a fekete ribiszkek értékei nem kiugróak oly mértékben, mint az eddig bemutatott eredmények alapján várható lenne.



33. ábra. A vizsgált gyümölcsminták TEAC értékeinek alakulása (mg trolox/g szárazanyag)

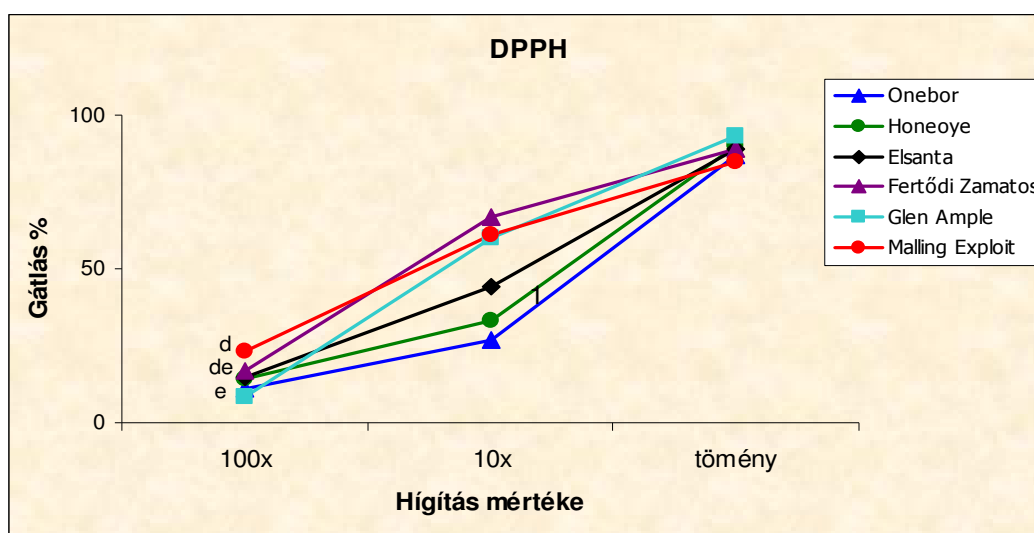
(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A piros ribizskékhez képest 2-szeres antioxidáns kapacitással rendelkeznek, de a szamóca, és a málna értékeihez viszonyítva a különbség csupán 30-40%-nyi, az eddig tapasztalt 2-8-szoros értékekhez képest (ACW, ACL, FRAP). Az ABTS gyök megkötésére vonatkozólag a málnák közel azonos értékeket adtak, a szamócák és a pirosribiszke-fajták között azonban szignifikáns különbség van ($p < 0,05$). A fekete ribizskék eredményei az ACW értékekkel azonos tendenciát mutatnak (23. ábra). E módszer alkalmazásával a kapott antioxidáns kapacitásbeli sorrend a gyümölcsök között a következőképpen alakult:

piros ribiszke < málna < szamóca < fekete ribiszke

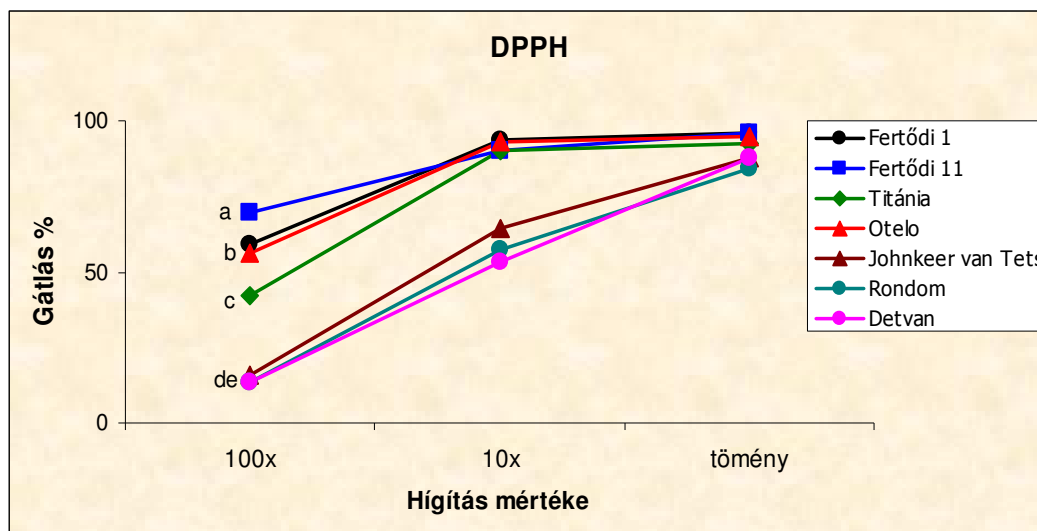
A DPPH gyök megkötésén alapuló módszerrel kapott antioxidáns kapacitás eredmények szintén két részletben kerülnek bemutatásra. A szamócák és a málnák egy ábrában (34. ábra), valamint a piros-, és fekete ribizskék is külön egy ábrában szerepelnek (35. ábra). Emellett külön kiemelve egy ábrában szerepelnek a 100-szoros hígítás eredményei (36. ábra) a fajok és a fajták közti különbségek szemléltetése miatt. A DPPH stabil gyököt elsősorban a reakcióképesebb komponensek képesek redukálni, mint például a polifenolos vegyületek (Huang és mtsai., 2005; Ozgen és mtsai., 2006). Eredményeim ezt a megállapítást alátámasztják, hiszen az összpolicenol tartalom és a DPPH megkötésén alapuló módszer között igen szoros összefüggést lehetett kimutatni ($r = 0.820$) (16. táblázat). A málnák 50 % feletti, míg a szamócák 50 % alatti gátlást képesek elérni 10-szeres hígítás esetén (31. ábra). A 100-szoros hígításnál a különbségek kisebb mértékűek, 25 % alattiak.



34. ábra. A DPPH stabil gyök megkötésén alapuló módszerrel kapott eredmények szamóca és málna fajták esetében (az eredmények gátlás %-ban vannak megadva)

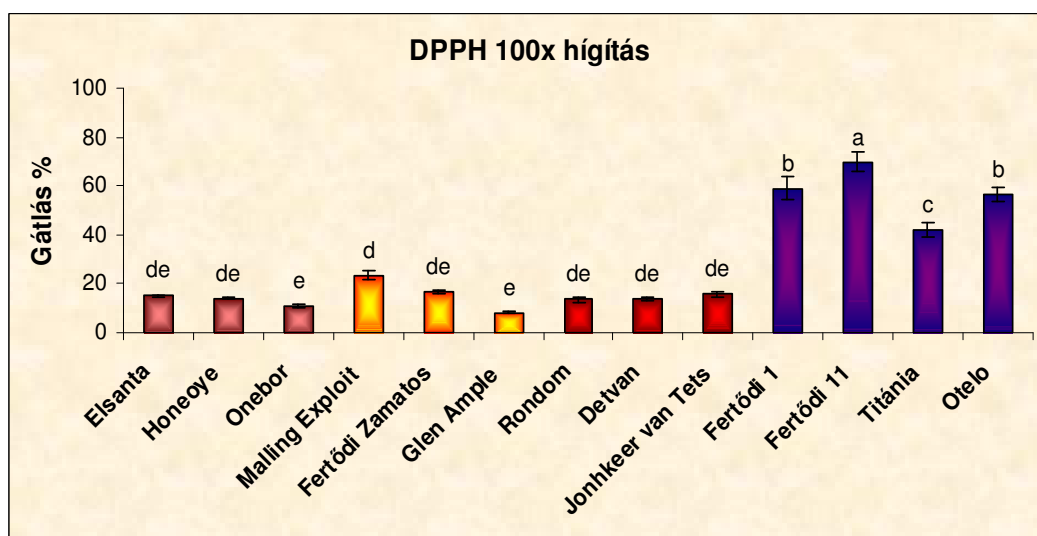
Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Míg a hidroxilgyökökkel szemben (30. ábra) a 100-szoros hígítás esetében a fekete ribiszkék között nem lehetett statisztikailag ($p < 0,05$) különbséget tenni, addig ugyanezen körülmények között DPPH gyökkel szemben (35. ábra) a fekete ribiszkék között jelentős különbségek adódtak. Megemlítendő a legnagyobb gátlást adó 'Fertődi 11' fajta, illetve a legkisebb gátlást adó 'Titánia', mely gátlása 50% alatti (36. ábra). A fekete ribiszkék esetén a 10-szeresre hígított mintáknál a gátlás 90 %-ot meghaladja, míg a többi faj esetén ez csupán 70% alatti.



35. ábra. A DPPH stabil gyök megkötésén fekete- és pirosribiszke-fajták esetében (gátlás %-ban megadva)
Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A DPPH gyökkel szemben 100-szoros hígításnál (36. ábra) 20 % alatti gátlást adnak a szamócák, a piros ribiszkék, és a málnák közül a 'Fertődi Zamosos', valamint a 'Glen Ample' fajták.



36. ábra. A DPPH gyök megkötéssel kapcsolatos eredmények 100x hígítás esetén (gátlás %-ban)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Statistikailag nem lehet különbséget tenni a piros ribiszkék, az 'Elsanta', a 'Honeoye' és a 'Fertődi Zamos' fajták között. A DPPH gyökkel kapcsolatos antioxidáns kapacitás értékek az alábbi sorrendet alakították ki a vizsgált bogyós gyümölcsök között:

szamóca<piros ribiszke<málna<fekete ribiszke

A redox paraméterek közötti korrelációk a **16. táblázat**ban kerülnek bemutatásra. Az ACW értékek szoros korrelációt mutatnak a többi antioxidáns kapacitás eredményeivel, kivéve a TPC értékekkel, ahol méréseim alapján nincs szignifikáns összefüggés ($r=0.520$). A TRSC értékekkel minden általam alkalmazott teszt negatívan korrelál, ami a módszernek az eltérő kiértékeléséből, elvéből adódik. A TRSC módszerrel kapott eredmények összhangban vannak a többi módszerrel kapott eredményekkel (**16. táblázat**), annak ellenére, hogy a mérés sajátosságából adódóan máshogy történt a kapott eredmények értékelése (**30. ábra**).

16. táblázat. A redox paraméterek közti korrelációs koefficiens értékek

	ACW	ACL	TRSC	FRAP	TPC	TEAC	DPPH
ACW	-	0,871*	-0,714*	0,824*	0,520	0,887*	0,851*
ACL	-	-	-0,885*	0,875*	0,673	0,707*	0,844*
TRSC	-	-	-	-0,939*	-0,826*	-0,643	-0,885*
FRAP	-	-	-	-	0,761*	0,730*	0,941*
TPC	-	-	-	-	-	0,582	0,820*
TEAC	-	-	-	-	-	-	0,826*

*Szignifikáns: $P < 0,05$

Az általam vizsgált gyümölcsök FRAP értéke és összpolicfenol tartalma közti korreláció $r=0,761$, valamint a FRAP és a TEAC közti korreláció is $r=0,730$ is szignifikánsnak mondható, azonban számos tanulmány számolt be ennél nagyobb korrelációs koefficiensről, szintén bogyós gyümölcsök esetén (Pellegrini és mtsai., 2003; Pantelidis és mtsai., 2007; Ercisli és Orhan, 2008). Egyes kutatók vélekedése szerint a szoros korrelációnak oka e két módszer hasonló kémiai háttérében keresendő (Huang és mtsai., 2005). A szamócák és a málnákat tekintve a FRAP értékek, illetve az összpolicfenol-tartalomra vonatkozó értékek tendenciája megegyezik, azonban a piros ribiszkénél a 'Rondom', valamint például a 'Titania' fekete ribiszkék értékei kiugróak (Balogh és mtsai., 2010).

A 'Titania'-nál kimagasló policfenol tartalmat mértem (**32. ábra**), viszont a FRAP értéke (**31. ábra**) a fekete ribiszkék közül a legkisebbnek adódott, tehát a "minél nagyobb az összpolicfenol tartalom, annál nagyobb a FRAP érték" összefüggés nem feltétlen igaz minden minta esetén (Ercisli és Orhan, 2008; Hegedűs és mtsai., 2008). A málnáknál és a szamócáknál nagyobb TEAC értékeket mértem, mint amelyek a FRAP és TPC értékekhez képest várhatóak lettek volna. Mindezek magyarázata a különböző interferenciát okozó komponensek, a C-

vitamin, az ásványi elemek stb. jelenlétében keresendő. Az összpolicfenol tartalmat a genotípus is befolyásolja (Anttonen és Karjalainen, 2005; Pantelidis és mtsai., 2007). A flavonoidok minősége és mennyisége a fajták között igen eltérő is lehet (Mikkonen és mtsai., 2001; Szajdek és Borowska, 2008), amely szintén kihathat az előzőekre (Balogh és mtsai., 2010).

Az eltérő kémiai háttértől függetlenül szoros összefüggést lehet kimutatni (**16. táblázat**) FRAP, összpolicfenol, ACL, és DPPH gyök megkötésén alapuló mérési módszerek eredményei között. Ennek magyarázata valószínűleg az, hogy a bogyós gyümölcsökben a már említett policfenolos vegyületek meghatározóak az antioxidáns kapacitás kialakításánál, így ugyanezen vegyületek hasonlóképpen reagálnak a Fe^{3+} , Folin-Ciocalteu reagens, DPPH gyök és a nagy reakcióképességű hidroxilgyökökkel szemben. A hidroxilgyök megkötésén alapuló módszerrel minden egyéb módszerrel kapott eredmény negatívan korrelál. Ez az eltérő mérési elvből, és a kiértékelés különbözőségéből adódik (Balogh és mtsai., 2010).

A **17. táblázat**ban kerül összefoglalásra az eddig bemutatott antioxidáns kapacitás mérések során kapott 'gyümölcsfaj sorrendek'. A táblázatból egyértelműen látszik, hogy az összes módszer esetében a fekete ribizskék rendelkeznek a legnagyobb antioxidáns kapacitással, a többi faj esetében a sorrend módszerfüggő volt. A TRSC módszernél statisztikailag nem lehetett különbséget tenni a málnák és a piros ribizskék között.

17. táblázat. Az alkalmazott mérési módszerekkel kapott sorrendek a vizsgált gyümölcsfajok esetében.

Redox paraméterek	Gyümölcsök					
ACW	piros ribiszke	<	málna	<	szamóca	< fekete ribiszke
ACL	szamóca	<	piros ribiszke	<	málna	< fekete ribiszke
TRSC	szamóca	<	málna	=	piros ribiszke	< fekete ribiszke
FRAP	szamóca	<	málna	<	piros ribiszke	< fekete ribiszke
TPC	szamóca	<	piros ribiszke	<	málna	< fekete ribiszke
TEAC	piros ribiszke	<	málna	<	szamóca	< fekete ribiszke
DPPH	szamóca	<	piros ribiszke	<	málna	< fekete ribiszke

A **18. táblázat**ban szerepelnek az antioxidáns kapacitások eredményei, a gyümölcs fajták közti sorrenddel kapcsolatban. A számozás 1-től 13-ig történt, a 13 fajtának köszönhetően. Az a fajta kapta az egyes számot, amely az adott mérési módszert alkalmazva a legjobb eredményt adta és a 13-at, amelyiknél a legrosszabb értéket mértem (Balogh és mtsai., 2010).

18. táblázat. Az alkalmazott mérési módszerekkel kapott sorrendek a vizsgált gyümölcsfajták esetében.

	ACW	ACL	TRSC	FRAP	TPC	TEAC	DPPH	Összpontszám	Végső sorrend
Elsanta	5	11	11	11	9	5	8	60	6
Honeoye	4	9	13	13	13	6	9	67	11
Onebor	8	8	12	12	10	10	12	72	12
Malling Exploit	11	12	8	6	8	12	5	62	8
Fertődi Zamos	9	7	10	10	11	13	6	66	10
Glen Ample	7	5	6	8	5	11	13	55	4
Rondom	13	6	5	9	12	8	11	64	9
Detvan	10	10	9	7	6	7	10	59	5
Johnkeer van Tets	12	13	7	5	7	9	7	60	6
Fertődi 1	2	3	4	1	3	1	1	15	1
Fertődi 11	3	2	2	3	1	3	2	16	2
Titánia	6	4	1	4	2	4	4	25	3
Otelo	1	1	3	2	4	2	3	16	2

A számok gyümölcsökhöz való hozzárendelése az adott antioxidáns kapacitás módszerrel kapott átlagos értéke alapján történt. Minden gyümölcs és módszer esetén a pontokat összeadva egy összesített pontszámot kapunk. Minél kisebb ez a szám, annál jobb antioxidáns kapacitással rendelkezik az adott gyümölcsfajta az alkalmazott vizsgálati módszereket tekintve.

Ez a táblázat (18. táblázat) rávilágít a mérési módszerek okozta különbségekre és a genetikai eltérésekre is. Könnyen áttekinthető, hogy más-más módszerrel mérve a gyümölcsfajok közötti sorrendek miként változnak. Például a 'Fertődi 1' fekete ribiszkénél mértem a legnagyobb antioxidáns kapacitást a FRAP, TEAC, illetve a DPPH gyök megkötésén alapuló módszerrel, viszont a legkisebb értéket adta a luminometriás módszerrel. A 'Honeoye' számóca több esetben is (FRAP, TPC, TRSC) a legkisebb antioxidáns kapacitást mutatta, viszont az ACW módban a negyedik legnagyobb értéket adta. Ennek a táblázatnak az áttekintése és elemzése során nyilvánvalóvá válik, hogy az alkalmazott módszer(ek)nek milyen meghatározó szerepe van a kapott antioxidáns kapacitás értékek kialakításában. A táblázatban (18. táblázat) szereplő végső sorrend a fajták antioxidáns erejét jellemzi, ami a következőképpen alakult:

**Fertődi 1 > Fertődi 11 = Otelo > Titánia > Glen Ample > Detvan > Jonkheer van Tets =
Elsanta > Malling Exploit > Rondom > Fertődi Zamos > Honeoye > Onebor**

A fajok közötti sorrend nem egyértelmű az átfedések miatt, csak annyit lehet biztosan állítani, hogy az alkalmazott módszereket tekintve a fekete ribiszkék adták a legkedvezőbb értékeket.

Az alkalmazott mérések, mind egy dolgot igyekeznek definiálni (az antioxidáns kapacitást), ennek ellenére mégis más és más végeredményt adnak. A genotípus hatással van a különböző vegyületek minőségére és annak arányaira is, ezen keresztül a polifenolos komponensek vízzoldhatóságára, a hidroxilcsoportok számára, így a lejátszódó reakciókra, illetve

a reakciókinetikára is. A különbségek döntő része ennek köszönhető, bár a mérések kémiai háttere is meghatározó (pH, reakcióidő, extrakció, alkalmazott hullámhossz, antagonisták és szinergens hatásokban stb.) (Verhagen és mtsai., 2003; Ozgen és mtsai., 2006). Mindezek külön-külön, és együttesen is kihatnak, illetve befolyással vannak a kialakult eredményekre. Ezek mérlegelése fontos a mérések célját illetően és legfőképp az eredmény tudatában meghozott döntés kapcsán (orvosi cél, nemesítési cél, termékfejlesztés stb.).

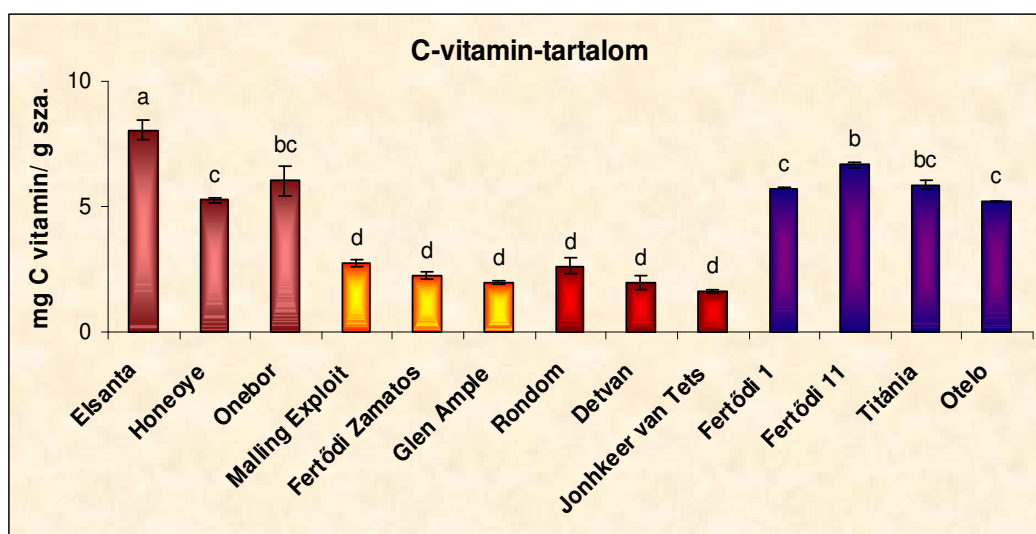
A következőkben kerülnek bemutatásra azok a mérési eredmények, amelyek azon összetevőkre, komponensekre vonatkoznak, amelyek szerepet játszanak az antioxidáns kapacitás kialakításában.

5.2.3. Az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata

5.2.3.1. Az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó vegyületek mennyiségi meghatározása

A C-vitamin-tartalom meghatározásakor a fajták közti különbségek 20-30 %-osaknak, míg a fajok közt 2-3-szorosaknak adódtak (37. ábra). A szamócák közül az 'Elsanta' fajta a fekete ribiszkék nagy C-vitamin-tartalmát is felülmúlja. Egyes kutatók hasonlóan nagy C-vitamin tartalmat mértek szamócák esetében (Hägg és mtsai., 1995; Hakala és mtsai., 2003). A kapott értékek összhangban állnak más irodalmi adatokkal is (Skupien és Oszmianski, 2004; Pantelidis és mtsai., 2007; Stratil és mtsai., 2007). A piros ribiszkék és a málnák értékei között nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$). A C-vitamin tartalom alapján kialakult sorrend, az eddig bemutatottaktól eltér:

piros ribiszke < málna < fekete ribiszke < szamóca



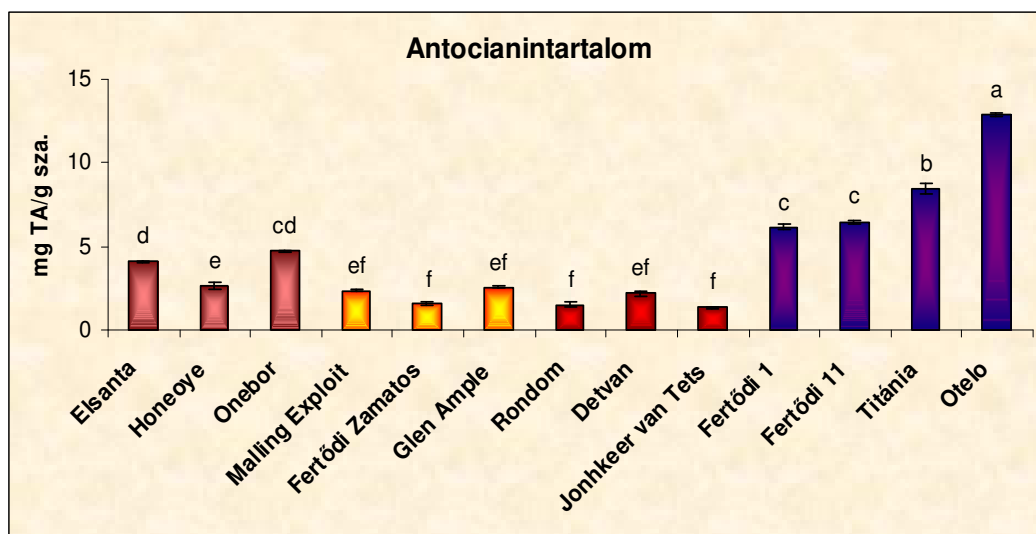
37. ábra. A gyümölcsminták C-vitamin-tartalmának alakulása (mg C-vitamin/g szárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A flavonoidokon belül az antocianinoknak van döntő szerepe a bogyós gyümölcsök élénk színének kialakításában. Az egyes antocianin-komponensek elválasztására, illetve meghatározására nem volt lehetőségem, így csupán az *összantocianin tartalom* alakulását tudom bemutatni (38. ábra). Egyes kutatók véleménye szerint az antioxidáns kapacitás kialakításáért elsősorban nem ezek a vegyületek felelősek (Karakaya és El, 1999), hanem egyéb flavonoid vegyületek, hiszen a polifenol tartalomnak csak kis hányadát teszik ki (Reynertson és mtsai., 2008). Ennek ellenére számos antioxidáns kapacitás mérési módszerben standardként nagy értékeket adnak (Szajdek és Borowska, 2008), viszont az emberi szervezetben való felszívódásuk a flavonoid vegyületek közül a legrosszabbak közé sorolható (Wu és mtsai., 2002).

Az antocianintartalom a vártnak megfelelően alakult, a fekete ribiszkék 3-10-szer több antocianint tartalmaznak, mint a vizsgálatban szereplő többi gyümölcsfaj. A kapott értékek összhangban állnak az irodalmi adatokkal (Meyers és mtsai., 2003; Pantelidis és mtsai., 2007; Patras és mtsai., 2009). A legtöbb antocianinnal az 'Oteló' rendelkezik, míg a legkisebb értéket a 'Rondom'-nál kaptam. A kettő között közel 15-szörös a különbség.



38. ábra. A bogyós gyümölcsök összantocianin tartalma (mg cianidin-3-glükózid/ g szárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

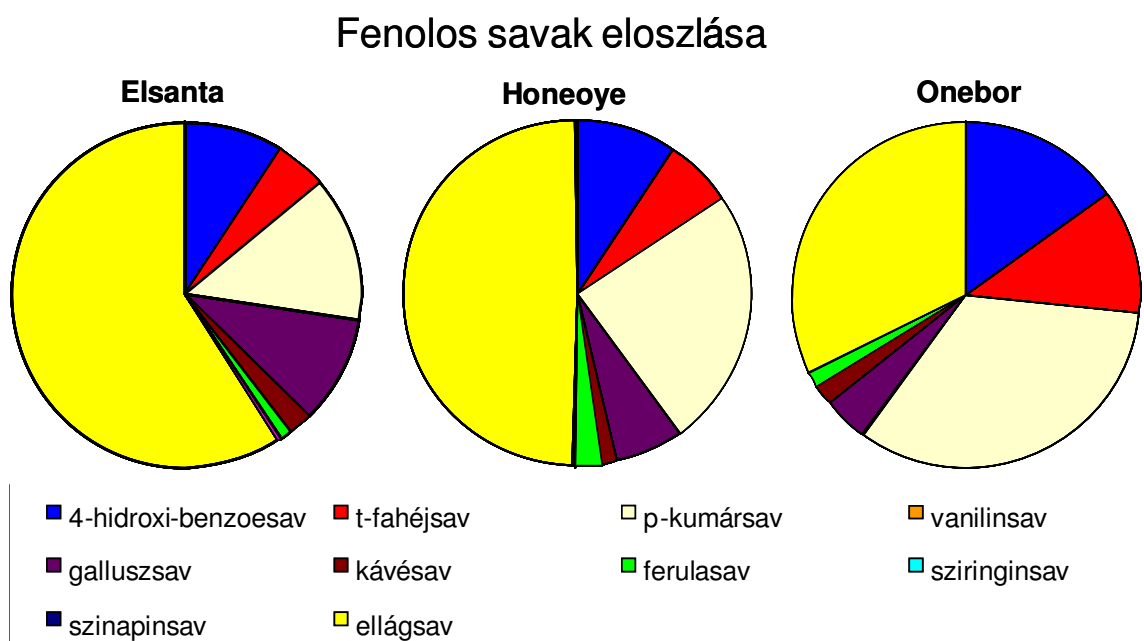
Irodalmi adatok alapján a szamócánál az összantocianin-tartalom 77%-át teszi ki a pelargonidin-3-glükózid (Gil és mtsai., 1997; Wang és mtsai., 2002), míg a málnánál a cianidin-3-szoforozid és a cianidin-3-glükózid a legjellemzőbb (Mullen és mtsai., 2002; Salinas-Moreno és mtsai., 2009). A ribiszkéknél négy meghatározó komponenst lehet kiemelni, ezek a vegyületek a delfinidin-3-rutinozid, a cianidin-3-rutinozid, a delfinidin-3-glükózid és a cianidin-3-glükózid (Slimestad és Solheim, 2002). Ezen vegyületek a fekete ribiszkéknél több, mint 97%-

át adja az összantocianin tartalomnak. Mindezek eltérő mennyisége és minősége is szerepet játszhat az előbbieken bemutatott antioxidáns kapacitás eredményekre is. Az összantocian-tartalom a vizsgált bogyós gyümölcsök között a következőképpen alakult:

piros ribiszke<málna<szamóca<fekete ribiszke

A polifenolos alkotókon belül a *fenolos savak* is rendkívül fontos antioxidánsok; kísérletek bizonyították, hogy a gyökfogó képességük jóval nagyobb, mint a C-vitaminnak, vagy az α -tokoferolnak (Hagerman és mtsai., 1998; Szajdek és Borowska, 2008). A fenolos savakon belül a legjelentősebb komponensek mennyiségi meghatározására volt lehetőségem standard addíciós technika segítségével. Az eredmények bemutatására kétféle eszközt, kör és oszlopdiagramot alkalmaztam. A kördiagramban egy-egy gyümölcsfajta vizsgált komponenseinek aránya látható, fajonként csoportosítva. Ezzel a fajták közötti különbségeket és a fenolos savak gyümölcsökön belüli arányát kívántam szemléltetni. Az oszlopdiagramok esetében mindig egy-egy kiragadott komponens valós mennyisége kerül bemutatásra a vizsgált gyümölcsökre vonatkozólag.

Az irodalommal összhangban a szamócánál (39. ábra) az ellágsav és a para-kumársav a meghatározó (Hakkinen és mtsai., 1999a; Skupien és Oszmianski, 2004), de a fajták közötti mennyiségük nagymértékben eltér. E két sav mennyisége az összes vizsgált savakat tekintve, közel 75%-ot tesz ki.

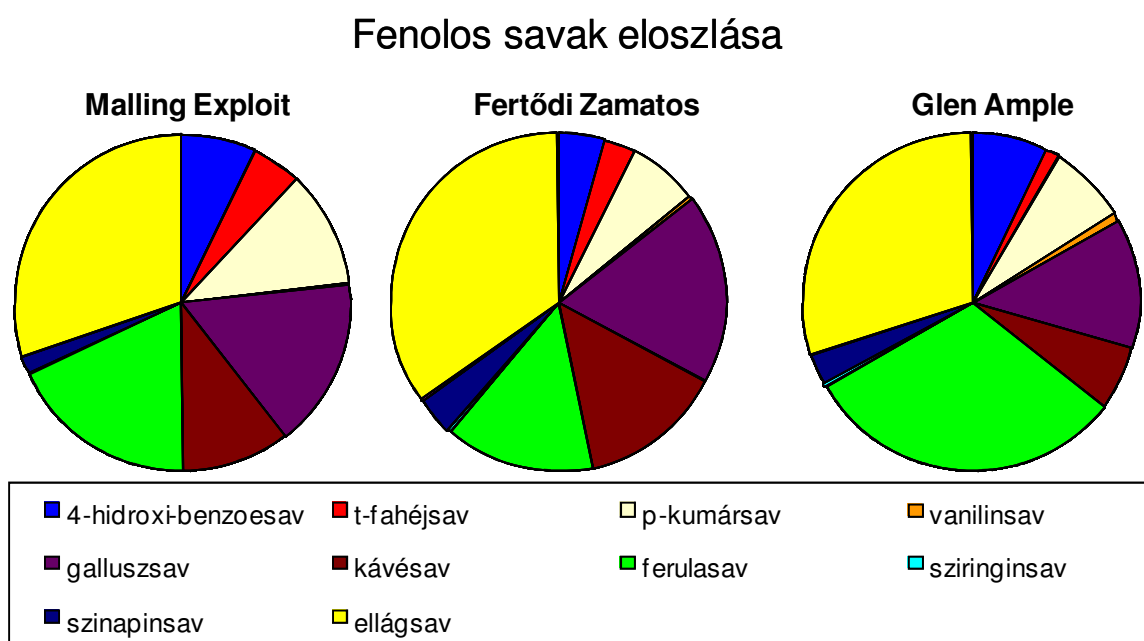


39. ábra. A vizsgált fenolos savak aránya a szamóca minták esetében

E két domináns sav aránya az 'Oonebor' és az 'Elsanta' esetében a leglátványosabb: míg az 'Oonebor'-nál az ellágsav és a para-kumársav aránya 1:1-hez, addig az 'Elsanta'-nál ez az arány

4:1-hez, a 'Honeoye' esetében 2,5:1-hez. Ezek mellett a szamócéknál a 4-hidroxi-benzoésav, a t-fahéjsav és a galluszsav volt kimutatható nagyobb mennyiségben. Az antioxidáns tesztekben nagy értékeket adó galluszsav, valamint a két galluszsavból kialakuló ellágsavban az 'Elsanta' a leggazdagabb. Megállapítható továbbá, hogy a t-fahéjsav, p-kumársav, kávésav, ferulasav metabolit út alkotói (**III. melléklet**) közül a szamócék esetében inkább a kezdeti metabolitok dominálnak (Zhao és Moghadasian, 2008).

A méréseim alapján a málnáknak szintén nagy az ellágsav tartalma (**40. ábra**), azonban amellet a ferula-, a gallusz-, és a kávésav aránya is jelentős, amely más szerzők megfigyelését is alátámasztja (Hakkinen és mtsai., 1999a; Salinas-Moreno és mtsai., 2009). Ezek együttesen a málnák fenolos sav tartalmának 75%-át teszik ki. A vizsgált gyümölcsökön belül a málnák a legnagyobb arányban tartalmazznak ferulasavat.



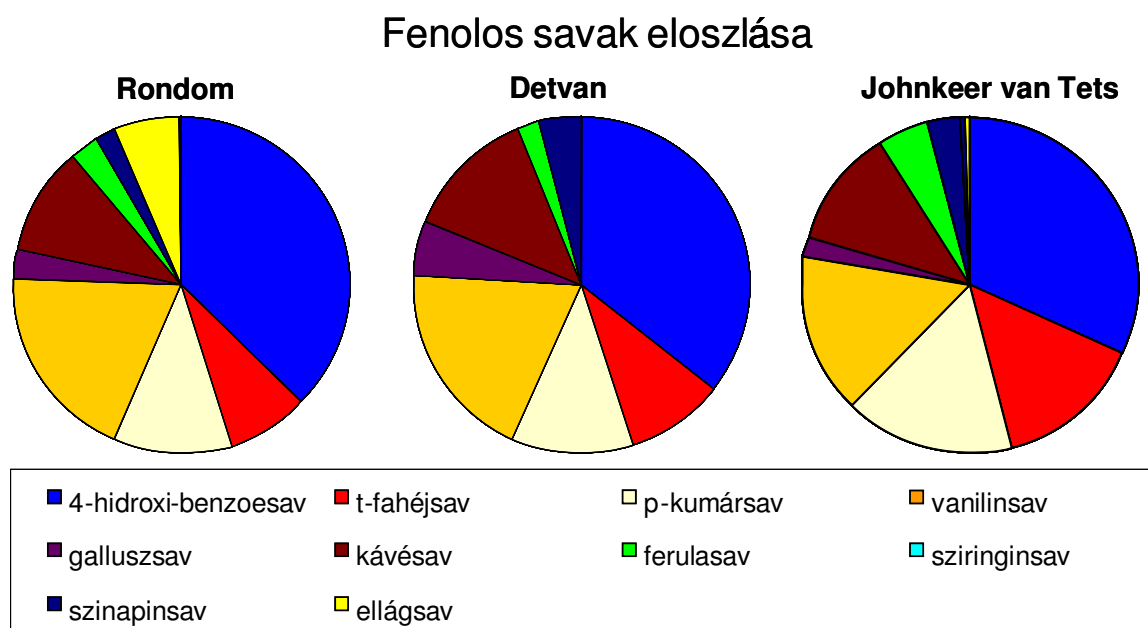
40. ábra. A vizsgált fenolos savak aránya a málna minták esetében

A 4-hidroxi-benzoésav, a fahéjsav és a p-kumársav arányuk kisebb a szamócéknál, azonban számottevő a szinapinsav tartalmuk. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a hidroxi-fahéjsav származékok közül inkább az összetettebb metabolitok dominálnak (ferulasav, szinapinsav). Ugyanakkor a galluszsav/ellágsav arányuk azt mutatja, hogy a szamócékhoz képest nagyobb a nem kondenzált galluszsav aránya.

A piros ribiszkéknél (**41. ábra**) a 4-hidroxi-benzoésav a domináns, több mint 1/3-ad részét adja a vizsgált fenolos savaknak. Továbbá, a hidroxi-benzoésav származékok közül az összetettebb (többszörösen hidroxilált) galluszsav kisebb arányban van jelen a vizsgált fajtnál

és a szamócákra és málnákra jellemző kondenzált galluszsav-származék, az ellágsav csak a 'Random' fajtánál számottevő.

A hidroxifahéjsav származékok közül is a t-fahéjsav, a para-kumársav, és a kávéssav nagy, míg a ferulasav kisebb arányban van jelen, azaz megállapítható, hogy a t-fahéjsav, p-kumársav, kávéssav, ferulasav metabolit út alkotói közül (Zhao és Moghadasian, 2008) inkább a kezdeti metabolitok dominálnak (**III. melléklet**).

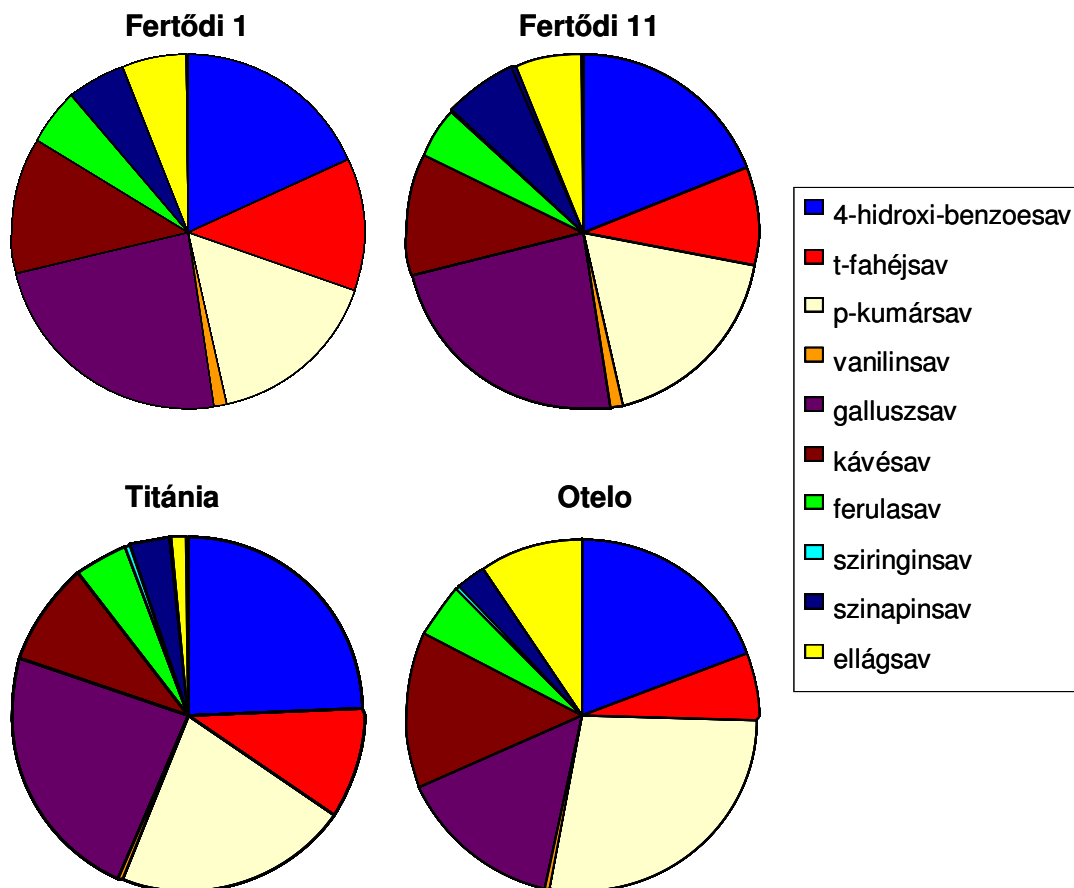


41. ábra. A vizsgált fenolos savak aránya a piros ribiszke minták esetében

A fekete ribiszke mintáknál (**42. ábra**) a 4-hidroxi-benzoessav, a para-kumársav, a galluszsav, a kávéssav a legmeghatározóbb, de a t-fahéjsav, a szinapin- és az ellágsav is kimutatható nagyobb mennyiségben. A fajták közötti különbségek e tekintetben nem olyan látványosak, mint a szamócáknál, vagy a málnáknál. Ugyanakkor a galluszsav/ellágsav arány érdekes módon jelentős különbségeket mutat az egyes fajták között (lásd Titánia és Otelo).

Ami a 'Fertődi 1' és a 'Fertődi 11' fajta fenolos sav arányait illeti, hasonló képet kapunk. A 'Titánia' és az 'Otelo' között azonban jelentősebb a különbség, az arányokat tekintve az 'Otelo' parakumársavban, kávéssavban és ellágsavban gazdagabb, míg a 'Titánia' t-fahéjsavban, és galluszsavban kiemelkedőbb.

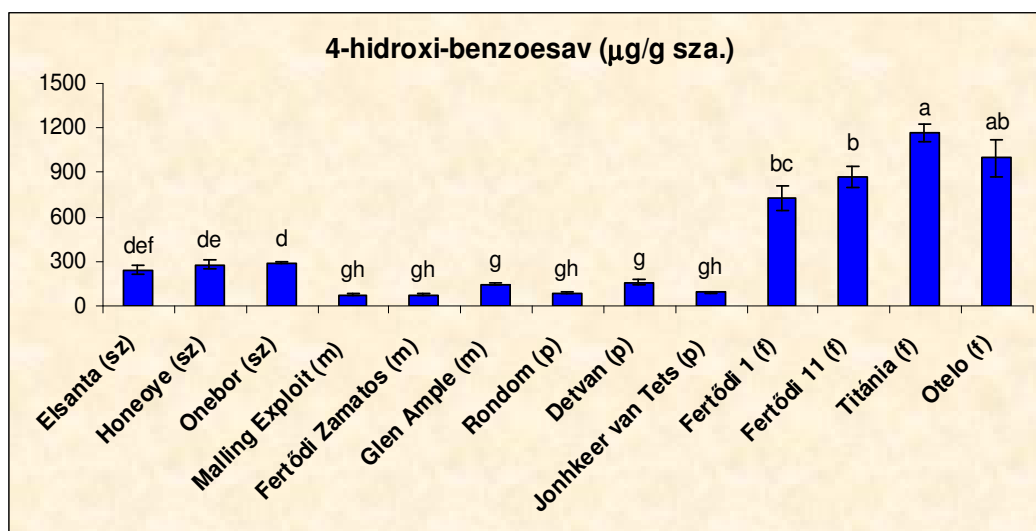
Fenolos savak eloszlása



42. ábra. A vizsgált fenolos savak aránya a fekete ribiszke minták esetében

A következőkben 1-1 komponens mennyiségének alakulása kerül bemutatásra oszlop diagramban a 13 fajta esetében.

A gyümölcsök 4-hidroxi-benzoetsavtartalma 75-1166 $\mu\text{g/g}$ értékek között mozog (**43. ábra**). A különbségek a fajok között jelentősek, akár tízszeresek is lehetnek (piros ribiszke-fekete ribiszke, málna-fekete ribiszke). A legtöbb 4-hidroxi-benzoetsavat a fekete ribiszkéknél mértem, ezt követték a szamócák, majd közel azonos mennyiséget tartalmaznak a málnák és a piros ribiszkék.

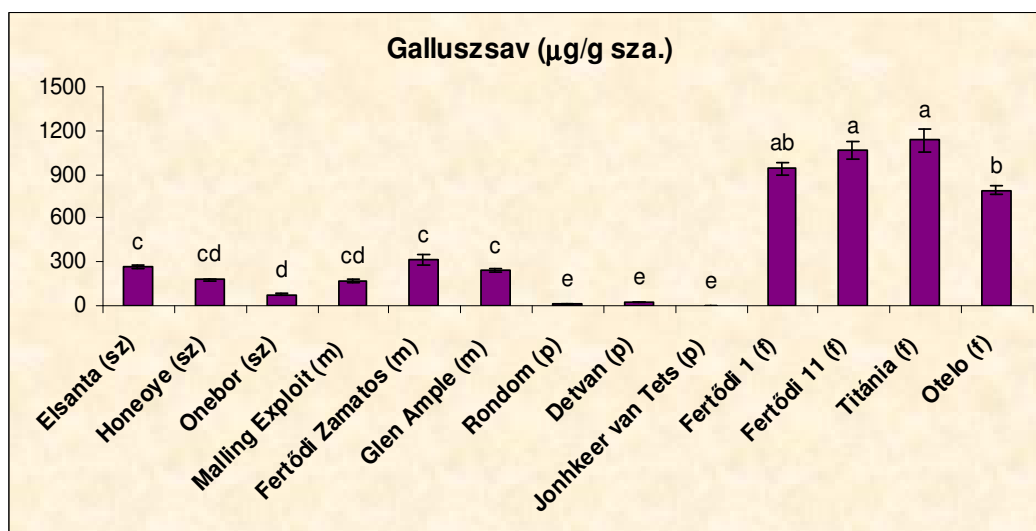


43. ábra. A minták 4-hidroxi-benzoésav tartalmának alakulása (µg 4-hidroxi-benzoésav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Méréseim alapján a szamócák és a málnák átlagos *galluszsav* tartalma között csupán 30%-nyi eltérés van (44. ábra), míg más szerzők ennél nagyobb, csaknem hatszoros különbségről számolnak be a málnák javára (Li és mtsai., 2009). A piros ribiszkék *galluszsav* tartalma rendkívül kicsi, 23 µg alatti, ellentétben a fekete ribiszkékével, amelyek 633 -1379 µg *galluszsav*at tartalmaznak grammonként.



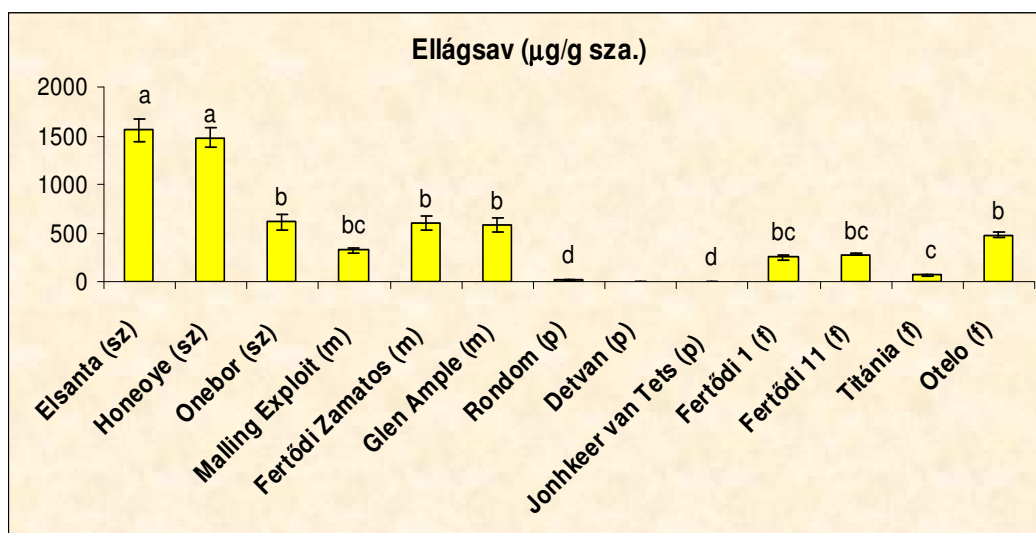
44. ábra. A gyümölcsminták *galluszsav* tartalmának alakulása (µg *galluszsav*/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Bár a komponensek együttesen fejtik ki a hatásukat, de ez a mennyiségbeli különbség lehet az egyik oka, amiért a fekete ribiszkék az antioxidáns kapacitást mérő rendszerekben mindig kiemelkedő helyen szerepelnek, ugyanis a három hidroxilcsoportot tartalmazó galluszsav nagy antioxidáns kapacitással bír (Soobrattee és mtsai., 2005; Villano és mtsai., 2005).

Az *ellágsav*tartalom a még zöld gyümölcsöknél a legnagyobb, az érés előrehaladtával szignifikánsan csökken a mennyisége (Williner és mtsai., 2003). Két számócafajta ('Elsanta', 'Honeoye') ennek ellenére is közel 1,6 mg-ot tartalmaz grammonként (**45. ábra**). Az irodalommal összhangban a számócák és egyes tanulmányok szerint a málnák legjellemzőbb fenolos sava (Hakkinen és mtsai., 1999a; Skupien és Oszmianski, 2004). Hakkinen vizsgálatai (1999) alapján a finn málnáknál az ellágsav, a fenolos savak 88 % teszi ki. A szerző nagy különbségekről számol be, mely szerint egyes málnáknál egyáltalán nem lehetett ellágsavat kimutatni. Más fajtáknál akár 3-4 szeres különbségek is kialakultak (Anttonen és Karjalainen, 2005).



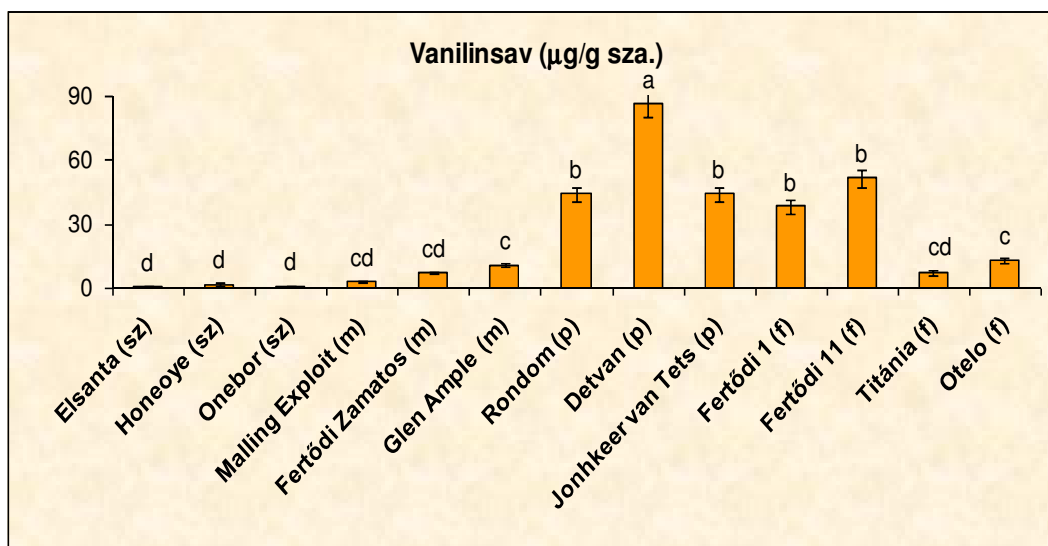
45. ábra. A gyümölcsminták ellágsav-tartalmának alakulása (µg ellágsav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: számóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A vizsgálatban bevont bogyós gyümölcsöknél 600 µg/g alatti értékeket kaptam, majd ezt követték a fekete ribiszkék. A 'Titania' és az 'Oteló' között hétszeres különbség van. A piros ribiszkék ellágsav-tartalma csekély, a 'Detvan'-nál nem volt kimutatható mennyiség.

*Vanilinsav*ban a piros ribiszkék gazdagabbak a többi gyümölcsnél (**46. ábra**). A fekete ribiszkék esetében a 'Fertődi 1', illetve 'Fertődi 11' fajta nagyobb mennyiségben, 3-5-ször több vanilinsavat tartalmaz, mint a másik két fajta. A számócák vanilinsav-tartalma csekély, ezeket a málnák követik.

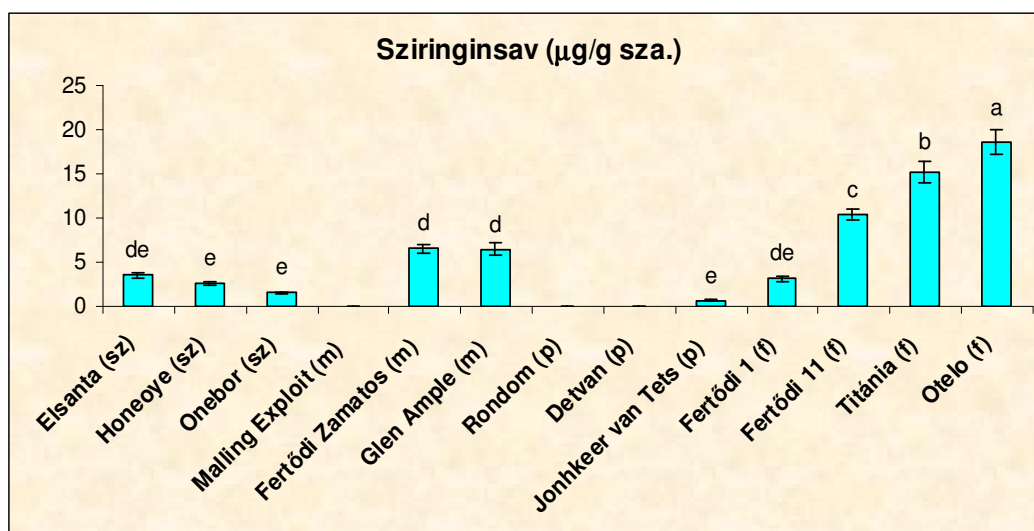


46. ábra. A gyümölcsminták vanilinsav-tartalmának alakulása (µg vanilinsav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A *sziringinsav*ban a bogyós gyümölcsök szegények (47. ábra), inkább jellemzőbb az almára, kinaikékre vagy a karfiolra, de nagyobb mennyiségben található meg a vörösborokban is (Radtke és mtsai., 1998; Ho és mtsai., 1999).



47. ábra. A gyümölcsminták sziringinsav-tartalmának alakulása (µg sziringinsav/g szárazanyag)

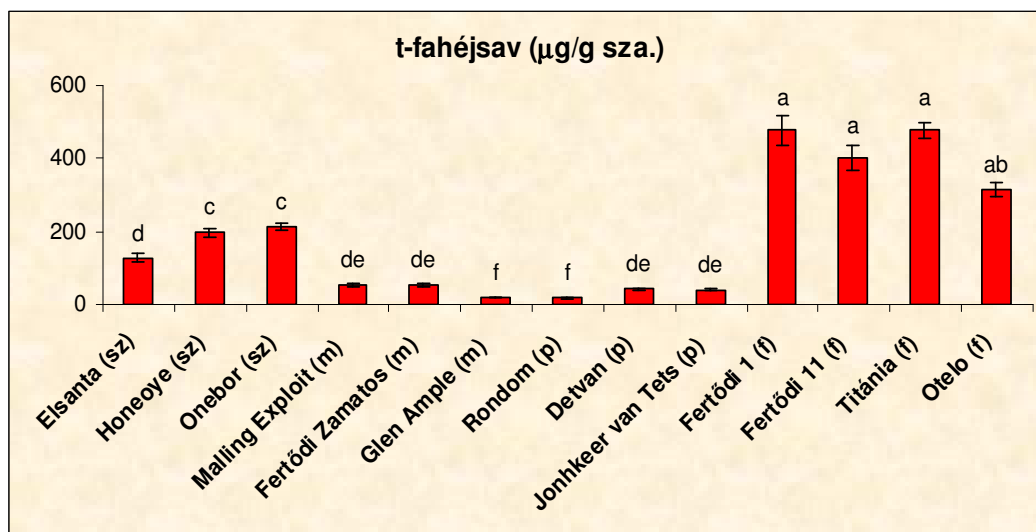
(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Mennyisége a 'Malling Exploit', a 'Rondom' és a 'Detvan' fajtáknál kimutatási határ alatt volt. A fekete ribizskéknél a sziringinsav diszkrimináló (diszkrimináló komponens alatt értem: azt az alkotót, amelyik olyan módon jellemez egy adott csoportot, hogy az szignifikánsan

hozzájárul az adott csoport statisztikai elkülönítéséhez), jelentős a különbség közöttük ($p < 0,05$), amelynek hátterében az anyagcsereutak (**III. melléklet**) eltérő alakulása állhat.

A *fahéjsav* a fenilalaninból keletkező, első köztes anyagcseretermék. A málna és a piros ribiszkék t-fahéjsav-tartalma hasonló (**48. ábra**), ezt követték a szamócák, majd a fekete ribiszkék, csakúgy, mint a 4-hidroxi-benzoésav esetén (**43. ábra**). A gyümölcsök t-fahéjsav-tartalma 18 ('Rondom') - 478 ('Titánia') $\mu\text{g/g}$ között mozog.

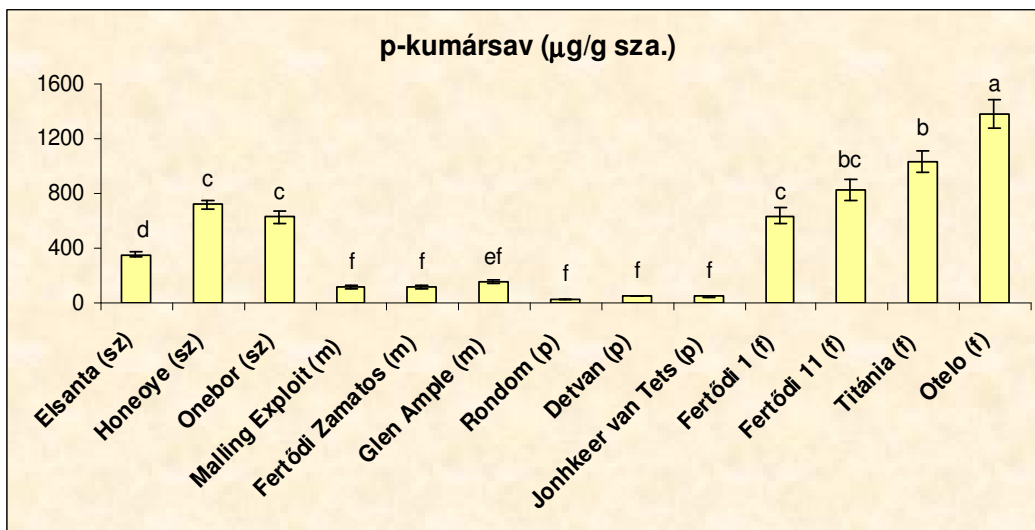


48. ábra. A gyümölcsminták t-fahéjsav-tartalmának alakulás (μg t-fahéjsav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A *parakumársav* szintetizálódhat mind a tirozinból, mind a fenilalaninból keletkező fahéjsavból. A piros ribiszkék para-kumársav-tartalma kicsi, 50 $\mu\text{g/g}$ alatti, ennél háromszor többet tartalmaznak a málnák, majd ezt követik a szamócák (**49. ábra**).



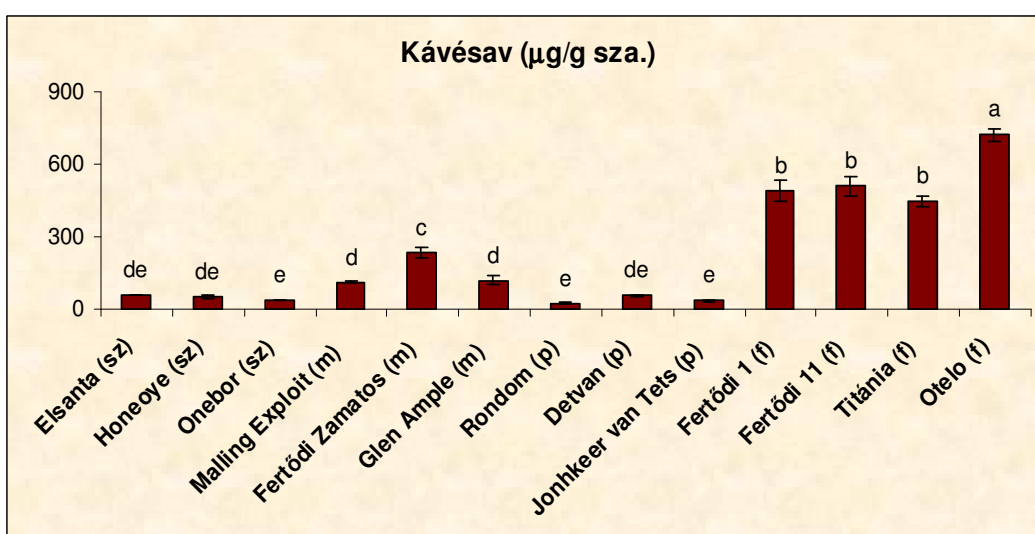
49. ábra. A gyümölcsminták p-kumársav-tartalmának alakulása (µg p-kumársav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A fekete ribiszkék értékei között nagy eltéréseket tapasztaltam, a para-kumársav-tartalmuk 600 és 1400 µg között mozogtak.

A kávéssav a para-kumársavból keletkező köztes anyagcseretermék. Kávéssavban leggazdagabbak a fekete ribiszkék, ezeket követik a málnák (50. ábra). Jóval szegényebbek a szamócák, és a piros ribiszkék, amelyek eredményei között statisztikailag nem volt különbség ($p < 0,05$). Az 'Otelo' kávéssavtartalma kiugró a fekete ribiszkék között, valamint a málnák közül a 'Fertődi Zamos' volt kiemelkedő.



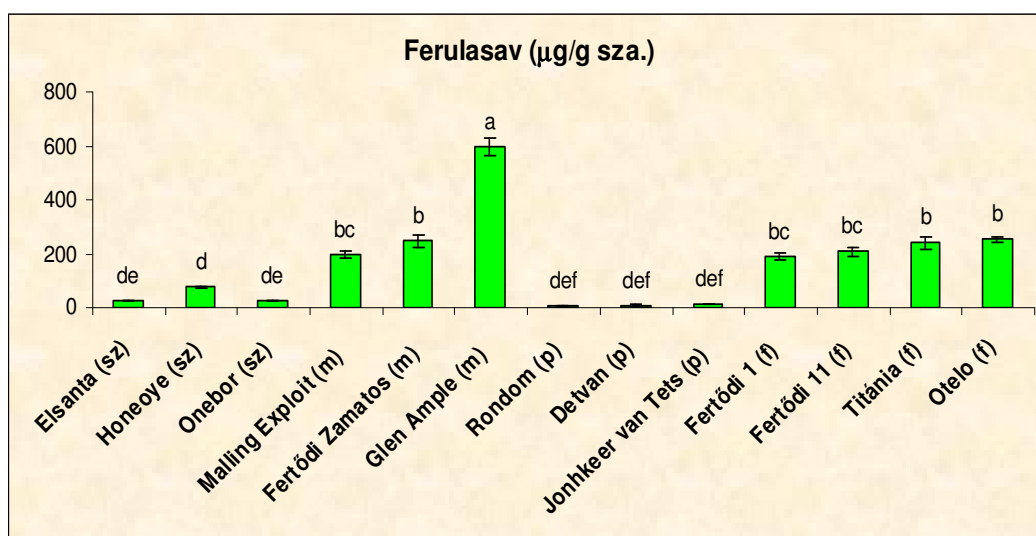
50. ábra. A gyümölcsminták kávéssav tartalmának alakulása (µg kávéssav/g szárazanyagra vonatkoztatva)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

DPPH rendszerben, megelőzi a vanilinsavat, para-kumársavat, ferulasavat, továbbá a kempferolt és a rezveratrolt is (Zhou és mtsai., 2006). A kávéssavból klorogénsav, valamint ferulasav keletkezik az anyagcsere út során (**III. melléklet**). Ezek antioxidáns kapacitása közepes vagy kicsi, tesztől függően, vagyis ennek tekintetében az anyagcsere előrehaladtával a keletkező komponensek antioxidáns ereje csökken (Soobrattee és mtsai., 2005; Tabart és mtsai., 2009).

A málnák és a fekete ribiszkék ferulasavtartalma kiemelkedő volt a vizsgált gyümölcsök között (**51. ábra**). A legnagyobb értéket a 'Glen Ample' fajtánál mértem, közel 600 µg ferulasavat tartalmaz grammonként, kétszer annyit, mint a másik két fajta, vagy a fekete ribiszkék. A málnák nagy mennyiségben tartalmazzák ezt a fenolos savat, amely önmagában-standardként vizsgálva nem mutat erős antioxidáns hatást (Zhou és mtsai., 2006).

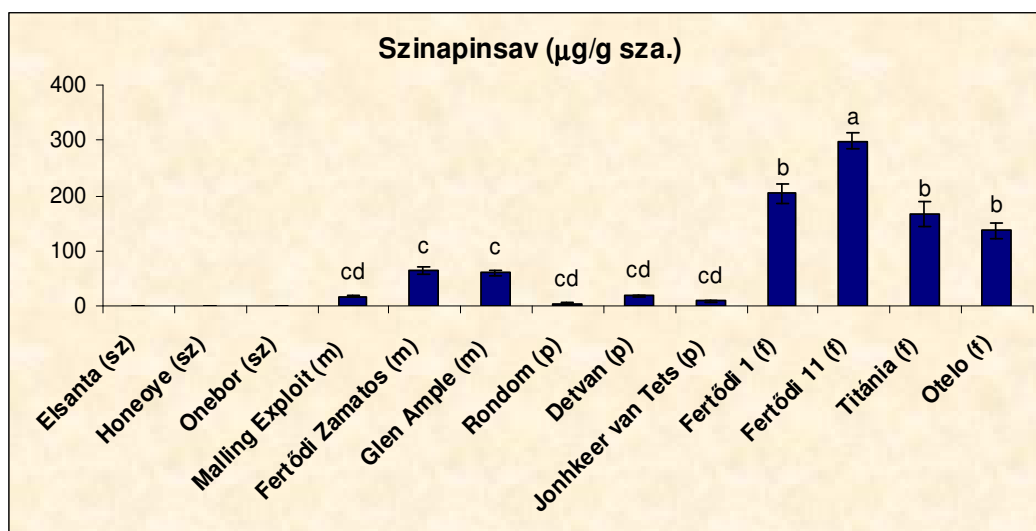


51. ábra. A gyümölcsminták ferulasav-tartalmának alakulása (µg ferulasav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Vizsgálataim alapján a szinapinsav nem jellemző a szamócákra, és a piros ribiszkénél is csak csekély mennyiségben lehet kimutatni (**52. ábra**). A málnák szinapinsav-tartalma 64 µg/g alatti. A fekete ribiszkék ennél 3-4-szer többet tartalmaznak.



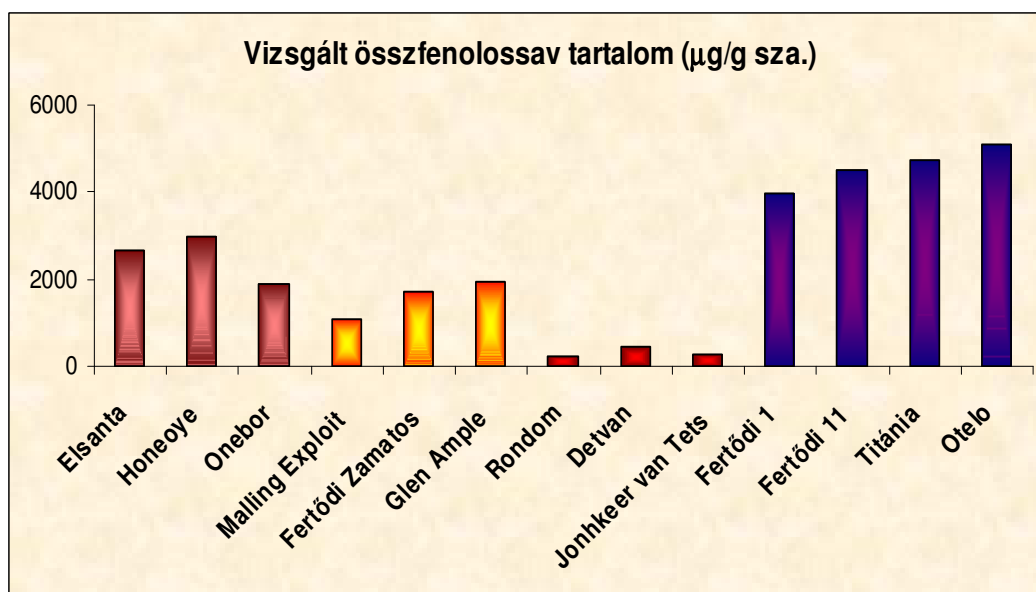
52. ábra. A gyümölcsminták szinapinsav tartalmának alakulása (µg szinapinsav/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

Az általam meghatározott *fenolos savak összesített mennyisége* egy összefoglaló ábrán kerül bemutatásra (**53. ábra**). A kapott értékek az eddig bemutatott fenolos savak átlag értékeinek összessége, az így kapott értékekhez ezért nem tartozik szórás.

A fajok és a fajták közötti különbségek jelentősek, a piros ribiszkék 500 µg alatti értékkel rendelkeznek, míg a fekete ribiszkék 4000 µg feletti fenolossav-tartalommal bírnak. A málnák és a szamócák értékei 1000-3000 µg között mozognak.



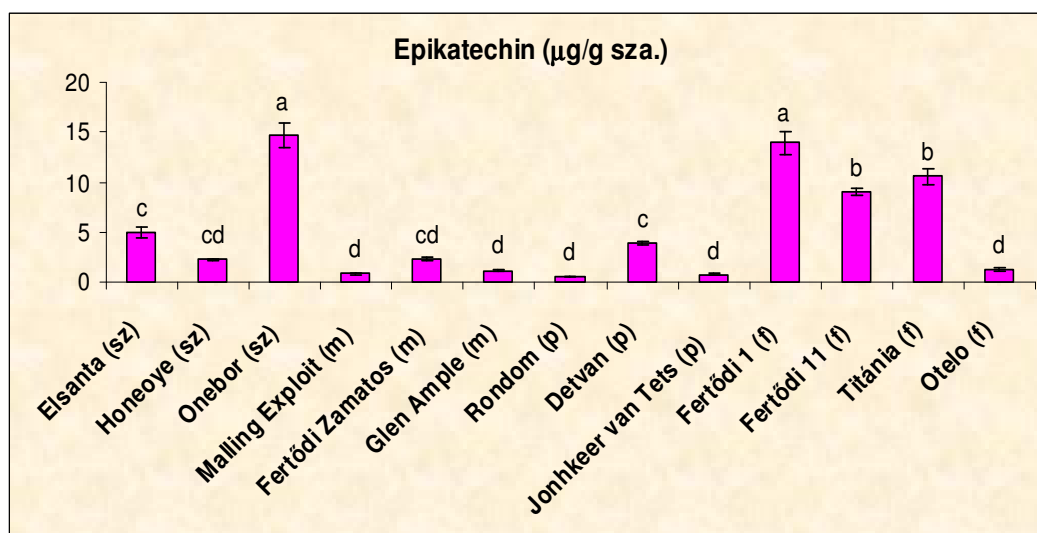
53. ábra. A gyümölcsminták vizsgált összfenolos savtartalmának alakulása (µg fenolossav/g szárazanyag)

(Jelmagyarázat: ■: szamóca, ■: málna, ■: piros ribiszke, ■: fekete ribiszke)

Bár a polifenolos alkotók csoportján belül számtalan vegyület játszik szerepet az antioxidáns kapacitás kialakításában, és a fenolos savak ezeknek csak egy töredékét teszik ki, de a különbségek nemcsak a mennyiségben, hanem minőségben is jelentősek voltak. Mindezek részben magyarázatul szolgálhatnak arra nézve, hogy a fekete ribiszkék miért mutatják a legnagyobb antioxidáns kapacitást az alkalmazott tesztekre vonatkozólag.

Végül a flavanolak közül a katechin, illetve az epikatechin mennyiségének megmérésére is alkalmas nyílt, azonban a *katechin* mennyisége kimutatási határ alatt volt a vizsgált gyümölcsökben.

Az *epikatechin* tekintve a vizsgált gyümölcsök esetén az értékek 16 µg alattiak (**54. ábra**). E tekintetben kaptam a legnagyobb különbségeket a 13 fajta között. Az 'Onebor' szamóca kiugrik a másik két fajta közül, hiszen a detektált mennyiség alapján a 'Fertődi 1' fekete ribiszkéhez hasonlítható, szignifikáns különbséget nem lehetett kimutatni ($p < 0,05$).



54. ábra. A gyümölcsminták epikatechin-tartalmának alakulása (µg epikatechin/g szárazanyag)

(Rövidítések: sz: szamóca, m: málna, p: piros ribiszke, f: fekete ribiszke)

Az azonos betűkkel jelölt értékek között statisztikailag nincs szignifikáns különbség ($p < 0,05$)

A következőkben az általam használt különböző antioxidáns kapacitás módszerekkel kapott eredmények és az egyedi jellemzők közötti összefüggések kerülnek bemutatásra.

A **19. táblázatban** szerepelnek az alkalmazott antioxidáns kapacitás mérési módszerek és az egyes komponensek mennyisége közötti korrelációs koefficiensek. Ami első ránézésre is szembetűnik, hogy a TRSC módszer mindegyik komponenssel különböző mértékben ugyan, de fordított arányos összefüggést mutat. Ez alól kivétel az ellágsav, ahol nem negatív, hanem pozitív a korrelációs koefficiens értéke. Mindez abból adódik, hogy a többi mérési módszerhez

képest, eltérő az eredmények kiértékelése. A legnagyobb értékeket adó gyümölcsök ebben az esetben a leggyengébb antioxidánsok, továbbá emellett az is szerepet játszik, hogy a fekete ribizskék értékei általában mindig szignifikánsan nagyobbak voltak a többi gyümölcs értékeinél, amely alól elsősorban az ellágsav tartalom volt a kivétel, hiszen az a szamócákra jellemző fenolos sav.

19. táblázat. A redox paraméterek és a vizsgált komponensek közötti korrelációs koeficiensek értékei

tartalom	ACW	ACL	TRSC	FRAP	TPC	DPPH	TEAC
C vitamin	0,550	0,338	-0,215	0,268	0,421	0,479	0,638
összantocianin	0,799*	0,881*	-0,710	0,723*	0,631	0,749*	0,700*
4-hidroxi-bezoessav	0,745*	0,845*	-0,832	0,780*	0,864*	0,846*	0,734*
t-fahéjsav	0,755*	0,702*	-0,728	0,722*	0,807*	0,836*	0,821*
p-kumársav	0,757*	0,778*	-0,579	0,587	0,610	0,701*	0,711*
vanilinsav	-0,004	0,043	-0,256	0,311	0,160	0,171	-0,252
galluszsav	0,753*	0,811*	-0,865	0,816*	0,911*	0,902*	0,829*
kávésav	0,864*	0,945*	-0,882	0,895*	0,750*	0,915*	0,812*
ferulasav	0,239	0,433	-0,345	0,255	0,321	0,194	0,265
sziringinsav	0,605	0,835*	-0,689	0,603	0,675	0,636	0,567
szinapinsav	0,730*	0,788*	-0,873	0,869*	0,902*	0,931*	0,731*
ellágsav	0,055	-0,240	0,536	-0,449	-0,352	-0,262	0,178
összes fenolossav	0,821*	0,805*	-0,670	0,667	0,740*	0,798*	0,861*
epikatechin	0,346	0,218	-0,287	0,305	0,497	0,412	0,429

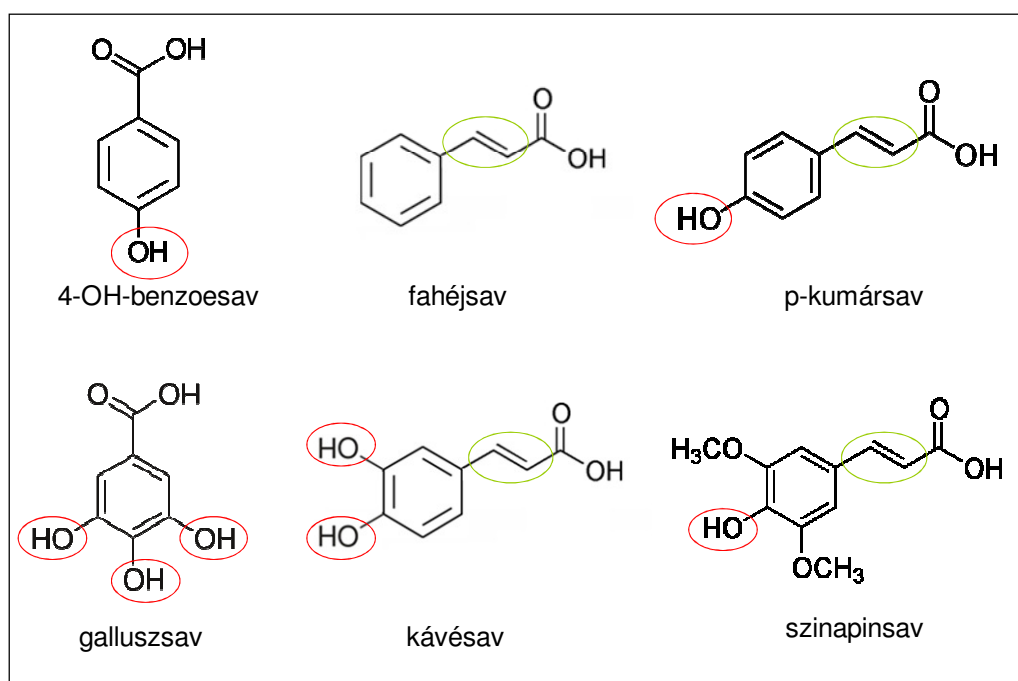
*szignifikáns $p < 0,05$

A C-vitamin tartalom és az általam mért antioxidáns kapacitás eredmények közötti korreláció kisebb, mint az összantocianin tartalom, vagy az összes fenolossav és az antioxidáns kapacitások közötti. Annak ellenére, hogy az aszkorbinsav erős redukálószer, az elektron-átmenettel járó antioxidáns kapacitást mérő módszerekkel kapott eredmények között sincs szoros összefüggés. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy a mintában található egyéb komponensek (polifenolos vegyületek) "maszkirozzák" ennek az elvárt hatásnak a jól érzékelhető kifejeződését. Így a bogyós gyümölcsöknél a nagy polifenoltartalomnak köszönhetően, a C-vitamin az antioxidáns kapacitás kialakításában nem elsődlegesen szerepet játszó vegyület. Ez többek közt annak is köszönhető, hogy a polifenolos vegyületek, egy nagy csoportot jelöl, számtalan komponenssel. A bogyós gyümölcsökben ezen vegyületcsoport együttesen nagyobb antioxidáns kapacitást mutat, mint a C-vitamin önmagában (Wang és mtsai., 1996; Szajdek és Borowska, 2008). Hasonló eredményre jutottak más kutatók is ezen a téren, miszerint a C-vitamin-tartalom és az antioxidáns kapacitás között nincs feltétlen szoros összefüggés (Kalt és mtsai., 1999; Wang és Lin, 2000). Ezt alátámasztva, számos közlemény jelent meg arra vonatkozólag is, hogy a C-vitaminnál a polifenolos vegyületek külön-külön is, erősebb

antioxidánsok az alkalmazott tesztekben, és ez lehet a másik oka a kisebb korrelációs koefficiens értékeknek (Rice-Evans és mtsai., 1997; Tabart és mtsai., 2009).

Az antocianintartalom csak a TPC módszerrel nem mutat szignifikáns összefüggést, ami abból adódhat, hogy valószínűleg egyéb polifenolos vegyületek mennyisége, valamint szerepe meghatározóbb lehet. Ezt alátámasztja az is, miszerint inkább a szintelen flavonoid vegyületek okozzák a szorosabb korrelációt (Wicklund és mtsai., 2005). Bár az általam vizsgált összes fenolos sav mennyisége a FRAP és a TPC módszerrel nem mutat olyan szoros összefüggést, de DPPH, ACW és ACL rendszerben nagy korrelációs koefficiens értéket kaptam. Ennek magyarázata, hogy szerepet játszanak számos, nem vizsgált fenolos savak, flavonoidok és egyéb vegyületek a kapott értékek kialakításában, valamint nem szabad megfeledkezni az interferenciát (cukrok stb.) okozó komponensek jelenlétéről sem.

Amint az a táblázatból (19. táblázat) kiderül egyes komponensek esetén minden módszerre vonatkozólag szignifikáns az összefüggés. Ilyen vegyület a 4-hidroxi-benzoészav, a t-fahéj, a gallusészav, a kávéészav és a szinapinsav, amelyek antioxidáns hatásáért felelős molekula részleteit az 55. ábra mutatja. Ezek mennyisége ennek következtében fontos paraméter az antioxidáns kapacitás kialakításában az általam alkalmazott módszerek mindegyike esetén.



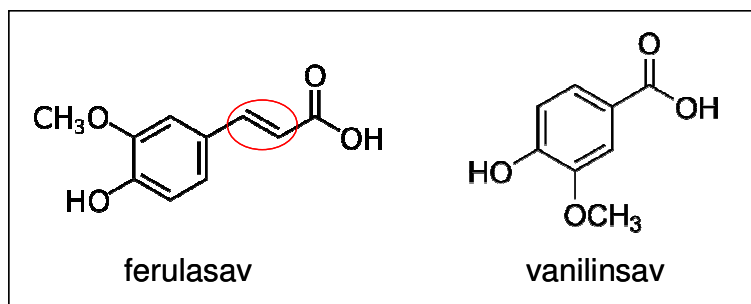
55. ábra. Az antioxidáns hatás kialakításában szerepet játszó molekula részletek 4-OH benzoészav, fahéjészav, p-kumáresav, gallusészav, kávéészav és szinapinsav esetében

Ennek ellenére azonban, ami a 4-hidroxi-benzoészav standardként való antioxidáns kapacitását illeti, számos mérési rendszerben nem mutatott aktivitást. A szuperoxid aniongyök befogásán alapuló módszerben nem volt reakcióképes, csakúgy, mint az ABTS vagy a DPPH

gyökkel szemben sem (Zhou és mtsai., 2006), viszont hatásosnak bizonyult ORAC módszernél (Yen és Duh, 1994). Bár számos komponens együttesen fejti ki hatását, amelynek eredményeként az antioxidáns kapacitás értéket megkapjuk, de standardként vizsgálva FRAP módszerben a galluszsavat kiemelkedő antioxidáns kapacitással rendelkezik, arányait tekintve csaknem négyszer akkorával, mint a ferulasav (Soobrattee és mtsai., 2005). A DPPH gyök megkötéssel kapcsolatban is erősebb antioxidánsnak bizonyult, mint a vanilinsav, ferulasav, parakumársav, vagy a kávéssav (Villano és mtsai., 2005). Ennek oka valószínűleg, hogy a galluszsav 3 hidroxilcsoportot tartalmaz (**55. ábra**). A hidroxilcsoport számának növekedése egyértelmű antioxidáns kapacitásbeli növekedést jelent (Villano és mtsai., 2005). Ez lehet többek közt az egyik olyan komponens, amely jelentősen kihathat az antioxidáns kapacitás során kapott értékekre, és azok a gyümölcsök, amelyek inkább galluszsavban gazdagabbak, mint a fent említett fenolossavakban (málnák, piros ribizskék), talán ezen mérési módszerekkel ezért is bizonyulnak hatásosabb antioxidánsnak.

A parakumársav-tartalom illetve az ACW, ACL, TEAC és DPPH értékek között szignifikáns összefüggést kaptam, de a DPPH gyök és az ABTS gyök megkötésén alapuló módszernél standardként nem mutat aktivitást (Villano és mtsai., 2005). Bár egy komponens aktivitása egy antioxidáns kapacitás rendszerben nem tükrözi ugyanazon komponens például gyümölcsmintában való viselkedését, de adott körülmények közötti reakciókészségére vonatkozólag fontos információval szolgálhat.

Egyes antioxidáns rendszerekben a vanilinsav antioxidáns kapacitása nem mérhető. A DPPH, ABTS gyök befogásán alapuló mérőrendszerben nem mutatott aktivitást (Villano és mtsai., 2005; Zhou és mtsai., 2006), de ORAC módszerrel mérve hatásosabbnak bizonyult az utóbb említett módszerekkel nagy értékeket adó galluszsavnál is, pedig csak egy hidroxilcsoportja van (Villano és mtsai., 2005). Ez a jelenség esetleg összefüggésbe hozható azzal a ténnyel, hogy a vanilinsavnak az aromás gyűrűjén a ferulasavhoz hasonlóan a 4-es helyzetű OH csoportja mellett (**56. ábra**), egy metoxicsoport is található, ugyanis a hasonló felépítésű aromás gyűrűvel rendelkező ferulasav esetében is hasonlóan rossz korrelációt kaptam (**19. táblázat**). A piros ribizskék tartalmazták a legtöbb vanilinsavat (**46. ábra**), de a kapott korrelációk egyik módszerrel sem szorosak.



56. ábra. A ferulasav és a vanilinsav szerkezete közti különbség

A kis mennyiségben előforduló sziringinsav az ACL eredményekkel mutat szoros összefüggést, a többi módszerrel kapcsolatban a korrelációs koeficiensek értékei $r=0,675$ alattiak. Más módszerrel, mint az általam alkalmazott PCL (szintén a szuperoxid anion megkötésen alapuló rendszer), az antioxidáns kapacitása kétszer akkora, mint a ferulasavnak és tízszer nagyobb a vanilinsavnál is. A DPPH gyökkel szemben is hatásosabbnak bizonyult a fenolossavaknál (Zhou és mtsai., 2006), amit alátámaszt a savakkal mutatott szorosabb korreláció.

Az ellágsav jelentős antioxidánsnak bizonyult FRAP rendszerben (Soobrattee és mtsai., 2005), illetve TPC módszerben is (Peterson és Dwyer, 1998). Ennek ellenére az általam kapott eredmények közötti korreláció nem szoros, fordított arányosság figyelhető meg a FRAP, TPC, DPPH, ACL módszerrel. Ez a már említett okoknak köszönhető, miszerint a szamócák többször annyi ellágsavat tartalmaznak a többi fajhoz képest, így értékeik felülmúlják a fekete ribiszkékét is, amelyekről általánosságban elmondható, hogy minden téren a legkedvezőbb eredményeket adták.

A következőkben kerülnek bemutatásra azok a flavonoidok, amelyek mennyiségi meghatározására nem volt lehetőségem, kizárólagosan minőségi azonosításig terjedt a kutatásom.

5.2.3.2. Az antioxidáns kapacitás kialakításában szerepet játszó flavonoid vegyületek minőségi meghatározása

Az irodalmi bevezetőből kiderült, hogy fontos kutatási téma a flavonoidok azonosítása, a különbségek, összefüggések kimutatása, a genetikai háttérben rejlő különbségekre való rávilágítás. A flavonoidmintázat kialakulásáért komplett enzimszisztéma felelős, és azonos fajon belül is nagy eltérések figyelhetők meg (Reynertson és mtsai., 2008). A kutatásokban a flavonoidokat mint taxonómiai markereket alkalmazzák egyes fajták jellemzésével kapcsolatban

(Prior, 2003; Pantelidis és mtsai., 2007). A flavonoidok mennyiségét markerként azonban nem célszerű alkalmazni, hiszen a külső környezeti tényezők azok mennyiségét nagymértékben befolyásolni képesek (érettség mértéke, csapadék mennyisége stb.) (Crozier és mtsai., 1997).

Számos analitikai módszer csak az aglikonok meghatározására fókuszál, mivel ez egyszerűbb és olcsóbb megoldás. Ezek a mérések ún. célkomponens, vagy "target" módszerek, vagyis a kiválasztott célkomponenseket, az aglikonokat detektálják. Munkám során ún. non-target módszert alkalmaztam, amely az alábbi *flavonoid aglikonok származékainak* (mono- és diglikozidok) kimutatására is képes: apigenin, miricetin, kempferol, kvercetin, luteolin, fizetin, naringenin, heszperetin, daidzein, genisztein. Ezen módszerrel egy finomabb képet kaphatunk a flavonoid profilról, ami sokkal több információt nyújt, mint kizárólagosan az aglikonok mennyiségének meghatározása, hiszen az egyes komponensek felvehetősége, hozzáférhetősége jelentősen eltérhet, amit elsősorban az aglikonhoz kapcsolódó szubsztituens határoz meg (Robards és Antolovich, 1997; Downey és mtsai., 2003).

A flavonoid glikozidok azonosítása igen összetett analitikai feladat az aglikonhoz kapcsolódó komponens sokfélesége miatt, például csak a kvercetinnek több, mint 179 glikozidja ismert (McDonald és mtsai., 1998; Vuorinen és mtsai., 2000; Aherne és O'Brien, 2002).

A célom ezzel az analízissel az volt, hogy jellemezzem a 13 bogyós gyümölcsű fajtát a flavonoidglikozid profiljuk alapján. Az alkalmazott módszerrel fel lehet állítani a bogyós gyümölcsök flavonoid térképét, illetve szisztematikusan meghatározható egyes komponensek „jelenléte”, illetve „hiánya” a gyümölcsben. Ezen eredmények szükségesek a statisztikai vizsgálatokhoz, amelyek segítségével az egyes összefüggések, különbségek kimutathatók. A **20. táblázat**ban a 3 lépés során megerősített komponensek felsorolása látható gyümölcsfajonként és fajtánként összefoglalva.

Az alkalmazott technikával csak az olyan szintű minőségi meghatározásra van mód, hogy az aglikont és a hozzá kapcsolódó tömeg alapján a feltételezett cukor komponens besoroljuk egy gyűjtőfogalom alá, miszerint a meghatározott komponens például egy kvercetin+hexóz. Ennél pontosabb szerkezeti meghatározásra nincsen lehetőség (milyen hexóz) az alkalmazott feltételek mellett, ez további vizsgálatokat, méréseket és módszerfejlesztést igényelne. A **20. táblázat** alapján látható, hogy nem csak a glikozidok minősége, hanem a számuk is eltérő a különböző gyümölcsökben. Ezek a különbségek egyrészt adódhatnak a koncentráció okozta eltérésből (kimutatási határ alatt van), valamint a genetikai háttérből is. Általánosságban megállapítható, hogy a kvercetin mindegyik gyümölcsben kimutatható volt, azonban a megerősített komponensek száma és minősége itt is eltér a fajok és fajták között.

20. táblázat. A gyümölcsminták azonosított és megerősített flavonoid glikozidjai (db)

Szamócák	Elsanta	Honeoye	Onebor
Apigenin+hexóz	1	1	1
Apigenin+hexóz+deoxihexóz	1	1	1
Kempferol+hexóz	2	1	2
Kvercetin+hexóz	1	-	1
Kvercetin+deoxihexóz	-	-	1
Kvercetin+HA*	1	1	1

Málnák	Malling Exploit	Fertődi Zamatos	Glen Ample
Naringenin+hexóz	-	1	-
Kvercetin+hexóz	1	-	1
Kvercetin+HA*	1	1	1
Kvercetin+hexóz+deoxihexóz	1	2	1
Kvercetin aglikon	1	1	1

Piros ribiszkék	Rondom	Detvan	Johnkeer van Tets
Kvercetin+hexóz	2	2	1
Kvercetin+hexóz+deoxihexóz	1	1	1
Kvercetin aglikon	1	1	1

Fekete ribiszkék	Fertődi1	Fertődi11	Titánia	Otelo
Kempferol+hexóz	1	1	-	-
Kvercetin+hexóz	2	2	2	1
Kvercetin+hexóz+deoxihexóz	1	1	1	1
Kvercetin aglikon	1	1	1	1
Luteolin+hexóz	1	1	-	1
Miricetin+hexóz	1	1	1	1
Miricetin+hexóz+deoxihexóz	1	1	1	1
Miricetin aglikon	1	1	1	1
Naringenin+hexóz+HA*	-	-	1	-

HA*:egy hexóz karbonsav származéka, valószínűleg glükoronsav

A szamócánál (20. táblázat) a finn kutatók méréseivel összhangban kempferol-glikozidokat is ki tudtam mutatni (Hakkinen és mtsai., 1999b; Hakkinen és Torronen, 2000) a kvercetin- és az apigenin-glikozidok mellett, így ezen gyümölcsök tartalmazzák a legváltozatosabb flavonoidmintázatot a fekete ribiszkék után. Egyes vizsgálatok alapján a szamócákból kis mennyiségű miricetint is ki tudtak mutatni (Hakkinen és Torronen, 2000). A megerősített komponensek száma az 'Onebor'-ban a legnagyobb, 7, míg a 'Honeoye'-nál csak 4.

Érdekes, hogy apigenint sikerült kimutatni és megerősíteni a mérés során mindhárom fajtában, hiszen tudomásom szerint apigenint még nem írtak le szamócában. Ennek a detektálásnak, illetve megerősítésnek a lépéseit a későbbiekben részletesen tárgyalom.

A vizsgált málnákra elsősorban a kvercetin-származékok jellemzők, illetve a 'Fertődi Zamatos' fajtánál egy naringenin+ hexózt is sikerült megerősíteni. Mullen és munkatársai

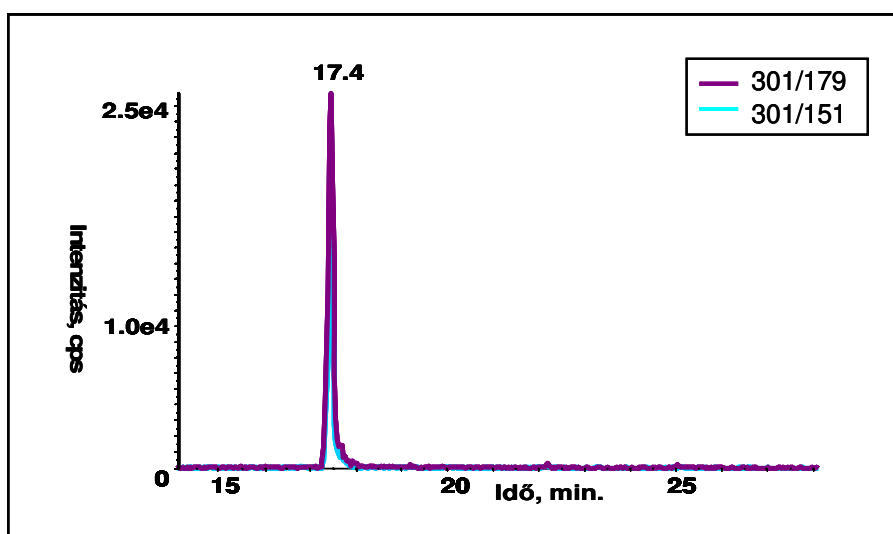
vizsgálatai alapján (2002) a málnákra különösen a kvercetin-3-rutinozid, és a kvercetin-3-glükózid a jellemző. Hakkinen megfigyelései alapján (1999a) a málnákban kevesebb és kisebb mennyiségű flavonoidot lehet detektálni, mint a többi bogyós gyümölcsben.

A vizsgálataimban a piros ribiszkék voltak a legszegényebbek e tekintetben. Kizárólag kvercetin-glikozidokat tudtam detektálni. A mérés során kapott kromatogramjaik megegyeztek, a 'Jonkheer van Tets' fajtánál azonban koncentrációbeli okok miatt az egyik kvercetin-hexózt nem tudtam megerősíteni lásd. később részletezve.

A fekete ribiszkék esetében a fajták között jelentős különbségek figyelhetők meg, hiszen kempferol-, luteolin-, és naringenin-glikozidokat is meg lehetett erősíteni egy-két fajtában. A legváltozatosabb flavonoidmintázatot ezen gyümölcsök esetén kaptam. A 'Fertődi 1' és a 'Fertődi 11' között a meghatározott komponenseket tekintve nem volt különbség, míg a 'Titánia'-nál naringenin-glikozidot is ki tudtam mutatni, viszont se a kempferol- se a luteolin-glikozidot nem tudtam megerősíteni. Az Oteleo kempferol- és naringenin-glikozidot nem tartalmaz kimutatható mennyiségben. Finn kutatók vizsgálatai során a fekete ribiszkékből miricetin+hexóz+deoxihexózt és miricetin+hexózt is detektálni tudtak hasonló technika alkalmazásával (Hakkinen és mtsai., 1999a).

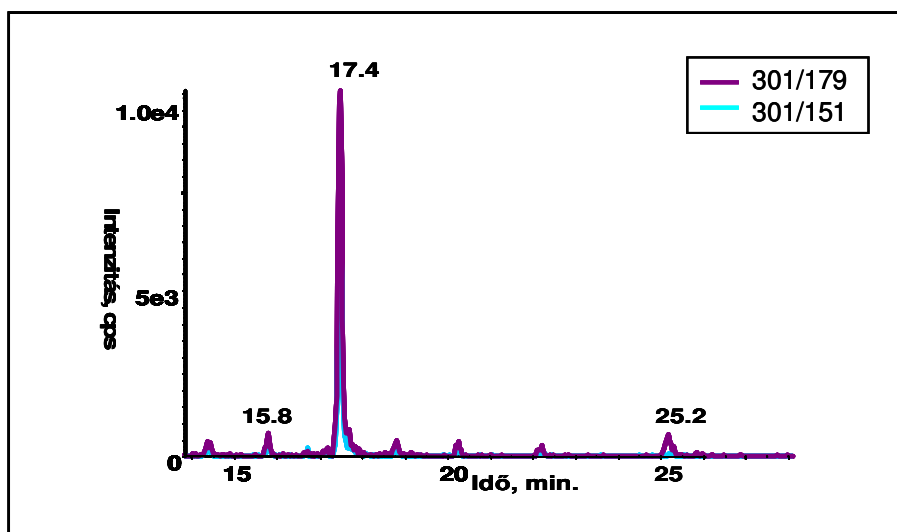
A következőkben a megerősítéseknek a menetére, illetve néhány kromatogram erejéig a fajok és a fajták közötti különbségek bemutatására kerül sor.

A irodalom alapján a flavonolokon belül a kvercetin a felelős a bogyós gyümölcsök kedvező hatásáért döntő mértékben (Hubbard és mtsai., 2003). Amint az az előző táblázatból kiderült (**21. táblázat**) mindegyik gyümölcsnél sikerült detektálni és megerősíteni kvercetin glikozidokat. Az **57. ábrán** a legjellegzetesebb kvercetinátmenetek (301/151, 301/179) alapján történő azonosítás látható a 'Honeoye' szamóca esetében, a módszer első lépése segítségével.



57. ábra. A 'Honeoye' szamócafajta kvercetin MRM kromatogramja

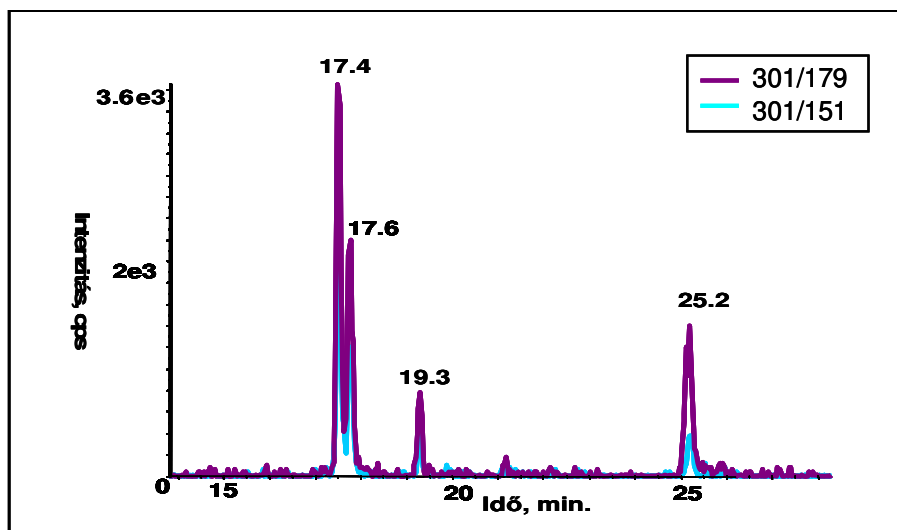
Az egyes gyümölcsök MRM kromatogramja igen eltérő a fajokat tekintve. Míg a szamóciónál egy nagy kvercetin csúcs figyelhető meg, addig a málnánál az a jellemző (58. ábra), hogy csak egy jelentős- és mellette sok apró csúcs van.



58. ábra. A 'Fertődi Zamos' málnafajta kvercetin MRM kromatogramja

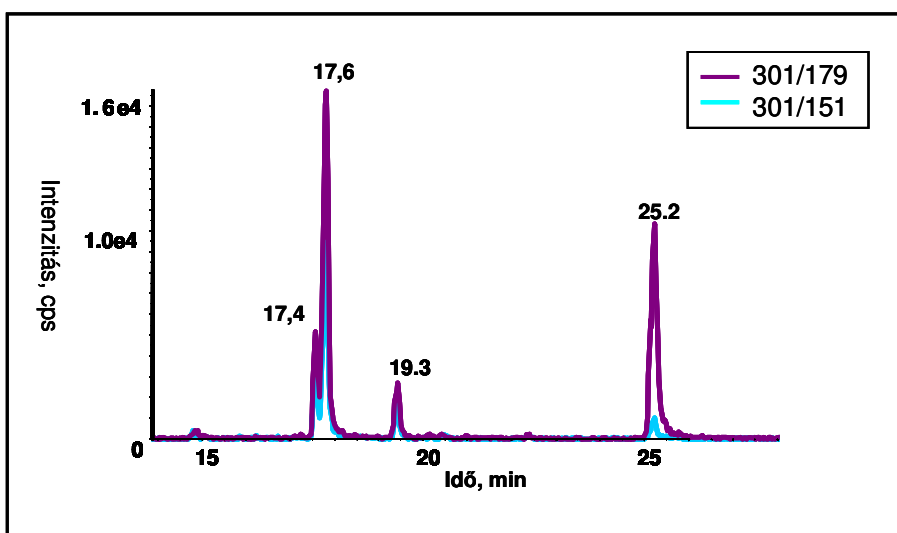
A kis csúcsok többségét ezzel a technikával nem sikerült azonosítani. Ez egyrészt köszönhető annak, hogy az intenzitásuk nem elég nagy (500 cps alatti), másrészt ez a módszer csak a lehetséges (mono- és di-) glikozidokra fókuszált. Ez alatt azt kell érteni, hogy például egy acilezett kvercetin származékot nem tudunk azonosítani, mert nem arra lett kifejlesztve a módszer. A csúcs az MRM kromatogramon megjelenik, de a következő lépésben maga a komponens nem lesz megerősítve, ha nem olyan m/z értéket kapunk, mint amelyet egy kvercetin+ valamilyen hozzákapcsolódott mono- és diglikozid esetén kapnánk (Rak és mtsai., 2010). Ez a látványos különbség a többi gyümölcsfajhoz képest igen jelentős, és valószínűleg genetikailag determinált, valamint a többi gyümölcshez képest eltérő anyagcsereutakra utalhat.

A piros ribiszkék (59. ábra) és a fekete ribiszkék (60. ábra) közti különbség kisebb mértékű. A kromatogramokon 25,2 percnél eluálódó csúcs a kvercetin-aglikon, amely a szamóciát kivéve (57. ábra), mindegyik gyümölcsben megtalálható volt. Ennek retenciós ideje standardként való futtatása során igazolódott.



59. ábra. A 'Rondom' piros ribiszke kvercetin MRM kromatogramja

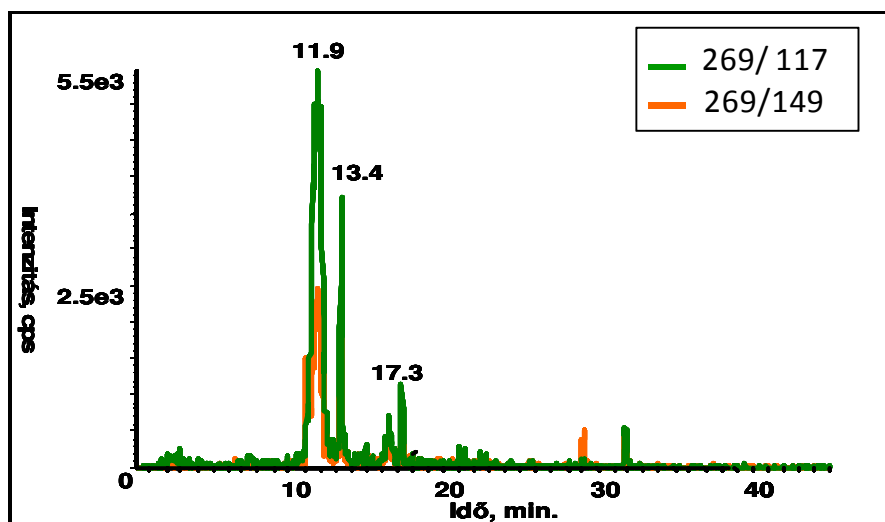
Bár mennyiségi meghatározásra nem volt lehetőségem, de érdekes, hogy a vizsgált gyümölcsökben miként alakulnak az egyes aglikonoknak az arányai is, a többi glikozidhoz képest. Amint az a fentiekből kiderült a szamóácánál nincs detektálható mennyiségű kvercetin aglikon (**57. ábra**), a málnánál az aglikon kis intenzitású csúcsot (**58. ábra**) ad, kis koncentrációban van jelen, míg a ribizskénél döntő mennyiségű aglikont is ki lehet mutatni (**59.,60. ábra**).



60. ábra. A 'Fertődi 11' fekete ribiszke kvercetin MRM kromatogramja

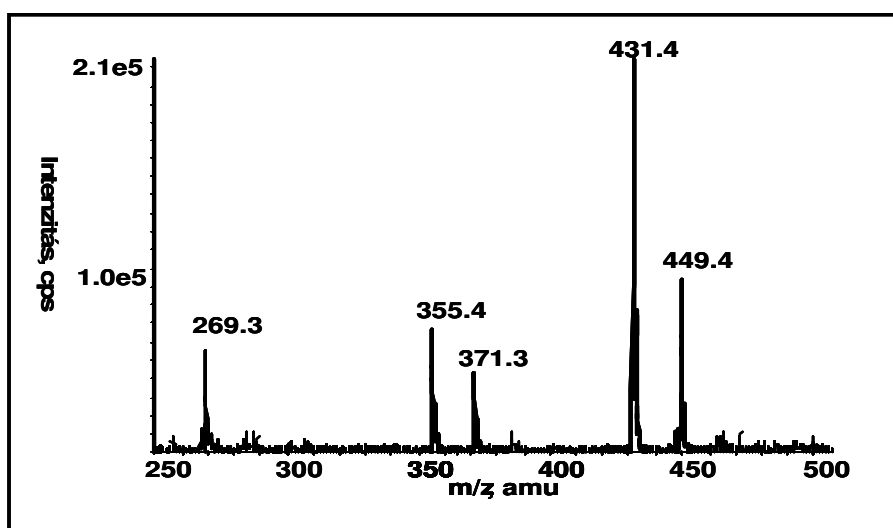
A már említettek alapján, csak a szamóácánál lehetett apigenin származékot is kimutatni (**20. táblázat**). Az apigenin nem jellemző a bogyós gyümölcsökre, sokkal inkább megtalálható gyógynövényekben, gabonafélékben, a mézben, illetve néhány zöldségfélében, mint például a petrezselyemben (Karakaya és El, 1999; Murota és Terao, 2003).

Az apigenin detektálása, azonosítása a következőkben kerül bemutatásra. A **61. ábrán** az apigenin aglikon két jellegzetes átmenetének (269/117, 269/149) MRM kromatogramja látható az Onebor fajta esetében. Az első jelentősebb csúcs 11,9 percnél eluálódott, majd ezt követte a 13,4. percnél érkező komponens csúcsa. A 17,3 perc és az azt megelőző komponensek esetén koelúció lépett fel, és nem volt elég intenzív a kapott jel, hogy a további lépésekben valamilyen komponens megerősíthető legyen. Az utolsó kettő, retenciós idővel nem jelölt csúcsok nem apigenin csúcsok, mert kizárólagosan csak az egyik átmenet jellemző rájuk.



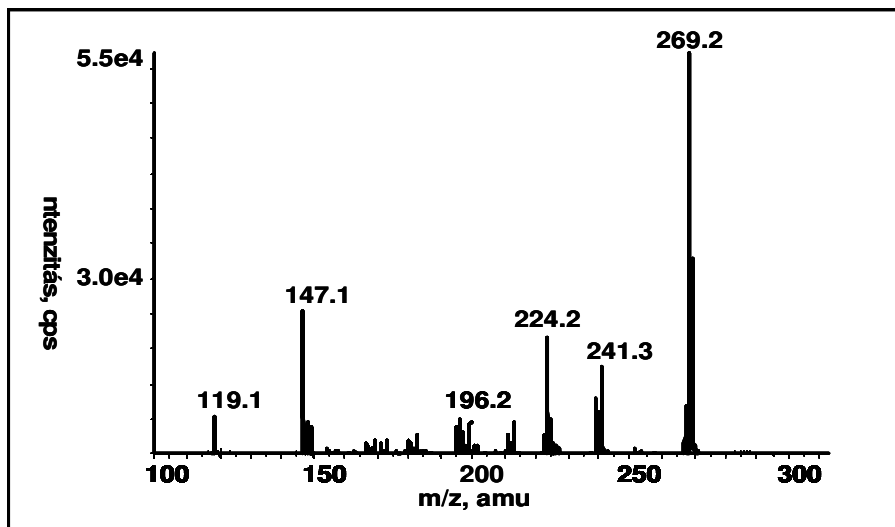
61. ábra. Az 'Onebor' számacafajta apigenin MRM kromatogramja

A mérés második lépését (total scan mód) alkalmazva a 11,9 percnél eluálódó csúcs tömegspektrumában (**62. ábra**) $m/z = 431$ tömegszámot lehetett találni, ami az adott csúcsban a legnagyobb intenzitást adó tömegszám. Ez a tömeg az alkalmazott logika alapján egy apigenin+hexóznak felel meg.



62. ábra. A 11,9 percnél eluálódó csúcs tömegspektruma

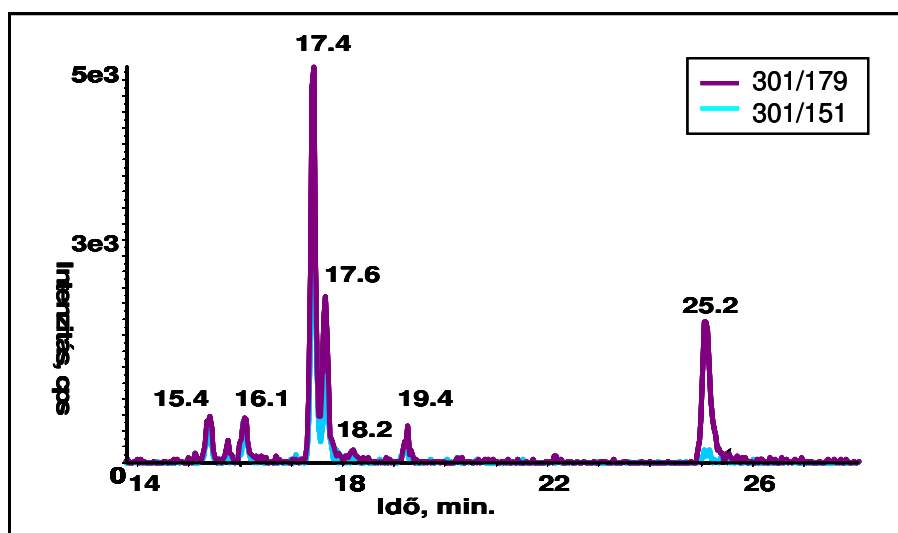
A feltételezést a harmadik lépésben, az EPI módban (**63. ábra**) lehetett megerősíteni. Itt tulajdonképpen azt kell vizsgálni, hogy az adott, jelen esetben 431-es tömegszám vajon hogyan keletkezett. Lehetséges eset az is, hogy az eluálódó csúcs alatt pont egy olyan tömegszámú ismeretlen komponens van, mint a jelen esetben a várt komponens tömege, egy apigenin+hexózé ($m/z=431$).



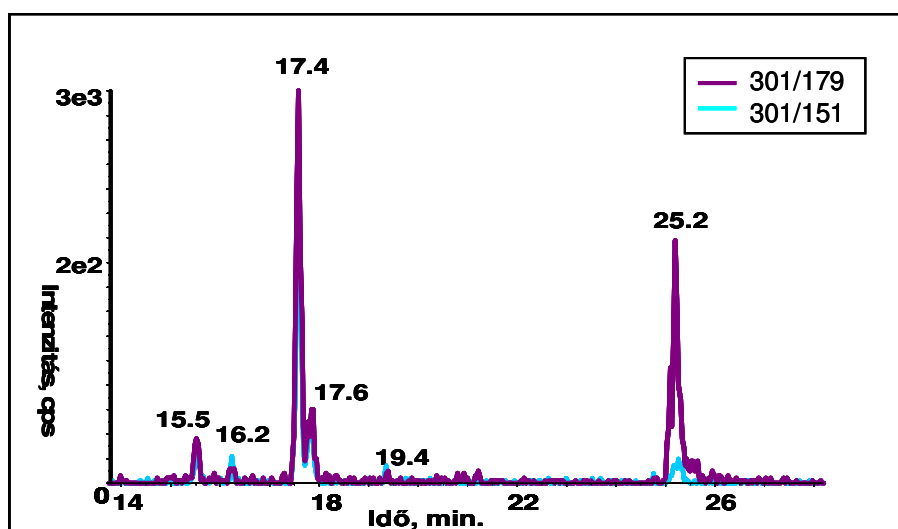
63. ábra. A harmadik, megerősítő lépés az apigenin glikoziddal kapcsolatban

Ennek kiderítésére szolgál a harmadik lépés, miszerint, ha az EPI módban a 269-s tömegszámot (apigenin) megtaláljuk és a standardok alapján ismert fragmentációs (robbantási) képet kapunk, akkor az nagy valószínűséggel, valóban apigenin-származék. Megegyező algoritmus alapján lehetett azonosítani a 13,4 percnél található komponenst, $m/z=577$, ami megfeleltethető egy apigenin+hexóz+deoxihexóznak.

A piros ribizskéknél kaptam a legszegényebb kromatogramokat, hiszen kizárólag a kvercetin glikozidokat lehetett azonosítani mindhárom fajta esetében (**20. táblázat**). A detektált komponensek megegyeztek a vizsgált fajták esetében, ennek ellenére a táblázatban szereplő (21. táblázat) különböző számok a csúcsok intenzitásával, vagyis a koncentrációval vannak összefüggésben. A csúcsok intenzitása a 'Detvan' (**64. ábra**) és a 'Rondom' fajta esetében nagyobb volt, ezért a kifejlesztett módszer több származékot volt képes megerősíteni, mint a 'Jonkheer van Tets' esetében (**65. ábra**).

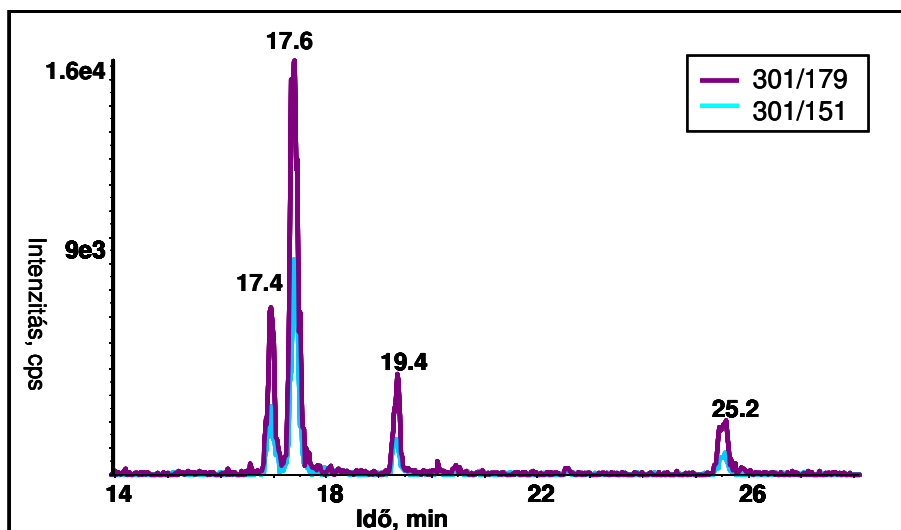


64. ábra. A Detvan piros ribiszke kvercetin MRM kromatogramja

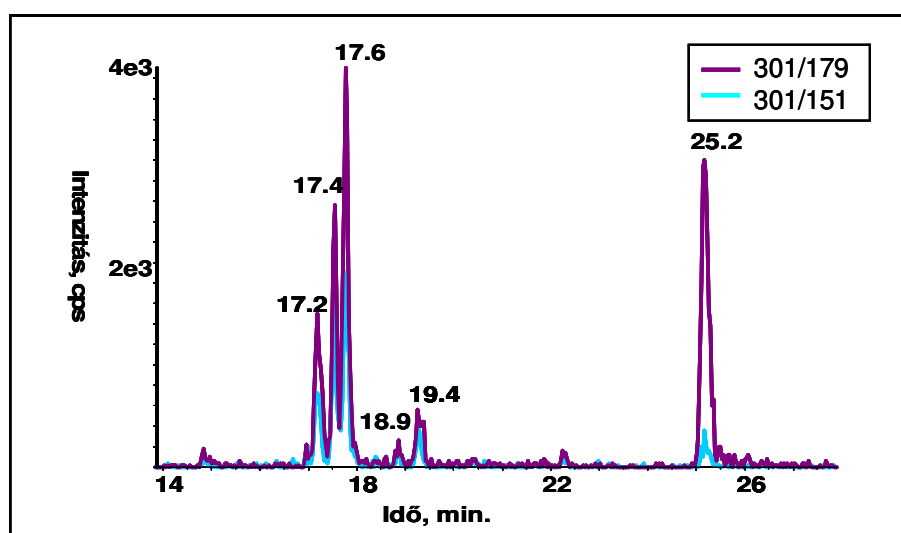


65. ábra. A 'Jonkheer van Tets' piros ribiszke kvercetin MRM kromatogramja

A flavonoid glikozidokat tekintve a fekete ribiszkék a legváltozatosabbak, ezen belül is a 'Fertődi 11' és a 'Fertődi 1' fajta kiemelkedő, hiszen a legtöbb és legkülönbözőbb glikozidokat sikerült kimutatni és azonosítani bennük. Míg a piros ribiszkéknél a kromatogramok hasonlóak voltak, koncentrációbeli különbségek miatt nem sikerült minden komponenst mindegyik fajtánál megerősíteni, addig a fekete ribiszkéknél a kromatogramok között, és így a megerősített glikozidok közötti eltérést valószínűleg a genetikai háttér okozza. A különbségek a 'Fertődi 1' (66. ábra) és a 'Titánia' fajtán (67. ábra) kerülnek bemutatásra.



66. ábra. A 'Fertődi 1' fekete ribiszke kvercetin MRM kromatogramja



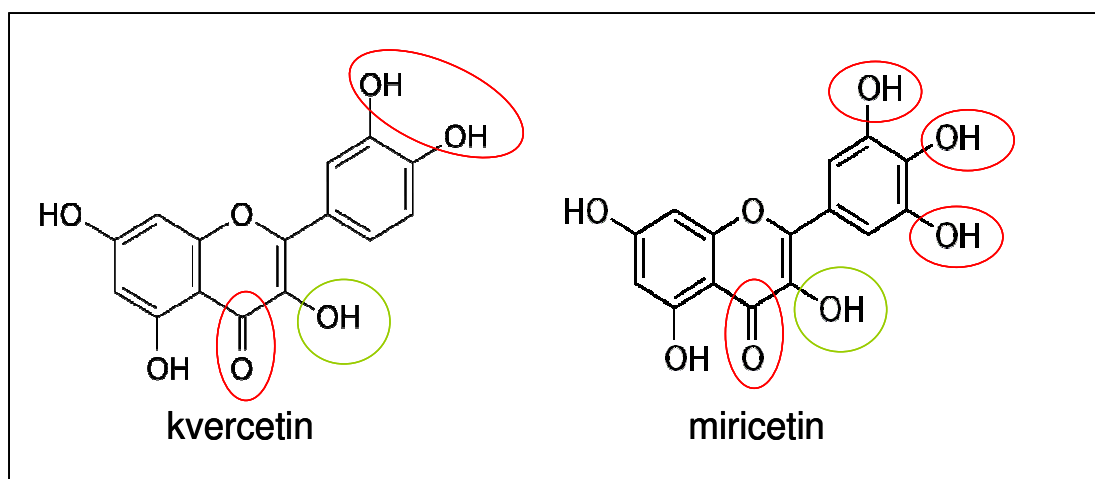
67. ábra. A 'Titánia' fekete ribiszke kvercetin MRM kromatogramja

A kvercetin aglikon mindkét esetben 25,2 percnél eluálódik, megegyező módon. Ezen túlmenően a 'Fertődi 1' fajtánál csak további három, a 17,2, 17,4 illetve a 19,4 percnél eluálódó, míg a 'Titánia' esetében további négy jól elkülönült csúcs látható (17,2, 17,4 és 17,6 valamint 19,4 percnél), ami plusz egy komponenst (kvercetin+hexóz) jelent.

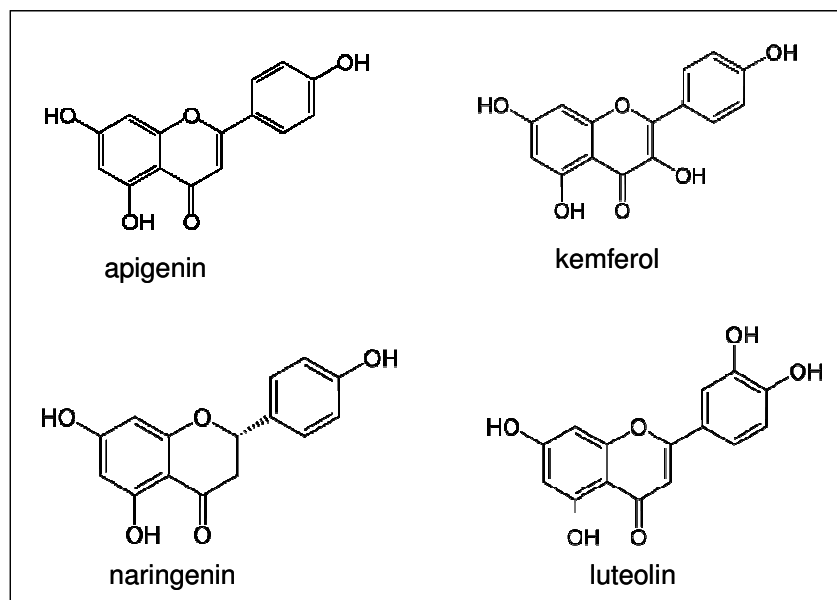
A fizetint daidzeint, heszperetint, illetve származékaikat egyik vizsgált gyümölcsfajban sem lehetett kimutatni.

Bár mennyiségi meghatározást nem tudtam kivitelezni, fontosnak tartom kihangsúlyozni ezen flavonoidok szerepét is, az antioxidáns kapacitás értékek kialakításában néhány mondat erejéig. Ezek is szerepet játszanak például abban, hogy a fekete ribiszkénél miért kaptam a legnagyobb antioxidáns kapacitás értékeket.

Számos irodalmi munka utal arra, hogy a kvercetinnek többféle rendszerrel tesztelve (TEAC, DPPH, FRAP) kiemelkedő antioxidáns kapacitása, illetve gyökfogóképessége van, csakúgy, mint a miricetinnek. Többszöröse az apigeninnek, kempferolnak, luteolinnak, naringeninnek (Soobrattee és mtsai., 2005; Tsimogiannis és Oreopoulou, 2006; Hidalgo és mtsai., 2010). Például a TEAC módszernél a kvercetin kétszer erősebb antioxidáns, mint a kempferol, a rutin, az aszkorbinsav, az ellágsav, de például a miricetin-3-rhamnozidnál háromszor kisebb antioxidáns kapacitással bír (Tabart és mtsai., 2009). A FRAP módszernél, a kvercetin kétszer akkor antioxidáns kapacitást mutat, mint a kempferol, de a miricetin hasonló értékeket ad. Mindezek szerkezeti különbségekből adódnak (**68., 69. ábra**), amíg a miricetinnek 3, a kvercetinnek 2 OH csoportja van a B gyűrűn (**68. ábra**), addig a kempferolnak, apigeninnek, naringeninnek (**69. ábra**) csupán egy (Hidalgo és mtsai., 2010). Itt kell megemlíteni azt is, hogy általánosságban a szabadgyökök megkötésében a C gyűrű 4-es pozíciójában lévő ketocsoport, a 3-as pozícióban a hidroxicsoport, valamint a 2,3 kettőskötés is fontos szerepet játszik (**68. ábra**) (Tsimogiannis és Oreopoulou, 2006).



68. ábra. A kvercetin és a miricetin szerkezetének szerepe az antioxidáns hatásukban (Apak és mtsai., 2007)



69. ábra. Az antioxidáns kapacitás tesztekben kisebb kapacitást mutató aglikonok szerkezete

A tesztek során az is kiderült, hogy az aglikonok másként viselkednek, mint glikozidjaik. Általánosságban nem adható válasz, hogy kisebb, vagy nagyobb aktivitást mutatnak, mert ez nemcsak magától az aglikontól, illetve a hozzákapcsolódó szubsztituentstől függ, hanem a használt tesztől is (Tsimogiannis és Oreopoulou, 2006). A kvercetin például az összpolicenol vizsgálatban közel fele akkora antioxidáns kapacitás értéket mutat, mint egyik gyakori glikozidja a rutin, a TEAC módszernél azonban ez éppen fordítva alakul.

A fekete ribiszkékben kvercetin és miricetin származékokat is detektálni tudtam, ami önmagában még nem magyarázza, hogy antioxidáns kapacitásuk miért olyan kiemelkedő a vizsgált gyümölcsök között, de minden bizonnyal döntő szerepet játszanak a kedvező értékek kialakításakor. Ezek mellett fontos azonban azt is szem előtt tartani, hogy a C-vitaminhoz képest (100 mg alatt 100%-ig felvehető a szervezet számára), gyenge a felszívódásuk, a kvercetinnek, illetve a glikozidjainak 20-50%, míg például a katechinnek 2% alatti (Benzie, 2003). Ezek az adatok rávilágítanak arra is, hogy az emberi szervezetben betöltött antioxidáns szerepüket ez is döntően meghatározza.

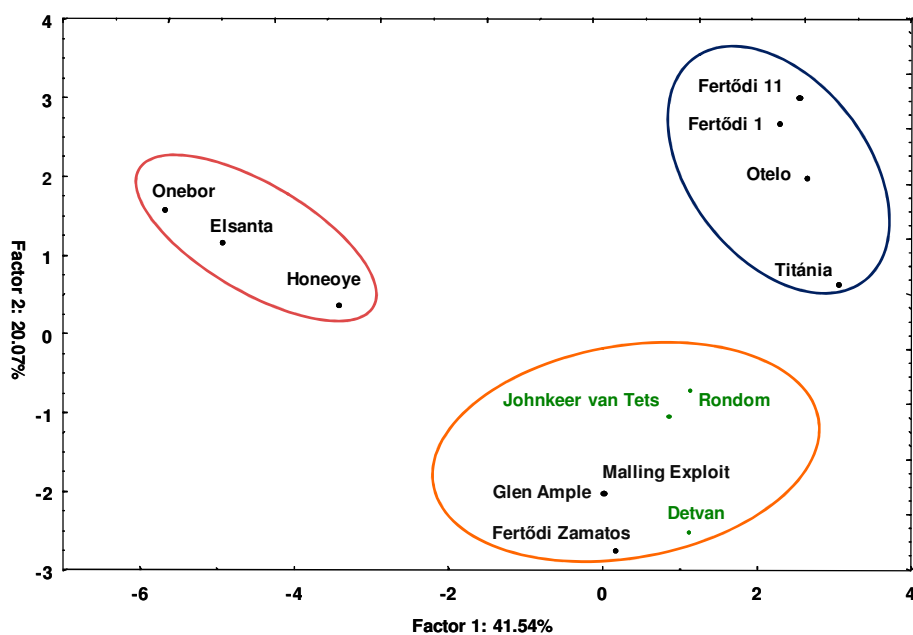
A **21. táblázat** az összes azonosított és megerősített komponenst tartalmazza. Ezt az adattáblát használtam fel a statisztikai elemzéshez. A bal oldalon az oszlopok jelzik a komponensek kódjait. Az első betűk az aglikonok rövidítései (a:apigenin, k:kempferol, m:miricetin, n:naringenin, q:kvercetin) az utánuk álló szám az adott komponensek retenciós idejét jelölik. Ezek együttesen változóként lettek definiálva. A mérés során egyes esetekben koelúció lépett fel. A 15. percnél csak egy csúcs jelent meg a kromatogramon, mégis két lehetséges komponenst kell figyelembe venni. Az egyik $m/z=479$ (miricetin+hexóz), míg a másik $m/z=625$ (miricetin+hexóz+deoxihexóz). Ez a jelenség lépett fel a 17,4 percnél is,

$m/z=477$ (kvercetin+egy hexóz karboxilsav származéka, bizonyára glükuronsav) és $m/z=609$ (kvercetin+hexóz+deoxihexóz) tömegek is lehetségesek.

21. táblázat. Megerősített, illetve nem megerősített komponensek a vizsgált bogyós gyümölcs fajták esetében

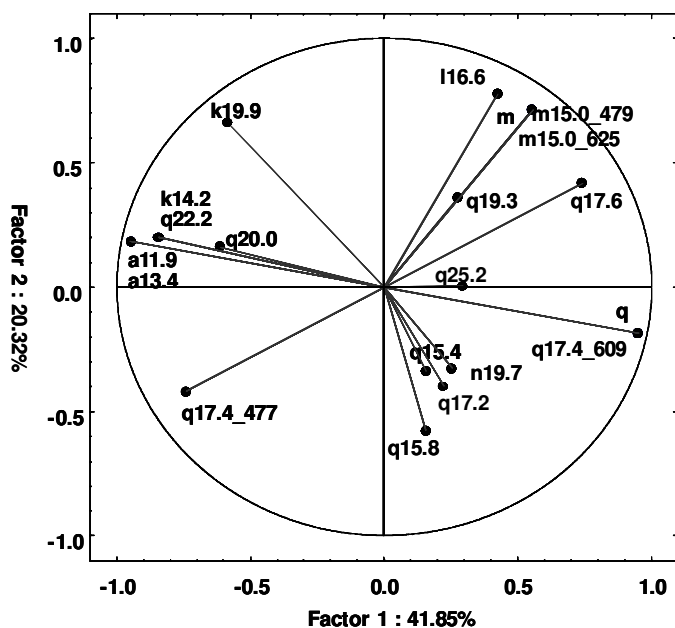
Flavonoid kódok	A fajok és fajták összehasonlítása												
	Szamócák			Piros ribiszkék			Málnák			Fekete ribiszkék			
	Onebor	Honeoye	Elsanta	Detvan	Rondom	Johnkeervan Tets	Glen Ample	Malling Expolit	Fertődi zamatos	Otelo	Fertődi 11	Titania	Fertődi 1
a11.9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a13.4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
k14.2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
k19.9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
l16.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
m15.0_479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
m15.0_625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
m_20.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
n19.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
q15.4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q15.8	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
q17.2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
q17.4_477	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
q17.4_609	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
q17.6	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
q19.3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
q20.0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q22.2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
q_25.2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Mivel mennyiségi analízisre nem került sor, ezért a statisztika a minőségi különbségeken alapszik. Az egyes szám azokat a komponenseket jelöli, amelyek a mérési módszer mindhárom lépésében meg lettek erősítve, míg a nulla jelöli azokat, amelyek nem lettek megerősítve, vagy nem voltak kimutathatók. A főkomponens elemzés alapján (**70. ábra**) három fő csoportot lehetett elkülöníteni. A bal oldalon a három szamóca fajta alkot egy csoportot, míg felül jobb oldalon a négy fekete ribiszke. A harmadik vegyes csoportban, találhatók meg a piros ribiszkék és a málnák.



70. ábra. A főkomponens elemzés eredményeiként létrejött bogyós gyümölcs csoportok

A következő ábra (**71. ábra**) az egyes kódolt komponensek elhelyezkedését mutatja, ha az első két faktort ábrázoljuk egymás függvényében. Az első faktor az eredeti információt 41,85%-ban magyarázza, míg a második csak 20,32%-ban felel a csoportok kialakulásáért. Ezen az ábrán olvasható le, hogy az egyes kódolt komponensek (flavonoid+retenciós idő) milyen irányban hatnak, vagyis az adott csoportok (**70. ábra**) kialakulásához mely változók, és milyen súllyal szerepelnek.



71. ábra. A statisztikai elemzések 'loadings' értékei a gyümölcsök flavonoid profilja alapján

A bal felső negyedben található az a két vektor, amely az apigenin glikozidokra vonatkozik (a11.9 és a13.4), illetve a q20. és a q22.2 kvercetin komponensek vektorjai. Ezekhez közel

található a k14.2 vektor is, amely a 14,2 percnél eluálódó kempferol-glikozidot jelöli. Ezen komponensek kizárólag a szamóácánál voltak detektálhatók (**21. táblázat**), tehát diszkrimináló komponensek, amelyek elkülönítették a szamóacákat a többi gyümölcstől (**71. ábra**). A 19,9 percnél eluálódó kempferol-glikozidot meghatározó vektor az előzőektől már látványosan távolabb helyezkedik el, hiszen már a Fertődi 1 és Fertődi 11 fekete ribiszke fajtáknál is ki lehetett mutatni (**21. táblázat**). A jobb felső negyedben található luteolin és a miricetin vektorok játszottak döntő szerepet a fekete ribiszkék elkülönült csoportjának kialakításában. A jobb oldali alsó negyedben található kvercetin vektorok a vegyes csoport kialakításában játszanak szerepet. A piros ribiszkéknél és a málnáknál nem sikerült olyan komponenseket kimutatni, vagy megerősíteni, amelyek egyértelműen szétválasztanák, és ezáltal elkülönítenék a két fajt, ezért egy heterogén csoport alakult ki. Végül a bal alsó negyedben csak egy vektor található. A q.17.4_477-es kóddal jelölt komponens megtalálható volt mind a szamóacákban, mind a málnákban, de önmagában nem elegendő a csoportok jobb elkülönüléséhez.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a fajok és fajták közötti különbségek egyrészt a komponensek mennyiségéből adódnak, másrészt a genetikai háttér az oka, hiszen a környezeti körülmények megegyeztek. A kvercetin és a kvercetin-glikozidok a meghatározóak a vizsgált gyümölcsöket tekintve, különösen a kvercetin+hexóz és a kvercetin+hexóz+deoxihexóz. A kapott eredményeknek nemcsak táplálkozás élettani-szempontból lehet fontos szerepe, hanem lényeges információkat tartalmazhat a botanikusoknak is, hiszen segítséget nyújthat a taxonómiai osztályozás terén. Az élelmiszeripar és a növény-nemesítők számára is hasznosnak és érdekesnek bizonyulhat e kérdéskör, nagy flavonoid tartalmú, esetleg célzott flavonoid komponenseket tartalmazó növények termesztését és erre alapozott termékek előállítását illetően.

A bogyós gyümölcsök a gyümölcsök között elsők között állnak nagy antioxidáns kapacitásuknak köszönhetően, amelynek kialakításában elsődlegesen, a polifenolos komponenseknek van meghatározó szerepe (Benvenuti és mtsai., 2004; Hegedűs és mtsai., 2008; Garzon és mtsai., 2009). A különböző bioaktív komponenseik minőségéért és ezek arányáért elsődlegesen a genotípus felelős (Anttonen és Karjalainen, 2005; Capocasa és mtsai., 2008; Hegedűs és mtsai., 2008). A különbségek kihasználásával - kedvezőbb beltartalmi paraméterekkel rendelkező fajtákból kiindulva, egészségesebb termékeket lehet előállítani, ezzel hozzájárulva a természetes antioxidánsokban gazdag, több vitaminnal rendelkező, vagy akár a mesterséges színezék nélküli termékek piacához. Ezen hasznos információk tudatában a gyümölcs fajták eladhatósága növelhető lehetne, illetve az élelmiszeripari feldolgozás során egészségtámogató termékek előállítását tehetné lehetővé (Meyers és mtsai., 2003; Raffo és mtsai., 2004).

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A 13 általam vizsgált bogyós gyümölcs antioxidáns kapacitásával kapcsolatban, valamint az antioxidáns kapacitást jellemző, alkalmazott mérések közötti összefüggésekkel kapcsolatban elsőként állapítottam meg, hogy:

A fekete ribiszkének van a legnagyobb hidroxilgyök, szuperoxid anion, DPPH, ABTS gyökfogó kapacitása. Ugyanazon faj fajtái között azonban nincs olyan szignifikáns különbség, amelyet az alkalmazott módszerek mindegyike képes lenne kimutatni.

Szignifikáns összefüggés van a szuperoxid anion megkötésén alapuló víz- és zsírolható antioxidáns kapacitás értékek és az összes gyökfogó kapacitás, a vasredukáló képesség, a troloxra vonatkoztatott, valamint a DPPH gyök megkötésén alapuló antioxidáns kapacitás értékek között.

2. A bogyósgyümölcsök flavonoid mintázatával kapcsolatban

Elsőként térképeztem fel a Magyarországon termesztett 4 bogyósgyümölcsű faj és ezek 13 fajtájának (szamóca: 'Elsanta', 'Honeoye', 'Onebor', málna: 'Malling Exploit', 'Fertődi Zamos', 'Glen Ample', piros ribiszke: 'Rondom', 'Detvan', 'Jonkheer van Tets', fekete ribiszke: 'Fertődi 1', 'Fertődi 11', 'Titánia', 'Oteló') flavonoid-származékait.

Megállapítottam, hogy az általam vizsgált bogyós gyümölcsök esetében sokkal nagyobb különbség van az egyes fajok flavonoid-összetétele és mennyisége között, mint a fajon belül, a fajták között. A szamócaéknál apigenin, kvercetin, és kempferol, a málnák esetében kvercetin- és naringenin-származékokat tudtam azonosítani. A piros ribiszkénél kizárólag kvercetin-, a fekete ribiszkék esetében kempferol-, kvercetin-, luteolin-, miricetin- és naringenin-származékokat lehetett azonosítani.

HPLC-MS/MS csatolt rendszer segítségével elsőként mutattam ki az általam vizsgált szamócafajták mindegyikében ('Honeoye', 'Elsanta', 'Onebor') apigenin-glikozid jelenlétét.

3. A 13 bogyós gyümölcs esetében az általam különböző módszerekkel meghatározott antioxidáns kapacitás és a megmért antioxidáns kapacitásért felelős komponensek mennyisége közötti korreláció alapján új tudományos eredménynek tekintem a következőket:

A C-vitamin-tartalom és az alkalmazott mérések között egy esetben sincs szoros korreláció, ugyanakkor a flavonoidokon belül az antocianinok és a fenolos savakon belül a 4-hidroxi-benzoészav, a t-fahéjsav, a galluszsav, a kávéészav valamint a szinapinsav mennyisége és az alkalmazott módszerek között minden esetben szignifikáns összefüggés áll fenn.

Vizsgálataim megerősítették, hogy a fekete ribiszkék kimagasló antioxidáns kapacitásáért a galluszsav, a miricetin és miricetin-glikozidok tehetők felelőssé, mely vegyületek fajspecifikus megjelenéséért feltételezhetően a flavonoid bioszintézis út genetikai szabályozása felelős.

4. A zsírolldható antioxidáns kapacitás meghatározására kidolgozott készülék (Photochem) tesztelése a következő megállapításokhoz vezetett:

Bizonyítottam, hogy a zsírolldható antioxidáns kapacitás meghatározására használatos metanol (a készüléket gyártó cég által ajánlott oldóészer) tulajdonságaiból adódóan a mért zsírolldható antioxidáns kapacitás értékeket a vízoldható vegyületek antioxidáns kapacitása is befolyásolja, ami addíciós hibaként jelentkezik.

A gyártó által az eredmények kiértékeléséhez kidolgozott eljárás elvi megfontolásaiban eddig nem ismertetett ellentmondásokat tapasztaltam. A zsírolldható antioxidáns kapacitás mérésénél a vakhoz közeli görbék (híg minta) kiértékelése az antioxidáns kapacitás jelentős túlbecsülését eredményezi.

Kísérletekkel igazoltam, hogy a módszer nem elég robosztus, a minta hígítása jelentősen kihat a kapott eredményekre. Hígítás során nem a hígítás mértékével arányos módon változik a minta műszer által mért antioxidáns kapacitása.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az egészséges és kiegyensúlyozott táplálkozás fontos szerepet játszhat számos olyan betegség kialakulásának megelőzésében, amelyek hátterében szabadgyökös reakciók húzódnak meg. A gyümölcsök és a zöldségek összehasonlításakor a bogyós gyümölcsök a legnagyobb antioxidáns kapacitás értékkel bírnak, ami elsősorban a bennük nagy mennyiségben felhalmozódó polifenolos vegyületeknek, illetve nagy vitamin tartalmuknak köszönhető. Epidemiológiai kutatások igazolták, hogy e vegyületek közvetlenül vagy közvetetten szerepet játszanak a szabadgyökök eliminálásában is, ezzel hozzájárulva a betegségek kialakulásának megakadályozásához. Kísérleteimben ezért a hazánkban termesztett bogyós gyümölcsök közül a szamóca, a málna, a piros és a fekete ribiszke fajokat és néhány jelentősebb fajtájukat vizsgáltam. A gyümölcsök antioxidáns kapacitását különböző mérési elven alapuló módszerekkel határoztam meg (elektronátmenettel járó, hidrogénatom-átmenettel járó), megvizsgálva, hogy a gyümölcsök az eltérő reakciókörülmények között, illetve a különböző gyökökkel (hidroxilgyök, szuperoxid anion, DPPH, ABTS gyök) szemben miként viselkednek, valamint, hogy egymáshoz viszonyított sorrendjük hogyan változik meg. Fontosnak tartottam továbbá olyan komponensek vizsgálatát (C-vitamin, antocianin, a jellemzőbb fenolos savak és egyéb flavonoidok) is, amelyek az antioxidáns kapacitás értékének kialakításában szerepet játszanak.

Munkám során többek közt arra kerestem a választ, hogy a fajok és a fajták között mekkora különbségek mutathatók ki azonos termesztési körülmények (talaj, éghajlat, csapadék stb.) között, és ezt hogyan befolyásolja a mérési módszer. Méréseim kiegészültek egy kereskedelmi forgalomban is kapható, antioxidáns kapacitást mérő készülék használhatóságának tesztelésével (pontosság, érzékenység) is, hiszen erre nem állt rendelkezésre irodalmi adat.

A készülékkel kapcsolatosan a legfontosabb kiemelni, hogy a zsírolható antioxidáns kapacitás mérése több tekintetben kifogásolható. Elsődlegesen a zsírolható antioxidáns kapacitás méréséhez alkalmazandó, illetve ajánlott oldószerrel, a metanollal van probléma. Ennek használata azért problematikus, mert számos vízzoldható komponens, mint például a zöldségekben, gyümölcsökben nagy mennyiségben előforduló C-vitamin is oldódik metanolban, ezért az eredmények kialakításában szerepet játszik. Így a zsírolható antioxidáns kapacitásra mért eredmények ismeretlen mennyiségű és minőségű vízzoldható antioxidáns molekula kapacitásával is terhelték lesznek. E mellett megállapítottam, hogy a szintén vízzoldható citromsav, amely nem gyökfogó antioxidáns, vagyis a tesztkörülmények között nem szabadna reagálnia, ad értékelhető zsírolható antioxidáns kapacitást, szintén hibásan. Az eredmények kiértékelése is erősen kifogásolható. Mivel ebben a módban a görbe alatti terület a vonatkoztatási

alap, a szoftver mindig képes lesz adott idő alatti integrálásra. Ez viszont azt jelenti, hogy mindig kapunk eredményt a mintákra vonatkozólag, még ha a kapott görbe a vakhoz közeli is. Ha ez egy nagyon híg oldattól származik, akkor a hígítási faktorról korrigálva az eredményt nagy antioxidáns kapacitást fogunk kapni, ami természetesen téves érték. Emellett gondot jelenthet a kiték beszerzése, stabilitási problémák, valamint ezek függvényében a rutinszerű mintamérés. Tapasztalataim és méréseim alapján ez a készülék a gyártó állításával ellentétben rutinszerű analitikai vizsgálatokra nem alkalmas.

Méréseim alapján kiderült, hogy a Magyarországon azonos körülmények között termesztett bogyós gyümölcsök nagy antioxidáns kapacitással rendelkeznek többféle elven alapuló, és más-más szabadgyököket alkalmazó antioxidáns kapacitási módszerekkel vizsgálva.

A módszerek közötti korreláció számos esetben szignifikánsnak ($p < 0,05$) mutatkozott. A szuperoxid anion megkötésén alapuló zsír- és vízdoldható antioxidáns kapacitás értékek szoros összefüggést mutattak a hidroxil-, DPPH- ABTS- gyök megkötésén alapuló módszerekkel, valamint a vasredukálóképességgel kapcsolatos mérés során kapott eredményekkel. A TRSC (összgyökfogó képesség) és a többi teszt között negatív korreláció áll fenn, ami az eredmények eltérő kiértékeléséből adódik. Az egyes tesztekben a fajok és a fajták antioxidáns hatásának sorrendje eltér, ami annak köszönhető, hogy különböző antioxidáns és (egyéb) komponenseik mennyisége és minősége is szignifikánsan különbözik, így ezek az eltérő rendszerekben másként viselkednek. Általánosságban elmondható, hogy a fekete ribiszkék antioxidáns kapacitása szignifikánsan nagyobb, (kétszeres-nyolcszoros) az általam vizsgált többi fajénál (piros ribiszke, málna, szamóca). A többi három gyümölcs sorrendje, illetve viselkedése tesztfüggő volt, egyértelmű sorrend nem állítható fel. Ez azzal magyarázható, hogy összetételét tekintve vizsgálataim és irodalmi adatok alapján kiderült, hogy azok a komponensek, amelyek az általam alkalmazott tesztekben (**ACW, ACL, TRSC, FRAP, TPC, TEAC, DPPH**) önálló standardként nagy értékeket adnak, mind nagy mennyiségben fordulnak elő a fekete ribiszkékben. A fekete ribiszkéknél elsőként fontos kiemelni a galluszsav-tartalmat és a miricetin–glikozidok jelenlétét, valamint az összes fenolos savtartalmuk is kimagasló, emellett elsősorban a delfinidin és cianidin glikozidok jellemzőek, amelyek szintén nagy antioxidáns kapacitást mutatnak az alkalmazott tesztekben. A C-vitamin-tartalommal kapcsolatban a szamócák is kiemelkedő értékeket adtak, a fekete ribiszkék mellett, ezt követték a piros ribiszke és málna fajták. Az összzantocianin tekintetében a különbségek 2-4-szeresek voltak a fekete ribiszkék javára.

A fenolos savakat tekintve a szamócák elsősorban ellágsavban és para-kumársavban gazdagok, de a fajták közötti arányuk is jelentősen változhat. Az általam vizsgált málnákra az ellágsav mellett a ferulasav, a galluszsav és a kávéssav jellemző. A piros ribiszkék esetén kiemelhető a 4-hidroxi-benzoessav, a vanilinsav, a parakumársav és a kávéssav. A fekete

ribiszkénél a 4-hidroxi-benzoésav, a t-fahéjsav, a parakumársav, a galluszsav és a kávésav mennyisége is meghatározó. Eredményeim alátámasztják, hogy a vizsgált gyümölcsöknél a polifenolos vegyületek felelősek elsődlegesen az antioxidáns kapacitás értékéért. Az általam meghatározott összes antocianin- és összes fenolossav-tartalom, valamint számos fenolossav (galluszsav, 4-hidroxi-benzoésav, kávésav) mennyisége szorosabb korrelációt mutatott az antioxidáns kapacitás mérések eredményeivel, mint a gyümölcsök C-vitamin-tartalma. Ennek oka elsősorban abban keresendő, hogy ezek a komponensek önállóan, külön-külön is nagyobb antioxidáns kapacitás értékeket mutatnak az alkalmazott tesztekben. Ennek szerkezeti oka van, ami elsősorban a hidroxilcsoportok számával, elhelyezkedésével függ össze. A flavonoid profil tekintetében megállapítható, hogy a málnák és a piros ribiszkék elsősorban kvercetin-származékokat tartalmaznak. A szamócák esetében sikerült apigenin-glikozidokat is kimutatni és megerősíteni a kempferol- és a kvercetin-glikozidok mellett. A fekete ribiszkék rendelkeztek a legösszetettebb flavonoid mintázattal, mert egyes fajták esetén a kvercetin- és miricetin-glikozidok mellett naringenin-, luteolin- és kempferol-glikozidokat is sikerült megerősíteni. A változékonyság nagy valószínűséggel genetikai okokra vezethető vissza, hiszen a gyümölcsök azonos termőterületről származtak és azonosak voltak a termesztési körülmények is. A flavonoidok szintézisét genetikailag kódolt; komplett enzimrendszer szabályozza, ami elsősorban meghatározza, hogy az adott gyümölcsben milyen flavonoidok szintetizálódnak, és ezáltal az antioxidáns kapacitásra is közvetetten kihat (pl. több hidroxilcsoport, általánosságban nagyobb antioxidáns kapacitással jár).

Eredményeimmel a bogyós gyümölcsök táplálkozás-élettani szerepét szerettem volna hangsúlyozni, valamint felhívni arra a figyelmet, hogy elsősorban azon fajták feldolgozását kellene szorgalmazni, amelyek nagyobb mennyiségben tartalmazzák azokat a komponenseket, amelyek a kedvező hatások elérésében szerepet játszhatnak, hiszen az élelmiszeripari feldolgozás során a fontos komponensek jelentős része megsemmisülhet.

8. SUMMARY

The healthy and well-balanced diet can play a significant role in the prevention of free radicals induced diseases. Comparing the fruits and vegetables berries possess the highest antioxidant capacity that is due to their high contents of polyphenolics and vitamins. Epidemiological studies confirmed that these compounds have a direct or indirect role in the elimination of free radicals, and hence contribute to the prevention of several diseases. My experiments were carried out to analyze some berry fruits grown in Hungary, including strawberry, raspberry, red and black currants and some of their most important cultivars.

The antioxidant capacity of berries were determined by various methods based on different chemistry (electron transfer, hydrogen atom transfer), and hence fruits were investigated under distinct reaction conditions, and against several free radicals (hydroxyl, superoxide anion, DPPH, ABTS radicals). Moreover, the ranking orders of fruits established by several methods were also compared. The determination of some components (vitamin C, anthocyanins, the characteristic phenolic acids, and other flavonoids) that considerably contribute to the antioxidant capacity values was also an important task. My experiments were carried out to characterize the differences in antioxidant parameters among the species and cultivars grown under identical conditions (soil, climate, moisture etc.) and find out how the antioxidant assays influence the results. My measurements were completed by testing the applicability (accuracy and sensitivity) a device commercially available for measuring antioxidant capacity since it was not reported previously.

Concerning the device it has to be stressed that its lipid-soluble antioxidant capacity measurement can be considered problematic from several aspects. The primary problem appears to be the advised solvent (methanol) for the lipid-soluble antioxidant molecules. Using methanol for these measurements is problematic because several water-soluble compounds are also soluble in methanol, including vitamin C that is commonly occurring in fruits and vegetables, therefore, it will also influence the values of lipid-soluble antioxidant capacity. Consequently, a fraction of the values known as lipid-soluble antioxidant capacity can be attributed to an unknown amount of undetermined water soluble compounds. Besides, the water soluble citric acid, that has not free radical scavenging activity, and hence it is not allowed to react under the test conditions, produced lipid-soluble antioxidant capacity, which is erroneous. Data evaluation is also doubtful. Since in this mode the reference is the area under the signal curve, the software of the system will always be able to integrate during a certain time period. It means, results are always generated, even if the curve converges to the curves of the blanks. If this result obtained for a

highly diluted sample the results will be multiplied with the dilution factor, and consequently we get a huge antioxidant capacity, that is also erroneous. Besides purchasing the kits, stability problems may arise, and this way the routine sample measurements is also problematical. According to my experiments and experiences this instrument is not adaptable to a high-throughput antioxidant capacity measurement system that is in contrast with the statement of the manufacturer.

According to my experiments the berry fruits grown in Hungary under the same conditions are characterized by high antioxidant capacity as confirmed by various antioxidant assays based on different chemistry and using different free radicals for the measurements. The correlations among the used methods were significant ($p < 0,05$) in many cases. The values of the water-soluble and lipid-soluble antioxidant capacities based on the elimination of superoxide anions showed close correlations with the results of methods measuring the scavenging activity against hydroxyl, DPPH, ABTS radicals, as well as characterizing the ferric reducing ability of samples. There is a negative correlation among the TRSC (total radical scavenger capacity) and other methods, which is due to the differences in data evaluation. The ranking orders of the species and cultivars were different according to the methods used, which might be due to the quality and quantities of their antioxidant and other compounds. These mixtures of varied compositions can be characterized by different behavior under the test conditions. Generally, the antioxidant capacity of black currants is 2-8 times higher than the values for other species (red currant, raspberry, strawberry). The ranking orders of the three other fruit species were different according to the applied tests. According to my experiments, and literature data, it can be explained by the fact that black currants are rich in all those compounds, - that produce high antioxidant capacity when measured as a standard in the tests applied in my experiments (*ACW*, *ACL*, *TRSC*, *FRAP*, *TPC*, *TEAC*, *DPPH*). Firstly its gallic acid content and myricetin glycosides have to be emphasized, and its total phenolic acid content is also considerable. The delphinidin and cyanidin glycosides also belong to the characteristic compounds of black currants that show high antioxidant capacity in the applied tests. Besides black currants, strawberries had also high vitamin C contents, followed by red currants and raspberry cultivars. The total anthocyanin contents were 2-4 times higher in black currants than other berries. As far as the phenolic acids are concerned the strawberries are rich in ellagic acid, and para-coumaric acids, but their ratios can also vary significantly among cultivars. Besides ellagic acid, ferulic acid, gallic acid, and caffeic acid belong to the characteristic compounds of the investigated raspberries. In the red currants, 4-hydroxy-benzoic acid, vanillin acid, para-coumaric acid and caffeic acid were the dominant compounds. In black currants, the amounts of 4-hydroxy-benzoic acid, trans-cinnamic acid, para-coumaric acid, gallic acid, and caffeic acid are also significant.

My results confirm that polyphenolic compounds are responsible for most of the antioxidant capacity in case of the tested fruits. The determined total anthocyanin and total phenolic acid contents as well as the contents of several phenolic acids (gallic acid, 4-hydroxy-benzoic acid, caffeic acid) showed closer correlations with antioxidant capacity values than did the vitamin C content of fruits. This is explained by the fact that these components are also characterized by higher antioxidant capacity value when tested as isolated compounds in the applied tests. It is due to their structure, primarily the number and position of the hydroxyl groups. Related to the flavonoid profile it can be concluded that raspberries and red currants accumulate primarily quercetin derivatives. In strawberry, apigenin glycosides were also detected and confirmed, besides kaempferol and quercetin glycosides. Black currants possessed the most complex flavonoid profile, since naringenin, luteolin, kaempferol glycosides could be also confirmed in some cultivars in addition to the myricetin and quercetin glycosides. Genotype must be responsible for most of the variation detected since berries were grown in the same area under identical conditions. The flavonoid biosynthesis is controlled by a complex enzyme catalyzed system, that primarily determine which flavonoids are synthesized, therefore it has an indirect effect on their antioxidant capacity (for example, more hydroxyl groups mean higher antioxidant capacity).

My results emphasize the role of berries in nutrition, and draw the attention on the choice of cultivars used for processing. Cultivars should be chosen according to their most favorable inner content since most food industrial treatments will result in a considerable loss of bioactive compounds of fruits.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Agullo G., GametPayraastre L., Manenti S., Viala C., Remesy C., Chap H. és Payraastre B. (1997): Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology*, (53):1649-1657.
- Aherne S. A. és O'Brien N. M. (2002): Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, (18):75-81.
- Alho H. és Leinonen J. (1999): Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Oxidants and Antioxidants, Pt A*, pp 3-15.
- Almeida J. R. M., D'Amico E., Preuss A., Carbone F., de Vos C. H. R., Deiml B., Mourgues F., Perrotta G., Fischer T. C., Bovy A. G. és mtsai. (2007): Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (465):61-71.
- Analytic Jena (2003): Műszaki Dokumentáció. AG.
- Anttonen M. J. és Karjalainen R. O. (2005): Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, (18):759-769.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S. E., Bektasoglu B., Berker K. I. és Ozyurt D. (2007): Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, (12):1496-1547.
- Arora A., Nair M. G. és Strasburg G. M. (1998): Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, (24):1355-1363.
- Balogh E., Hegedus A. és Stefanovits-Banyai E. (2010): Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae*, (125):332-336.
- Becker E. M., Nissen L. R. és Skibsted L. H. (2004): Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, (219):561-571.
- Benvenuti S., Pellati F., Melegari M. és Bertelli D. (2004): Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, (69):C164-C169.
- Benzie I. F. F. (2000): Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, (39):53-61.
- Benzie I. F. F. (2003): Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology a Molecular & Integrative Physiology*, (136):113-126.
- Benzie I. F. F. és Strain J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, (239):70-76.
- Bíró G. és Lindner K. (1999): Tápanyagtáblázat. *Medicina Kiadó Rt., Budapest*.
- Blázovics A., Kovács A., Lugasi A., Hagymási K., Bíró L. és Fehér J. (1999): Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: A chemiluminescent study. *Clinical Chemistry*, (45):895-896.
- Block G., Patterson B. és Subar A. (1992): Fruit, vegetables, and cancer prevention-a review of the epidemiologic evidence. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, (18):1-29.
- Blois M. S. (1958): Antioxidant determination by the use of a stable free radicals. *Nature*, (4617):1198-1200.
- Boots A. W., Haenen G. és Bast A. (2008): Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, (585):325-337.

- Borradaile N. M., Carroll K. K. és Kurowska E. M. (1999): Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*, (34):591-598.
- Bors W., Michel C. és Saran M. (1984): Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin-a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, (796):312-319.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, (56):317-333.
- Brown L. A. S. és Jones D. P. (1996): The biology of ascorbic acid. Handbook of antioxidants. *Marcel Dekker. New York.*, (117-156.).
- Bushman B. S., Phillips B., Isbell T., Ou B., Crane J. M. és Knapp S. J. (2004): Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52):7982-7987.
- Cadenas E. (1989): Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, (58):79-110.
- Cameron E. és Pauling L. (1976): Supplemental ascorbate in supportive treatment of cancer-prolongation of survival times in terminal human cancer.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (73):3685-3689.
- Cao G. H., Alessio H. M. és Cutler R. G. (1993): Oxygen-radical absorbancy capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, (14):303-311.
- Cao G. H. és Prior R. L. (1998): Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, (44):1309-1315.
- Cao G. H., Sofic E. és Prior R. L. (1997): Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, (22):749-760.
- Capocasa F., Scalzo J., Mezzetti B. és Battino M. (2008): Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chemistry*, (111):872-878.
- Castaneda-Ovando A., Pacheco-Hernandez M. D., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A. és Galan-Vidal C. A. (2009): Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, (113):859-871.
- Chapple I. L. C., Mason G. I., Garner I., Matthews J. B., Thorpe G. H., Maxwell S. R. J. és Whitehead T. P. (1997): Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Annals of Clinical Biochemistry*, (34):412-421.
- Chaudiere J. és Ferrari-Iliou R. (1999): Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, pp 949-962.
- Chen C., Zhang H., Xiao W., Yong Z. P. és Bai N. (2007): High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Journal of Chromatography A*, (1154):250-259.
- Chevion S., Roberts M. A. és Chevion M. (2000): The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology and Medicine*, (28):860-870.
- Coates E. M., Popa G., Gill C. I. R., McCann M., McDougall G. J., Stewart D. és Rowland I. (2007): Colon-available raspberry extract exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, (66):67A-67A.
- Cook N. R., Albert C. M., Gaziano J. M., Zaharris E., MacFadyen J., Danielson E., Buring J. E. és Manson J. E. (2007): A Randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women - Results from the women's antioxidant cardiovascular study. *Archives of Internal Medicine*, (167):1610-1618.
- Cornetti U. (2009): Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, (27):175-194.
- Critchfield J. W., Butera S. T. és Folks T. M. (1996): Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *Aids Research and Human Retroviruses*, (12):39-46.

- Crozier A., Lean M. E. J., McDonald M. S. és Black C. (1997): Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (45):590-595.
- Davies K. J. A. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *Iubmb Life*, (50):279-289.
- de Ancos B., Gonzalez E. és Cano M. P. (1999): Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology*, (208):33-38.
- de Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C. és Brinkman U. A. T. (2006): Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, (1112):31-63.
- Delange R. J. és Glazer A. N. (1989): Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy-radicals a screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry*, (177):300-306.
- Diaz A. N., Peinado M. C. R. és Minguez M. C. T. (1998): Sol-gel horseradish peroxidase biosensor for hydrogen peroxide detection by chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, (363):221-227.
- DiNardo J. C., Lewis J. A., Neudecker B. A. és Maibach H. I. (2004): Antioxidants compared in a new protocol to measure protective capacity against oxidative stress-part II, in: *62nd Annual Meeting of the American-Academy-of-Dermatology*, pp P120, Washington, Dc.
- Djuric Z., Depper J. B., Uhley V., Smith D., Lababidi S., Martino S. és Heilbrun L. K. (1998): Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. *Journal of the American Dietetic Association*, (98):524-528.
- Downey M. O., Harvey J. S. és Robinson S. P. (2003): Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, (9):110-121.
- Duthie G. és Crozier A. (2000): Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, (11):43-47.
- Engel R., Abranko L., Stefanovits-Banyai E. és Fodor P. (2010): Simultaneous determination of water soluble vitamins in fortified food products. *Acta Alimentaria*, (39):48-58.
- Ercisli S. és Orhan E. (2008): Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, (116):41-46.
- Erlund I. (2004): Review of the flavonoids quercetin, hesperetin naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. *Nutrition Research*, (24):851-874.
- Erlund I., Kosonen T., Alfthan G., Maenpaa J., Perttunen K., Kenraali J., Parantainen J. és Aro A. (2000): Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, (56):545-553.
- Estruch R., Martinez-Gonzalez M. A., Corella D., Salas-Salvado J., Ruiz-Gutierrez V., Covas M. I., Fiol M., Gomez-Gracia E., Lopez-Sabater M. C., Vinyoles E. és mtsai. (2006): Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors - A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, (145):1-11.
- Ewald C., Fjelkner-Modig S., Johansson K., Sjöholm I. és Akesson B. (1999): Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, (64):231-235.
- Ewing J. F. és Janero D. R. (1995): Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, (232):243-248.
- Fernandez-Pachon M. S., Villano D., Troncoso A. M. és Garcia-Parrilla M. C. (2006): Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity, pp 101-108.

- Frankel E. N. és Finley J. W. (2008): How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56):4901-4908.
- Frankel E. N. és Meyer A. S. (2000): The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (80):1925-1941.
- Galati G. és O'Brien P. J. (2004): Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, (37):287-303.
- Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A., Rostagno M. A. és Martinez J. A. (2009): Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, (58):537-552.
- Gardner P. T., White T. A. C., McPhail D. B. és Duthie G. G. (2000): The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, (68):471-474.
- Garzon G. A., Riedl K. M. és Schwartz S. J. (2009): Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Science*, (74):C227-C232.
- Ghiselli A., Serafini M., Natella F. és Scaccini C. (2000): Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, (29):1106-1114.
- Gil M. I., Holcroft D. M. és Kader A. A. (1997): Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (45):1662-1667.
- Girodon F., Galan P., Monget A. L., Boutron-Ruault M. C., Brunet-Lecomte P., Preziosi P., Arnaud J., Manuguerra J. C. és Herberg S. (1999): Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized elderly patients - A randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*, (159):748-754.
- Giusti M. M. és Wrolstad R. E. (1996): Characterization of red radish anthocyanins. *Journal of Food Science*, (61):322-326.
- Gokmen V., Serpen A. és Fogliano V. (2009): Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, (20):278-288.
- Guo Q. N., Zhao B. L., Li M. F., Shen S. R. és Xin W. J. (1996): Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, (1304):210-222.
- Hagerman A. E., Riedl K. M., Jones G. A., Sovik K. N., Ritchard N. T., Hartzfeld P. W. és Riechel T. L. (1998): High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (46):1887-1892.
- Hägg M., Ylikoski S. és Kumpulainen J. (1995): Vitamin C content in fruits and berries consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, (8):12-20.
- Hakala M., Lapveteläinen A., Huopalahti R., Kallio H. és Tahvonen R. (2003): Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, (16):67-80.
- Hakkinen S., Heinonen M., Karenlampi S., Mykkanen H., Ruuskanen J. és Torronen R. (1999a): Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, (32):345-353.
- Hakkinen S. H., Karenlampi S. O., Heinonen I. M., Mykkanen H. M. és Torronen A. R. (1999b): Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (47):2274-2279.

- Hakkinen S. H. és Torronen A. R. (2000): Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and Vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, (33):517-524.
- Halbwirth H., Puhl I., Haas U., Jezik K., Treutter D. és Stich K. (2006): Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (54):1479-1485.
- Halliwell B. (2001): Role of free radicals in the neurodegenerative diseases - Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, (18):685-716.
- Halliwell B. (2007): Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, (73):341-347.
- Halliwell B. és Gutteridge J. M. C. (1995): The definition and measurement of antioxidants in biological-systems. *Free Radical Biology and Medicine*, (18):125-126.
- Hanasaki Y., Ogawa S. és Fukui S. (1994): The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, (16):845-850.
- Harbaum B., Hubbermann E. M., Wolff C., Herges R., Zhu Z. és Schwarz K. (2007): Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSn and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (55):8251-8260.
- Harborne J. B. és Williams C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, (55):481-504.
- Hatano T., Kagawa H., Yasuhara T. és Okuda T. (1988): 2 new flavonoids and other constituents in licorice root-their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, (36):2090-2097.
- Havsteen B. H. (2002): The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, (96):67-202.
- Hegedűs A., Balogh E., Engel R., Sipos B. Z., Papp J., Blázovics A. és Stefanovits-Bányai E. (2008): Comparative nutrient element and antioxidant characterization of berry fruit species and cultivars grown in Hungary. *Hortscience*, (43):1711-1715.
- Heinonen I. M., Meyer A. S. és Frankel E. N. (1998): Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (46):4107-4112.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. és Katan M. B. (1992): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (40):2379-2383.
- Hidalgo M., Sanchez-Moreno C. és de Pascual-Teresa S. (2010): Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, (121):691-696.
- Ho P., Hogg T. A. és Silva M. C. M. (1999): Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chemistry*, (64):115-122.
- Hollman P. C. H. és Arts I. C. W. (2000): Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (80):1081-1093.
- Hollman P. C. H. és Katan M. B. (1997): Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (51):305-310.
- Hollman P. C. H. és Katan M. B. (1999a): Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability, pp 937-942.
- Hollman P. C. H. és Katan M. B. (1999b): Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food And Chemical Toxicology*, (37):937-942.
- Hong V. és Wrolstad R. E. (1990): Characterization of anthocyanin-containing coloratns and fruit juices by HPLC photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (38):698-708.

- Huang D. J., Ou B. X. és Prior R. L. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (53):1841-1856.
- Hubbard G. P., Stevens J. M., Cicmil M., Sage T., Jordan P. A., Williams C. M., Lovegrove J. A. és Gibbins J. M. (2003): Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components, of the glycoprotein VI signaling pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, (1):1079-1088.
- Hung H. C., Joshupura K. J., Jiang R., Hu F. B., Hunter D., Smith-Warner S. A., Colditz G. A., Rosner B., Spiegelman D. és Willett W. C. (2004): Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, (96):1577-1584.
- Ishige K., Schubert D. és Sagara Y. (2001): Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, (30):433-446.
- Jiang Q., Christen S., Shigenaga M. K. és Ames B. N. (2001): γ -tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *American Journal of Clinical Nutrition*, (74):714-722.
- Kalt W., Forney C. F., Martin A. és Prior R. L. (1999): Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (47):4638-4644.
- Karakaya S. és El S. N. (1999): Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. *Food Chemistry*, (66):289-292.
- Klipstein-Grobusch K., Geleijnse J. M., den Breeijen J. H., Boeing H., Hofman A., Grobbee D. E. és Witteman J. C. M. (1999): Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, (69):261-266.
- Kranl K., Schlesier K., Bitsch R., Hermann H., Rohe M. és Bohm V. (2005): Comparing antioxidative food additives and secondary plant products - use of different assays. *Food Chemistry*, (93):171-175.
- KSH (2007): <http://portal.ksh.hu/pls/ksh/docs/hun/xftp/gyor/jel/jel309041.pdf>.
- KSH (2009a): http://portal.ksh.hu/pls/ksh/docs/hun/eurostat_tablak/t_popula/tps00025.html.
- KSH (2009b): http://portal.ksh.hu/pls/ksh/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/tabl4_01_13ia.html.
- Lang A. E. és Lozano A. M. (1998): Parkinson's disease - First of two parts. *New England Journal of Medicine*, (339):1044-1053.
- Lee J. E., Giovannucci E., Smith-Warner S. A., Spiegelman D., Willett W. C. és Curhan G. C. (2006): Intakes of fruits, vegetables, vitamins A, C, and E, and carotenoids and risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, (15):2445-2452.
- Lempereur I., Rouau X. és Abecassis J. (1997): Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal Of Cereal Science*, (25):103-110.
- Lengsfeld C., Deters A., Faller G. és Hensel A. (2004): High molecular weight polysaccharides from black currant seeds inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Planta Medica*, (70):620-626.
- Li W. D., Hydamaka A. W., Lowry L. és Beta T. (2009): Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Central European Journal of Biology*, (4):499-506.
- Li Y. és Schellhorn H. E. (2007): New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition*, (137):2171-2184.
- Liu S., Manson J. E., Lee I. M., Cole S. R., Hennekens C. H., Willett W. C. és Buring J. E. (2000): Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, (72):922-928.
- Lugasi A. (2000): Az élelmiszereredetű flavonoidok potenciális egészségvédő hatása. *Orvosi Hetilap*, (141).
- Lugasi A. és Blázovics A. (2004): Az egészséges táplálkozás tudományos alapjai, 4 Számú útmutató az egészség megőrzéséhez. *PXP Nyomda*, (Budapest).

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. és Jimenez L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, (79):727-747.
- March R. E., Lewars E. G., Stadey C. J., Miao X. S., Zhao X. M. és Metcalfe C. D. (2006): A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, (248):61-85.
- Mariani C., Braca A., Vitalini S., De Tommasi N., Visioli F. és Fico G. (2008): Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. ('Ranunculaceae). *Phytochemistry*, (69):1220-1226.
- Martinez-Tome M., Garcia-Carmona F. és Murcia M. A. (2001): Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (81):1019-1026.
- McDonald M. S., Hughes M., Burns J., Lean M. E. J., Matthews D. és Crozier A. (1998): Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (46):368-375.
- Meyers K. J., Watkins C. B., Pritts M. P. és Liu R. H. (2003): Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51):6887-6892.
- Mikkonen T. P., Maatta K. R., Hukkanen A. T., Kokko H. I., Torronen A. R., Karenlampi S. O. és Karjalainen R. O. (2001): Flavonol content varies among black currant cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (49):3274-3277.
- Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V. és Milner A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, (84):407-412.
- Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M. és Rice-Evans C. A. (1996): Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Febs Letters*, (384):240-242.
- Miyagi Y., Om A. S., Chee K. M. és Bennink M. R. (2000): Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, (36):224-229.
- Mojzis J., Varinska L., Mojzisova G., Kostova I. és Mirossay L. (2008): Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacological Research*, (57):259-265.
- Molnar-Perl I. és Fuzfai Z. (2005): Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, (1073):201-227.
- Mortensen A., Skibsted L. H. és Truscott T. G. (2001): The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (385):13-19.
- Mullen W., Lean M. E. J. és Crozier A. (2002): Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, (966):63-70.
- Murota K. és Terao J. (2003): Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (417):12-17.
- Niki E. (2002): Antioxidant activity: Are we measuring it correctly? *Nutrition*, (18):524-525.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer E. K., Prior R. L. és Huang D. J. (2002a): Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50):2772-2777.
- Ou B. X., Hampsch-Woodill M. és Prior R. L. (2001): Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (49):4619-4626.
- Ou B. X., Huang D. J., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A. és Deemer E. K. (2002b): Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50):3122-3128.
- Ozgen M., Reese R. N., Tulio A. Z., Scheerens J. C. és Miller A. R. (2006): Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant

- capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (54):1151-1157.
- Pantelidis G. E., Vasilakakis M., Manganaris G. A. és Diamantidis G. (2007): Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chemistry*, (102):777-783.
- Papp J. (2004): A gyümölcsök termesztése. *Mezőgazda Kiadó*, (Budapest).
- Patras A., Brunton N. P., Da Pieve S. és Butler F. (2009): Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purees. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (10):308-313.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M. és Brighenti F. (2003): Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, (133):2812-2819.
- Perez-Jimenez J., Arranz S., Tabernero M., Diaz-Rubio M. E., Serrano J., Goni I. és Saura-Calixto F. (2008): Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of. *Food Research International*, (41):274-285.
- Perez-Jimenez J. és Saura-Calixto F. (2006): Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, (39):791-800.
- Peterson J. és Dwyer J. (1998): Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, (18):1995-2018.
- Petti S. és Scully C. (2009): Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*, (37):413-423.
- Pietta P. G. (2000): Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, (63):1035-1042.
- Popov I. N. és Lewin G. (1994): Photochemiluminescent detection of antiradical activity.2. Testing nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, (17):267-271.
- Popov I. N. és Lewin G. (1996): Photochemiluminescent detection of antiradical activity .4. Testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (31):1-8.
- Prasad A. S. és Kucuk O. (2002): Zinc in cancer prevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, (21):291-295.
- Prior R. L. (2003): Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, (78):S70S-S78S.
- Prior R. L. és Cao G. H. (1999): In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, (27):1173-1181.
- Prior R. L., Wu X. L. és Schaich K. (2004): Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, in: *1st International Congress on Antioxidant Methods*, pp 4290-4302, Orlando, FL.
- Pryor W. A. (2000): Vitamin E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine*, (28):141-164.
- Pryor W. A. és Squadrito G. L. (1995): The chemistry of peroxynitrite a product from the reaction of nitric-oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, (268):L699-L722.
- Qin Y. H., da Silva J. A. T., Zhang L. X. és Zhang S. L. (2008): Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances*, (26):219-232.
- Radtke J., Linseisen J. és Wolfram G. (1998): Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft*, (37):190-197.

- Raffo A., Paoletti F. és Antonelli M. (2004): Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *European Food Research and Technology*, (219):360-368.
- Rak G., Fodor P. és Abranko L. (2010): Three-step HPLC-ESI-MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry*, (290):32-38.
- Reynertson K. A., Yang H., Jiang B., Basile M. J. és Kennelly E. J. (2008): Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, (109):883-890.
- Rice-Evans C. (2001): Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, (8):797-807.
- Rice-Evans C. és Miller N. J. (1994): Total antioxidant status in plasma and body-fluids, *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt D*, pp 279-293.
- Rice-Evans C. A., Miller J. és Paganga G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, (2):152-159.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. és Paganga G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, (20):933-956.
- Rigano D., Formisano C., Basile A., Lavitola A., Senatore F., Rosselli S. és Brtmo M. (2007): Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp *libanoticum*. *Phytotherapy Research*, (21):395-397.
- Rist M. J., Wenzel U. és Daniel H. (2006): Nutrition and food science go genornic. *Trends in Biotechnology*, (24):172-178.
- Robards K. és Antolovich M. (1997): Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review. *Analyst*, (122):R11-R34.
- Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P. és Glover W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, (66):401-436.
- Robinson E. E., Maxwell S. R. J. és Thorpe G. H. G. (1997): An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Radical Research*, (26):291-302.
- Roginsky V. és Lissi E. A. (2005): Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, (92):235-254.
- Said T. M., Kattal N., Sharma R. K., Sikka S. C., Thomas A. J., Mascha E. és Agarwal A. (2003): Enhanced chemiluminescence assay vs colorimetric assay for measurement of the total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Journal of Andrology*, (24):676-680.
- Salinas-Moreno Y., Almaguer-Vargas C., Pena-Varela C. és Rios-Sanchez R. (2009): Ellagic acid and anthocyanin profiles in fruits of raspberry (*Rubus idaeus* L.) in different ripening stages. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, (15):97-101.
- Seeram N. P. (2008): Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56):627-629.
- Semba R. D. (1994): Vitamin A, immunity and infection. *Clinical Infectious Diseases*, (19):489-499.
- Sigounas G., Anagnostou A. és Steiner M. (1997): dl-alpha-tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, (28):30-35.
- Simirgiotis M. J., Theoduloz C., Caligari P. D. S. és Schmeda-Hirschmann G. (2009): Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. *Food Chemistry*, (113):377-385.
- Singleton V. L. és Rossi J. A. (1965): Colometry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, (161):144-158.

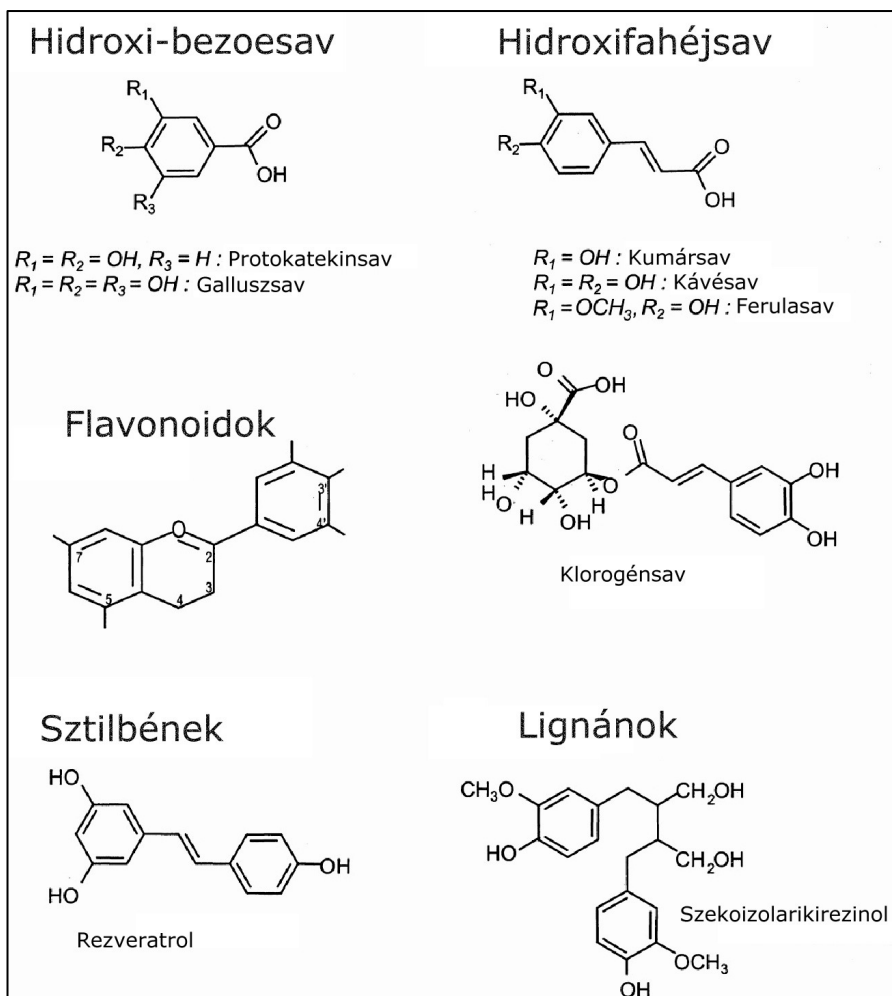
- Skupien K. és Oszmianski J. (2004): Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, (219):66-70.
- Slimestad R. és Solheim H. (2002): Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50):3228-3231.
- So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Moussa M. és Carroll K. K. (1996): Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, (26):167-181.
- Soobrattee M. A., Neergheen V. S., Luximon-Ramma A., Aruoma O. I. és Bahorun T. (2005): Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, (579):200-213.
- Stevenson D. E. és Hurst R. D. (2007): Polyphenolic phytochemicals - just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, (64):2900-2916.
- Stewart A. J., Bozonnet S., Mullen W., Jenkins G. I., Lean M. E. J. és Crozier A. (2000): Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (48):2663-2669.
- Stoner G. D., Wang L. S., Zikri N., Chen T., Hecht S. S., Huang C., Sardo C. és Lechner J. F. (2007): Cancer prevention with freeze-dried berries and berry components. *Seminars in Cancer Biology*, (17):403-410.
- Stratil P., Klejdus B. és Kuban V. (2007): Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, (71):1741-1751.
- Svirbely L. J. és Szent-Györgyi A. (1932): The chemical nature of vitamin C. *The Biochemical Journal*, (26):865-870.
- Szajdek A. és Borowska E. J. (2008): Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, (63):147-156.
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J. O. és Dommes J. (2009): Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, (113):1226-1233.
- Toporcov T. N., Antunes J. L. F. és Tavares M. R. (2004): Fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncology*, (40):925-931.
- Trichopoulou A., Costacou T., Bamia C. és Trichopoulos D. (2003): Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine*, (348):2599-2608.
- Tsimogiannis D. I. és Oreopoulou V. (2006): The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (7):140-146.
- Tura D. és Robards K. (2002): Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, (975):71-93.
- Ueda H., Yamazaki C. és Yamazaki M. (2002): Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, (25):1197-1202.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. és Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, (160):1-40.
- van den Berg R., Haenen G., van den Berg H. és Bast A. (1999): Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, (66):511-517.
- Verhagen H., Aruoma O. I., van Delft J. H. M., Dragsted L. O., Ferguson L. R., Knasmüller S., Pool-Zobel B. L., Poulsen H. E., Williamson G. és Yannai S. (2003): The 10 basic requirements for a scientific paper reporting antioxidant, antimutagenic or anticarcinogenic potential of test substances in in vitro experiments and animal studies in vivo. *Food And Chemical Toxicology*, (41):603-610.

- Vertuani S., Angusti A. és Manfredini S. (2004): The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview. *Current Pharmaceutical Design*, (10):1677-1694.
- Villano D., Fernandez-Pachon M. S., Troncoso A. M. és Garcia-Parrilla M. C. (2005): Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, (538):391-398.
- Viskelis P., Rubinskiene M., Jasutiene I., Sarkinas A., Daubaras R. és Cesoniene L. (2009): Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of american cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their press cakes. *Journal of Food Science*, (74):C157-C161.
- vonGadow A., Joubert E. és Hansmann C. F. (1997): Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (45):632-638.
- Vukics V. és Guttman A. (2010): Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, (29):1-16.
- Vuorinen H., Maatta K. és Torronen R. (2000): Content of the flavonols myricetin, quercetin, and kaempferol in Finnish berry wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (48):2675-2680.
- Walle T. (2004): Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, (36):829-837.
- Wang H., Cao G. H. és Prior R. L. (1996): Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (44):701-705.
- Wang H., Cao G. H. és Prior R. L. (1997): Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (45):304-309.
- Wang S. Y., Chen C. T. és Wang C. Y. (2009): The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*, (112):676-684.
- Wang S. Y. és Lin H. S. (2000): Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (48):140-146.
- Wang S. Y., Zheng W. és Galletta G. J. (2002): Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50):6534-6542.
- Wayner D. D. M., Burton G. W., Ingold K. U. és Locke S. (1985): 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 Letters*, (187):33-37.
- Wen X. és Walle T. (2005): Preferential induction of CYP1B1 by benzo[a]pyrene in human oral epithelial cells: impact on DNA adduct formation and prevention by polyphenols. *Carcinogenesis*, (26):1774-1781.
- Whitehead T. P., Thorpe G. H. G. és Maxwell S. R. J. (1992): Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological-fluids. *Analytica Chimica Acta*, (266):265-277.
- WHO (2004): http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf.
- Wicklund T., Rosenfeld H. J., Martinsen B. K., Sundfor M. W., Lea P., Bruun T., Blomhoff R. és Haffner K. (2005): Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Lwt-Food Science and Technology*, (38):387-391.
- Wilkinson F., Helman W. P. és Ross A. B. (1995): Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution-an expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, (24):663-1021.
- Willett W. C. (1995): Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environmental Health Perspectives*, (103):165-170.

- Williams R. J., Spencer J. P. E. és Rice-Evans C. (2004): Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, (36):838-849.
- Williner M. R., Pirovani M. E. és Guemes D. R. (2003): Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (83):842-845.
- Winkel-Shirley B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, (126):485-493.
- Winkel-Shirley B. (2002): Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, (5):218-223.
- Wu X. L., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E. és Prior R. L. (2004): Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52):4026-4037.
- Wu X. L., Beecher G. R., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E. és Prior R. L. (2006): Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (54):4069-4075.
- Wu X. L., Cao G. H. és Prior R. L. (2002): Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *Journal of Nutrition*, (132):1865-1871.
- Yang C. S., Sang S. M., Lambert J. D. és Lee M. J. (2008): Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, (52):S139-S151.
- Yen G. C. és Duh P. D. (1994): Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (42):629-632.
- Zabetakis I. és Holden M. A. (1997): Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (74):421-434.
- Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M., Chatterjee A., Vinson J. A. és Bagchi D. (2007): Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, (51):675-683.
- Zhao Z. H. és Moghadasian M. H. (2008): Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, (109):691-702.
- Zhou K. Q., Yin J. J. és Yu L. L. (2006): ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chemistry*, (95):446-457.
- Zulueta A., Esteve M. J. és Frigola A. (2009): ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, (114):310-316.

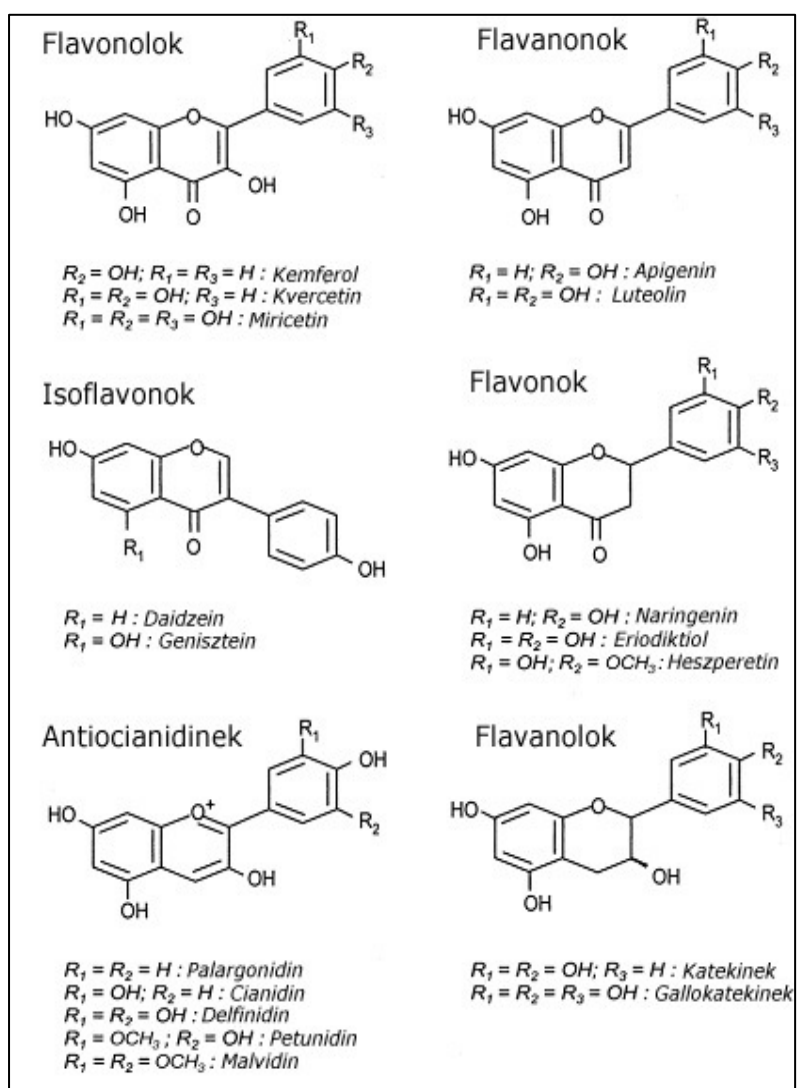
10. MELLÉKLETEK

Melléklet I.



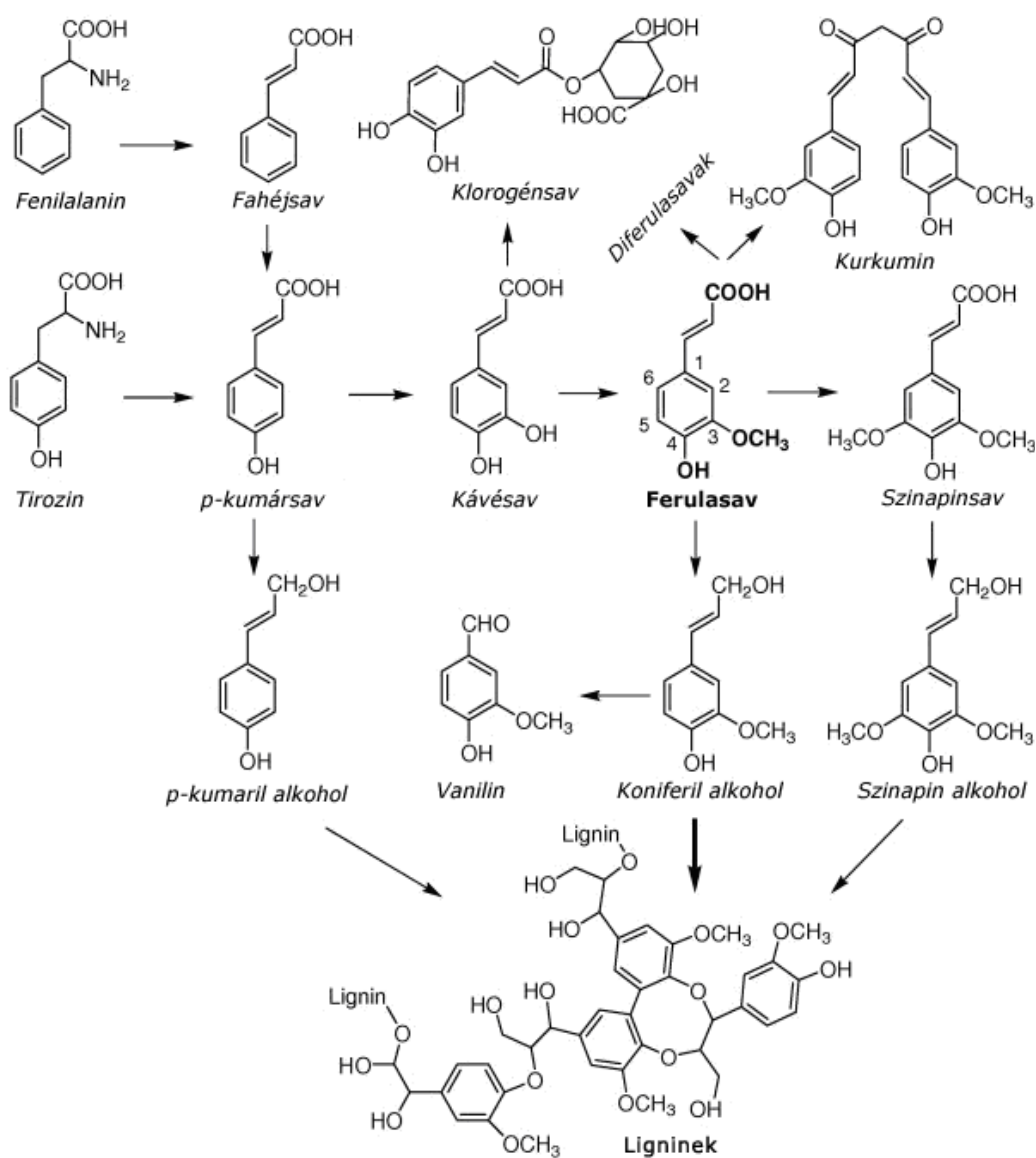
A fontosabb polifenolos vegyületek alapszerkezete (Manach és mtsai., 2004)

Melléklet II.



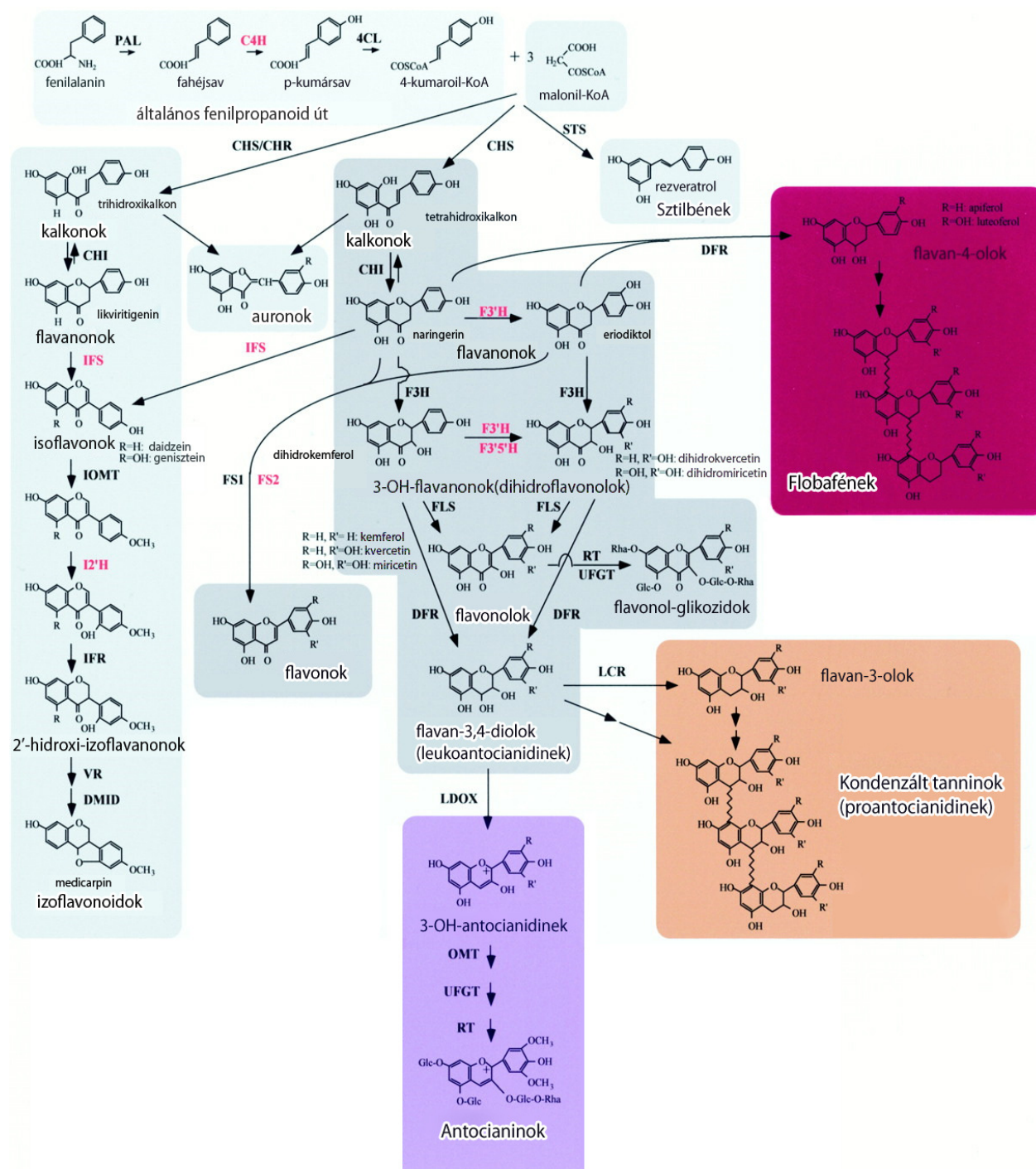
A flavonoidok fontosabb osztályai (Manach és mtsai., 2004)

Melléklet III.



A fontosabb fenolos savak kapcsolata, bioszintézis útvonala (Zhao és Moghadasian, 2008).

Melléklet IV.

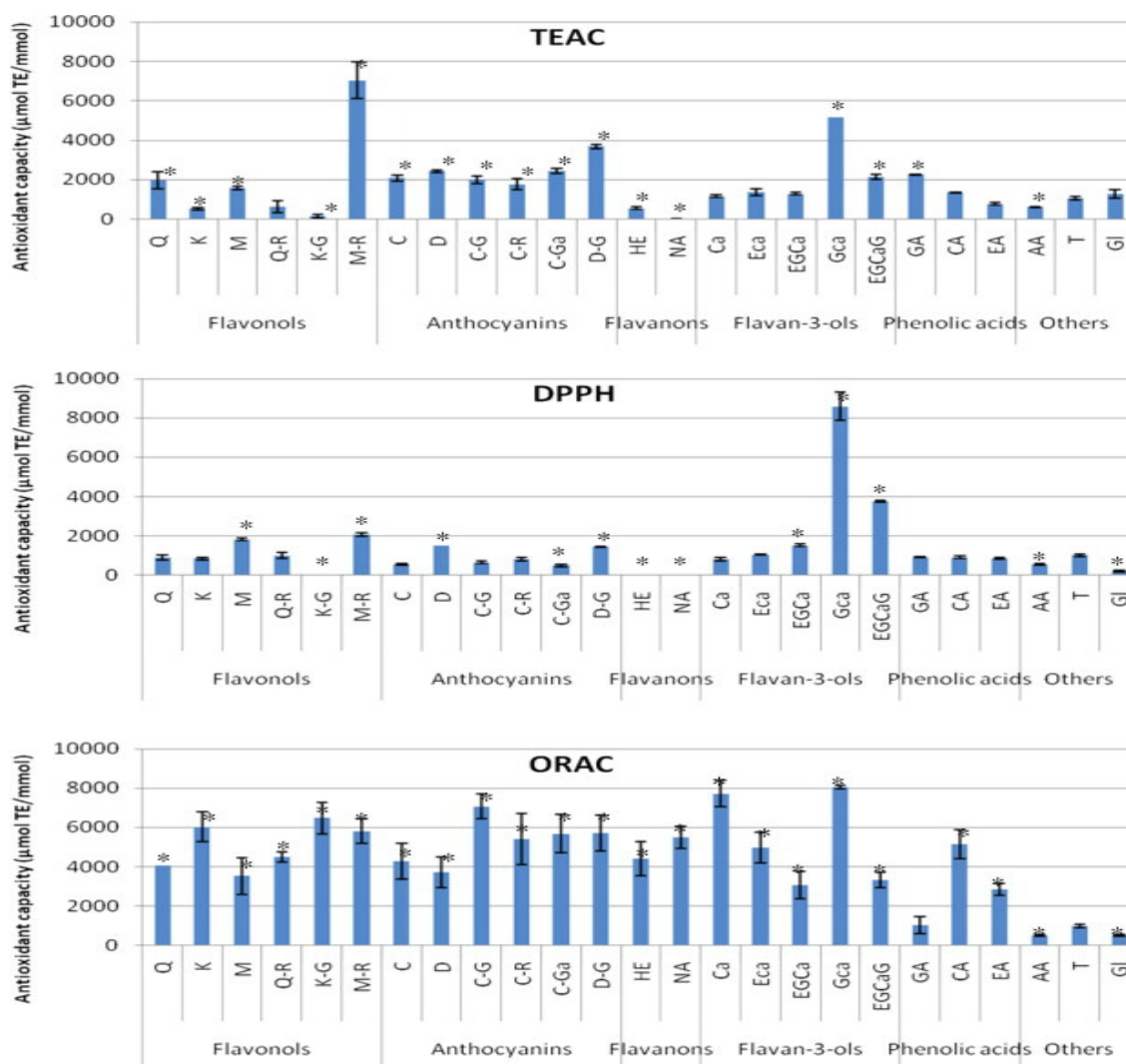


A flavonoid bioszintézis legfőbb útvonalai (Winkel-Shirley, 2001)

Rövidítések: C4H: cinnamát-4-hidroxiláz, CHI: kalkon-izomeráz, CHR: kalkon-reduktáz, CHS: kalkon szintáz, 4CL: 4-kumaroil-KoA-ligáz, DFR: dihidroflavonol-4-reduktáz, DMID: 7,2'-dihiroxi-4'-metoxiizoflavanol-dehidratáz, F3H: flavanon-3-hidroxiláz, FSI és FSII: flavon-szintázok, F3'H: flavonoid-3'-hidroxiláz, F3'5'H: flavonoid-3'5'-hidroxiláz, IOMT: izoflavon-O-

metiltranszferáz, IFR: izoflavon reduktáz, I2'H: izoflavone-2'-hidroxiláz, IFS: izoflavon-szintáz, LDOX: leukoantocianidin-dioxigenáz, LCR: leukoantocianidin-reduktáz, OMTO: metiltranszferáz, PAL: fenilalanin-ammónia-liáz, RT: ramnozil-transzferáz, STS: sztlibén-szintáz, UFGT: UDPG (uridin-difoszfoglükóz) –flavonoid-glikozil-transzferáz, VR: vesztiton reduktáz

Melléklet V.

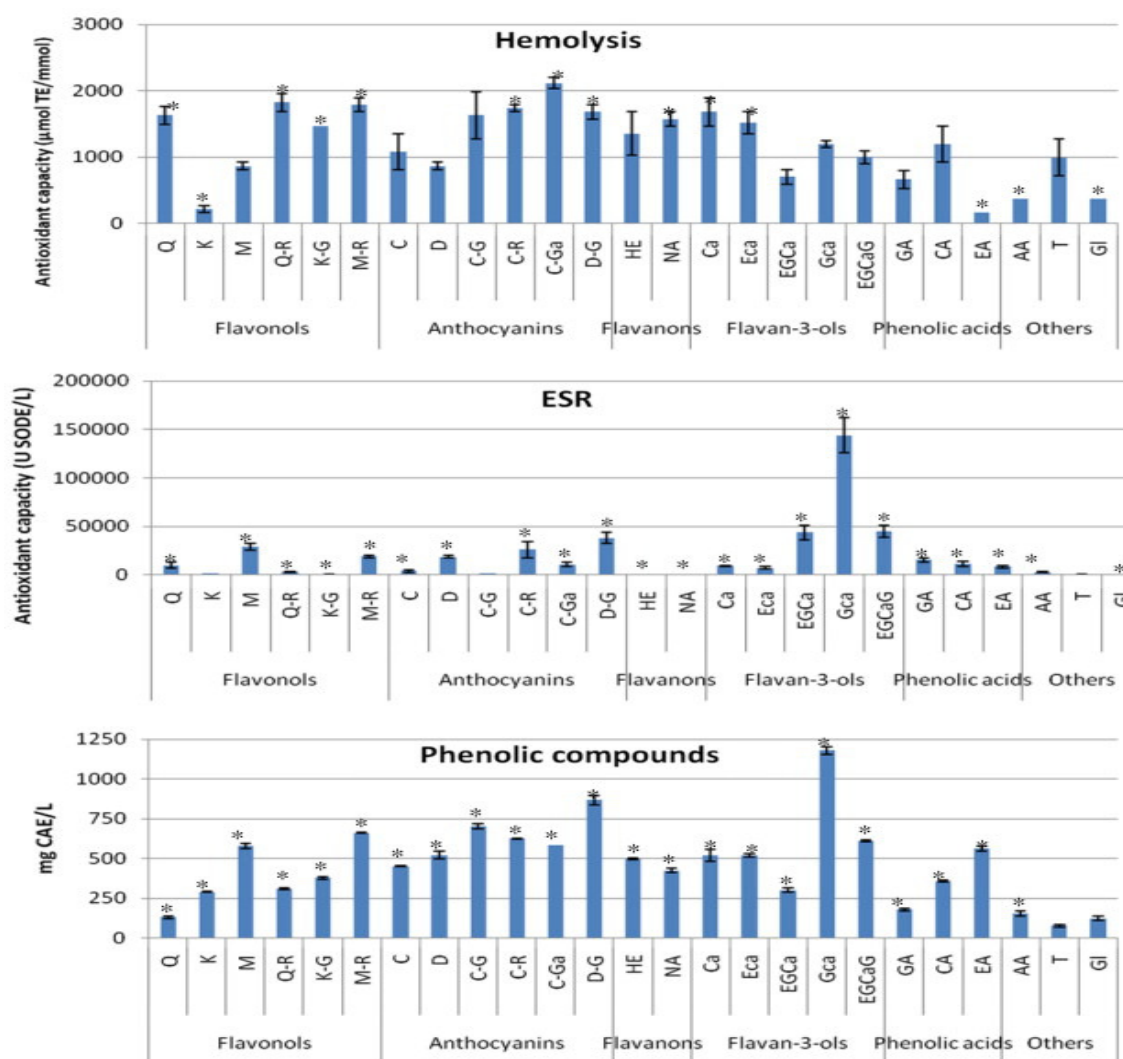


Az antioxidáns kapacitások 1 mmol standardra vonatkoztatva
TEAC, DPPH és ORAC módszerrel.

* jelzi a szignifikáns különbségeket a troloxhoz képest ($p < 0.05$) (Tabart és mtsai., 2009).

Rövidítések AA, aszkorbinsav; C, cianidin; C-G, cianidin-3-*O*-glükózid; C-Ga, cianidin-3-*O*-galaktozid; C-R, cianidin-3-*O*-rutinozid; Ca, katechin; CA, klorogénsav; D, delfinidin; D-G, delfinidin-3-*O*-glükózid; EA, ellágsav; ECa, epikatechin; EGCa, epigallokatechin; EGCaG, epigallokatechin-gallát; GA, galluszsav; GCa, gallokatechin; Gl, redukált glutation; HE, heszperidin; K, kempferol; K-G, kempferol-3-*O*-glükózid; M, miricetin; M-R, miricetin-3-rhamnozid; NA, naringenin; Q, kvercetin; Q-R, rutin; T, Trolox .

Melléklet VI.



Az antioxidáns kapacitások 1 mmol standardra vonatkoztatva
hemolízis ESR, és Folin-Ciocalteu módszerrel mérve.

*jelzi a szignifikáns különbségeket a troloxhoz képest ($p < 0.05$) (Tabart és mtsai., 2009).

Rövidítések AA, aszkorbinsav; C, cianidin; C-G, cianidin-3-*O*-glükózid; C-Ga, cianidin-3-*O*-galaktozid; C-R, cianidin-3-*O*-rutinozid; Ca, katechin; CA, klorogénsav; D, delfinidin; D-G, delfinidin-3-*O*-glükózid; EA, ellágsav; ECa, epikatechin; EGCa, epigallokatechin; EGCaG, epigallokatechin gallát; GA, galluszsav; GCa, gallokatechin; Gl, redukált glutátion; HE, heszperidin; K, kempferol; K-G, kempferol-3-*O*-glükózid; M, miricetin; M-R, miricetin-3-rhamnozid; NA, naringenin; Q, kvercetin; Q-R, rutin; T, Trolox .

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Fodor Péternek az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének, hogy munkámat lehetővé tette, és biztosította a szükséges tárgyi és anyagi feltételeket.

Köszönet illeti témavezetőmet Stefanovitsné Dr. Bányai Éva Tanárnőt munkám során nyújtott sokirányú, értékes segítségéért, támogatásáért, biztatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Abrankó László konzulensemnek is, aki új szemlélet- és gondolkodásmódot tárt elém a mérésekkel, problémákkal kapcsolatban.

Külön köszönetet kell mondanom dr. Hegedűs Attilának hasznos tanácsaiért, nagylelkűségéért és nélkülözhetetlen segítségéért, amelyek nagyban hozzájárultak doktori munkám elkészítéséhez.

Köszönöm doktorandusztársaimnak, az Alkalmazott Kémia Tanszék összes dolgozójának, valamint mindazoknak, akik közreműködtek abban, hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Köszönetet kell mondjak családomnak, Balogh Ádámnak, és Présinger Tamásnak is akik mindvégig mellettem álltak, és bíztattak PhD éveim alatt.