



Polifenolok és származékaik feltérképezése hármaskvadrupol tömegspektrometriás módszerrel

Jelölt: Rak Gábor

Témavezető: Dr. Abrankó László, Dr. Fodor Péter

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: ***Dr. Fodor Péter***
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

Kállay Miklós, CSc

Szabó Pál Tamás, PhD

Salgó András, DSc

Hoschke Ágoston, CSc

Opponensek

Vékey Károly, DSc

Lelik László, CSc

Titkár

Fodor Marietta, PhD

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. <i>Polifenolok általános jellemzése és előfordulásuk</i>	9
2.2. <i>Flavonoidok és fenolos savak bemutatása</i>	12
2.2.1. Csoportosításuk	12
2.2.2. Származékok	14
2.3. <i>Szerepük</i>	16
2.3.1. Növényvilágban	16
2.3.2. Emberi táplálkozásban	18
2.4. <i>Jelentőségük</i>	21
2.4.1. Eredet azonosításban	21
2.4.2. Antioxidáns jelleg leírásában	23
2.5. <i>Szelektív polifenol-analitikai módszerek</i>	24
2.5.1. Célkomponens módszerek és kereső (profilozó) módszerek jellegzetességei	25
2.5.2. Minta-előkészítési technikák	27
2.6. <i>Elterjedt műszeres meghatározási módszerek, eltérő megközelítések</i>	30
2.6.1. Elválasztás technikák	30
2.6.2. Detektálási módszerek	32
3. Célkitűzések	37
4. Anyag és módszerek	38
4.1. <i>Használt vegyszerek, standardok</i>	38
4.2. <i>Alkalmazott berendezések</i>	41
4.3. <i>Kidolgozott analitikai rendszer</i>	42
4.3.1. Minta-előkészítés	42
4.3.2. Kidolgozott kromatográfiák	43
4.3.3. Tömegspektrometriás módszerek összefoglalása	45
4.3.4. Az alkalmazott statisztikai módszerek	48
5. Eredmények	53
5.1. <i>Autentikus borok eredetének meghatározása polifenol készletük alapján</i>	53
5.1.1. Meghatározott komponensek köre	53
5.1.2. A nagy kromatográfiás felbontás szerepe a polifenolok mérésben	54
5.1.3. A statisztikai értékelés eredménye, izomerek diszkrimináló hatása	56
5.2. <i>Háromlépéses flavonoid mono- és diglikozid azonosítási módszer</i>	65
5.2.1. Első lépés bemutatása	66
5.2.2. Második lépés bemutatása	71
5.2.3. Harmadik lépés bemutatása	72
5.2.4. A mintában talált komponensek	75
5.3. <i>Kétlépéses flavonoid származék azonosítási módszer</i>	76
5.3.1. A módszer elvének bemutatása	76
5.3.2. Alkalmazás valódi mintára	91
6. Új tudományos eredmények	100
7. Összefoglalás	102
8. Summary	103
9. Irodalomjegyzék	105

1. Bevezetés

Ahogy a fejlett világ minden részén, hazánkban is egyre komolyabb veszélyt jelentenek az ún. civilizációs betegségek (úgy mint az elhízás, a szív- és érrendszeri problémák, a rosszindulatú daganatos megbetegedések, a II. típusú diabetes, stb.). Ezek elsődlegesen a modern kori életvitelből adódnak, tehát az egyoldalú és/vagy rendszertelen táplálkozás, a mozgáshiány és a stressz említhető fő kiváltó okként.

Magyarországra különösen jellemző, hogy a zöldség- és gyümölcsfogyasztás messze nem közelíti meg az ajánlott szintet, ami azt jelenti, hogy nem juttatunk a szervezetünkbe megfelelő mennyiségű ásványi elemet, vitamint és provitamint. Ezek a szervezet normális működésének fenntartásán kívül, elengedhetetlenül szükségesek a betegségek megelőzéséhez elsősorban antioxidáns komponenseik (ilyenek többek között a flavonoidok is) révén.

Az emberiség évezredek óta használja a legkülönbélebb növényeket, ill. azok főzeteit gyógyításra. Amit az ősember tapasztalatból tudott, azt Szentgyörgyi Albert a múlt század első felében tudományosan is megvilágított, amikor is élettani szempontból alaposan vizsgált egy biológiailag aktív vegyületcsaládot, az ún. flavonoidokat. Ezekre jellemző, hogy az egyéb fenolos szerkezetű vegyületekhez hasonlóan a növényi anyagcsere másodlagos termékei, így nem esszenciálisak az őket termelő szervezetek számára. Mégis számos hasznos funkcióval járulnak hozzá a túlélésükhöz, úgymint a pigmentálás, védelem az UV-sugárzás és a növényi kártevők ellen (mikroorganizmusok, gombák, rovarok, csigák stb.), enzimaktivitások regulációja, jeltovábbítás a nitrogénmegkötő baktériumok számára. A flavonoidokra a C₆-C₃-C₆ (difenilpropán) alapszénváz jellemző, amiben a két benzolgyűrű (A és B) egy oxigénatomot tartalmazó heterociklikus pirán-, vagy pirongyűrűn (C gyűrű) keresztül kapcsolódik (kivételt képeznek a kalkonok, de ezeket nem minden szerző sorolja a flavonoidok közé). Ez az alapszerkezet rendkívüli változatosságot biztosít mind a szubsztituensek, mind a C gyűrű szerkezetének tekintetében, amit mi sem bizonyít jobban, minthogy jelenleg mintegy 4000-8000-féle (irodalomtól függően) különböző szerkezetű tagját ismerjük a fent említett csoportnak.

A tárgyhoz szorosan kapcsolódik az a tény is, hogy újabban a „nyugati” orvoslásban is áttevődik a hangsúly a gyógyításról a megelőzésre, így egyre inkább előtérbe kerülnek a természetes alapanyagú gyógyhatású készítmények, amelyek többek közt polifenol összetevőik révén ígérik egészséget. Ahhoz, hogy megbizonyosodhassunk arról, valóban van tartalom az állítások mögött, többet kell tudnunk a polifenolok szerepéről, kémiai szerkezetéről és élettani hatásáról. Ezzel kapcsolatban rendszeresen jelennek meg összefoglaló tanulmányok, de az emberi szervezetre gyakorolt hatásuk még ma sem teljesen tisztázott. Annyi azonban bizonyossággal

kijelenthető, hogy nem jelentenek tápértéket a magasabb rendű emlős szervezetek számára, azaz az élelmiszereknek nem tápanyag komponensei. Ezenkívül számos kísérleti munka támasztja alá antioxidáns, antikarcinogén és gyulladás-csökkentő tulajdonságukat.

A legtöbb polifenol vegyület humán szempontból kedvező tulajdonságait az E- és C-vitaminnal, valamint a tokoferolokkal együtt fejti ki, azok hatását erősíti. Az in vitro kísérletek alapján a flavonoidok élettanilag előnyös hatásai a következő biokémiai folyamatok köré csoportosíthatók: 1) antioxidáns hatás például szabadgyök-befogás, 2) immunmoduláns és gyulladás-csökkentő hatás, 3) asztmaellenes és antiallergén hatás, 4) enzimek aktivitásának módosítása, 5) antivirális, antibakteriális hatás, 6) ösztrogén aktivitás (izoflavonoidok), 7) mutagenézist és karcinogenézist befolyásoló hatás, 8) hepatoprotektív hatás, 9) véredényrendszer működését, állapotát befolyásoló hatás, vascularis permeabilitás módosítása.

A polifenolok nagy száma, valamint az a tény, hogy az élelmiszerekben komplex formában vannak jelen, meglehetősen nehézkessé teszi a felszívódási, fiziológiai és táplálkozás-élettani hatások tanulmányozását.

A zöldség- és gyümölcsfélék feldolgozása során, a különböző tisztítási eljárásokkal, a hámozással, a levelek eltávolításával és a hőkezeléssel a flavonoid-tartalom jelentősen változhat. Bár relatíve stabil vegyületek, vagyis a hőre, az oxigénre és az enyhe pH-változásra általában nem érzékenyek (Aherne, O'Brien 2002), a különböző konyhatechnikai eljárások azonban veszteséget eredményezhetnek.

Az élelmiszer eredetű flavonoidok felszívódását és metabolizmusát alapvetően kémiai szerkezetük határozza meg, így többek között a glikoziláció/aciláció mértéke, egyéb polifenol vegyületekkel kialakított konjugációja, a molekula mérete, a polimerizáció foka és az oldhatóság is befolyásolja (Aherne, O'Brien 2002).

Degradációs termékeiknek az eredeti komponensekhez képest eltérő tulajdonságai is lehetnek, ezért a polifenolok élettani hatása az eredeti vegyület, valamint a szervezetben keletkező származékainak együttes hatásaként írható le.

Az irodalmi adatok szerint a flavonoidok relatíve nem toxikusak a magasabb rendű állatok és az ember számára. Tehát mindaddig, amíg a természetes élelmiszerek a flavonoidok egyetlen forrása, az intoxikáció kockázata gyakorlatilag kizárható.

A fentiekből következik az is, hogy a fokozott vitaminfogyasztásnak csak meghatározott mennyiségű flavonoid bevitelével együtt van értelme, mivel csak így történhet meg az eltérő erősségű antioxidáns vegyületek regenerálódása. Mielőtt azonban messzemenő következtetéseket vonnánk le, sokkal több és megalapozott, tudományosan igazolt információra van szükségünk az élelmiszerekben előforduló flavonoidok koncentrációjáról, a konyhatechnikai és egyéb

technológiai folyamatok során bekövetkező átalakulásokról és veszteségekről, és nem utolsósorban az emberi szervezetben történő hasznosulásukról.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Polifenolok általános jellemzése és előfordulásuk

A polifenol elnevezés igen sokfajta vegyület családot takar, melyeknek szerkezete, élettani hatása, kémiai tulajdonságaik nagymértékben eltérőek lehetnek (Robards, Antolovich 1997). Kémiaiilag úgy szokták őket definiálni, hogy a növényvilág olyan másodlagos anyagcsere termékei melyek legalább egy fenolos gyűrűt tartalmaznak, amihez egy vagy több hidroxil csoport kapcsolódik, de ezeken kívül számos más vegyület is kapcsolódhat hozzájuk (Fereidoon Shahidi 2004, Ferreres et al. 2009, Suarez et al. 2008). Az állati szervezetekbe csak a növényi táplálék elfogyasztásával kerülhetnek be. A polifenolok csoportjába tartoznak az egyszerű fenolok, fenilpropanoidok, benzoésavak, flavonoidok, stilbének, tanninok, lignánok és ligninek valamint ezek származékai és polimerizált formái (Fereidoon Shahidi 2004, Naczk, Shahidi 2004).

A polifenolok (aglikon formában) általában a gazdászervezetet ért stressz hatására képződnek válasz reakcióként (Fereidoon Shahidi 2004, Naczk, Shahidi 2004, Robbins 2003). Ilyenek lehetnek az UV sugárzás, kártevők, oxidatív folyamatok, sérülések, gombák által okozott stressz (Fereidoon Shahidi 2004, Naczk, Shahidi 2004). Az növényi eredetű élelmiszerekben található polifenolok felelnek sok esetben a szín, aroma, kesernyés vagy savanyú íz, illat kialakításáért és a káros oxidációs folyamatok megakadályozásáért (Fereidoon Shahidi 2004, Naczk, Shahidi 2004, Robbins 2003, Abad-Garcia et al. 2007). A polifenolok előanyagai (acetilkoenzim A, aminosavak) általánosan megtalálhatók (Fereidoon Shahidi 2004, Harnly et al. 2007, Robards, Antolovich 1997), de a gének határozzák meg milyen vegyület képződik belőlük. Eloszlásuk a növényben nem egyenletes, az oldhatatlan formák a sejtfalban, míg az oldott formában a vakuólusokban található (Naczk, Shahidi 2004). A hagymaféléket és néhány egyéb kivételt (mint például a cékla) leszámítva szinte csak a növény föld színe fölötti részében található meg (Aherne, O'Brien 2002).

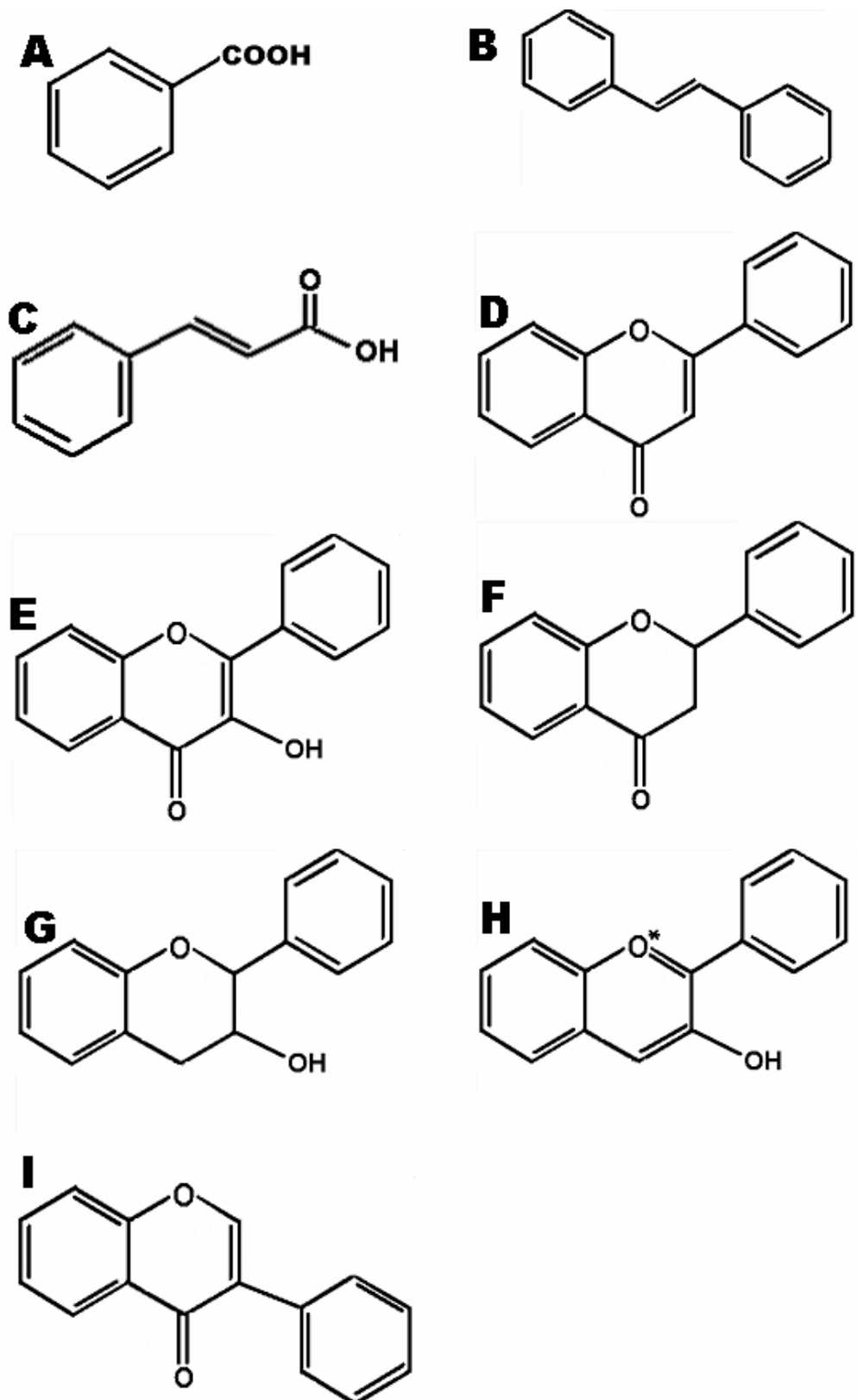
A polifenolok képződését genetikai tulajdonságok (Zimmermann, Galensa 2007), éghajlati körülmények és termesztés technológiai tényezők befolyásolják (Robards, Antolovich 1997, Robbins 2003, Wang et al. 2009).

A polifenolok alkotják a legnépesebb csoportját azon növényi összetevőknek melyek nem minősülnek tápanyagnak. Széles körben elterjedtek, a növényvilágban mindenütt megtalálhatók. Elsősorban a gyümölcsökben, zöldségekben, magokban, virágokban található a növényeken

belül. Ismertek magas polifenol tartalmukról a bogyósok, csonthéjasok, teafélék, almafélék és a különböző hagymák, melyek az emberi táplálkozás fontos részét képezik, és egyes a tradicionális gyógyászatban használt gyógynövény is (Fereidoon Shahidi 2004, Galati, O'Brien 2004, Beecher 1999, Dubber et al. 2005). Több mint egy tucat alosztállyal rendelkeznek melyekbe több száz komponens is tartozhat (de Rijke et al. 2006, Harnly et al. 2007). Ez a szám tovább növekszik ha figyelembe vesszük, hogy az alapvázhoz könnyen kapcsolódnak különböző csoportok például szacharidok és/vagy ezek acilezett változatai. Ezen kívül sokszor előfordul, hogy az alapvázak polimerizálódnak és így alakulnak ki újabb vegyületek. A legjobban feltérképezett csoportok a fenolos savak, a flavonoidok és a polimerizálódott flavonoidok (Harnly et al. 2007). Az eddig leírt flavonoidok és származékaik száma, irodalomtól függően, eléri a több ezret, a fenolos savak számukat tekintve szintén ebbe a kategóriába tartoznak. Ezen kívül számos formájuk megtalálható membránokhoz és egyéb anyagokhoz kötötten oldhatatlan formában. A polimerizálódott flavonoid származékok akár több tíz egységből is állhatnak.

A polifenolok az 1980-as évek óta kerültek az érdeklődés középpontjába mikor epidemiológiai vizsgálatok bebizonyították, hogy a gyümölcsben és zöldségben gazdag étrendnek előnyös az élettani hatása (Harnly et al. 2007, Tripoli et al. 2007). Mára már több tanulmány is beszámolt a polifenolok egészségre gyakorolt pozitív hatásáról. Ilyenek a rákellenes, antiallergén, immunrendszer erősítő, trombózis megelőző, gyulladáscsökkentő, értágító vagy mikroba ellenes tulajdonságok. Antioxidáns tulajdonságaiknak köszönhetően játszanak ilyen szerteágazó szerepet az emberi egészségmegőrzésben. Annak ellenére, hogy számtalan klinikai kísérlet bizonyítja polifenolok egészségre gyakorolt pozitív hatását, még mindig folyik a vita és nincsenek egyértelmű referenciaértékek meghatározva az ajánlott bevitelhez (Harnly et al. 2007, Robards, Antolovich 1997, Aherne, O'Brien 2002).

Ezen tulajdonságaiknak köszönhetően a polifenolokat széles körben alkalmazzák kozmetikumokban, gyógyászatban, gyógyszerészetben vagy adalék anyagként az élelmiszeriparban funkcionális élelmiszerek előállításához (Fereidoon Shahidi 2004, Robards, Antolovich 1997, Valls et al. 2009).



1. ábra Az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló polifenolok fő típusai: A benzoészav származékok, stilbének (B), fahéjsavak (C), flavonok (D), flavonolok (E), flavanonok (F), flavan-3-olok, procianidinek és tanninok (G), antocianinok (H), izoflavonok (I). (Josep Valls et.al nyomán)

2.2. Flavonoidok és fenolos savak bemutatása

A polifenolok, az ebben a dolgozatban alkalmazott logika szerint, két nagy részre oszthatók. Az első ilyen csoport az aglikonok a másik a származékok. Az aglikonok jelentik az egyes vegyületek alapvázát melyről az összes cukorkomponens lehidrolizálódott. Ha ehhez az alapvázhoz valamilyen molekula kapcsolódik azt származéknak nevezzük. Polifenolok esetében ez a legtöbbször valamilyen cukor, de másfajta vegyület is lehet.

2.2.1. Csoportosításuk

A polifenolok definíciója (lásd feljebb) számos vegyületcsoportot és ezen belül számos vegyületet takar melyek fizikai, fiziológiai, kémiai tulajdonságaik igen eltérők lehetnek. Ezen vegyületek csoportosítása az alapvázuk szerkezeti felépítése alapján történik. Az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló aglikonokat az **1. ábra** mutatja be. Aglikonoknak nevezzük a polifenolok azon formáit, melyekhez nem csatlakozik cukor (Aherne, O'Brien 2002). Mint látható minden egyes alapváz tartalmaz egy vagy több fenol gyűrűt, ezekhez csatlakozhatnak különböző funkciós csoportok.

A legegyszerűbb vegyületek a fahéj- és benzoésav származékok. A fahéjsavak esetében alapvázának a felépítése C_6-C_3 (**1/C. ábra**) a benzoésavaké C_6-C_1 (**1/A. ábra**) (Fereidoon Shahidi 2004, Abad-Garcia et al. 2009). A fahéjsavak egy fenil-alaninből keletkeznek oly módon, hogy az ammónium csoport kiválik és a két szénatom egy kettős szénkötéssel összekapcsolódik (Fereidoon Shahidi 2004). A fenol gyűrűhöz hidroxil-csoport kapcsolódásával alakulnak ki a hidroxifahéjsavak. Ilyen vegyületek például a p-kumársav, kávéssav, ferulsav. A különbség a fenol gyűrűn elhelyezkedő hidroxil-csoportok számában és pozíciójában van. A természetben szabad formában ritkán de előfordulnak, inkább az észterei jellemzőbbek. Belőlük szintetizálódnak a fenilpropanoidok melyek többek között a lignánok prekursorai (Fereidoon Shahidi 2004).

Fenilpropanoidokból két szén vesztésével alakulnak ki a hidroxifahéjsavak (Fereidoon Shahidi 2004). Ezek jellegzetes képviselői például a galluszsav, vaníliásav. Szintén megtalálhatók szabad formában a természetben, de ismertek glikozidjaik, észterei, kötött formáik. E két vegyületcsoport dekarboxilezésével keletkeznek az egyszerű fenolok (Fereidoon Shahidi 2004).

Az élelmiszertudományok területén ezt a két csoportot hívják összességében fenolos savaknak, de meg kell jegyeznünk ez nem feltétlenül helyes strukturális, és kémiai szempontból (Fereidoon Shahidi 2004).

Ezekből a vegyületekből származtatható csoport a kumarinok. Ezek gyakorlatilag a hidroxi-fahéjsavak laktonjai. Természetes körülmények között megtalálhatók a növényekben szabad és származékok formájában is (Fereidoon Shahidi 2004).

A stilbének (**1/B. ábra**) olyan polifenolok melyek már nem egy, hanem két fenol gyűrűvel rendelkeznek. Ezek egy fenilpropanoid és három malonil koenzim A molekula egyesüléséből képződnek. Azonban a második fenol gyűrű kapcsolódása után a szénlánc egyik szénatomja kiválik. Ezért, ellentétben a flavonoidokkal itt nem jön létre pirán gyűrű (Fereidoon Shahidi 2004).

A flavonoidok hasonló módon képződnek csak itt nem történik meg a szénatom kiválása, ezért egy kalkonon keresztül létrejön egy úgynevezett harmadik (pirán) gyűrű (Beecher 1999). Ebből kifolyólag a flavonoidok szénvázának a felépítése $C_6-C_3-C_6$ (Robards, Antolovich 1997, Chen, Zuo 2007, Abad-Garcia et al. 2009, Vukics, Guttman 2010). Különbség a pirán gyűrű oxidáltságában és a második fenol gyűrű térállásában van a különböző flavonoid csoportok között (Fereidoon Shahidi 2004).

A flavonok és flavonolok (**1/D és E. ábra**) esetében a C-2-es és C-3-as szénatom között kettős kötés van a különbség köztük annyi, hogy a hármasképző szénatomon egy hidroxil csoport található a flavonolok esetében (Fereidoon Shahidi 2004). Ha a B fenol-gyűrű a C gyűrű kettes szénatomja helyett a hármason helyezkedik el a vegyületet izoflavonnak hívjuk (**1/I. ábra**). Ehhez hasonlóan a flavononok és flavononolok (**1/F. ábra**) közti különbség szintén a hármasképző szénatomon található hidroxil csoport. Ennek a két vegyületcsoportnak a jellegzetessége, hogy a C-2-es és C-3-as szénatom között telített kötés található. További jellegzetesség, hogy a flavononok esetében a második a flavononolok esetében a második és harmadik szénatomon kiralitásközpont található. A természetben mind szabad, mind glikolizált formában megtalálhatók, de az utóbbi forma lényegesen gyakoribb (Fereidoon Shahidi 2004).

Az összes flavonoid közül az antocianinokat és a katechineket gyűjtőnéven flavanoknak hívják. Közös jellemzőjük a karbonilcsoport hiánya a 3-pozícióban (**1/G és H. ábra**). Míg az antocianinok jellemzően vörös, kék, lila színyanyagok addig, a katechinek elsősorban sárga színűek. A katechinek csoportjának másik jellegzetessége, hogy a többi flavonoidtól eltérően, főleg aglikon formában található a természetben (Fereidoon Shahidi 2004, Robards, Antolovich 1997, Aherne, O'Brien 2002).

Ezek mellett előfordulnak még egyszerű polifenolok. Ilyenek a lignánok és ligninnek melyek két fenilpropanoid egység összekapcsolódásából jönnek létre. Ide tartoznak a szuberinek és tokolok is (Fereidoon Shahidi 2004).

A természetben azonban számos esetben találkozunk összetett fenolokkal, melyek több fenolos komponensből épülnek fel (Beecher 1999). Ezeket gyűjtőnévvel tanninoknak hívjuk. Ezek

egyaránt lehetnek oligomerek vagy polimerek. Két nagy csoportra különíthetők el kondenzált tanninokra, melyek oligomer vagy polimer formái a flavonoidoknak elsősorban a flavan-3-oloknak, és hidrolizálható tanninokra melyek glikozilált galluszsavak. Molekulatömegük több ezer Dalton is lehet. A fehérjéket kicsapják a vizes oldatokból, de képesek komplexet képezni bizonyos poliszacharidokkal, nukleinsavakkal és alkaloidákkal. A hétköznapi életben, mint cseranyagok ismertek (Fereidoon Shahidi 2004).

Mint már említettük a természetben, a katehinek kivételével, szabad formában ritkák, jellemzően származékaik fordulnak elő.

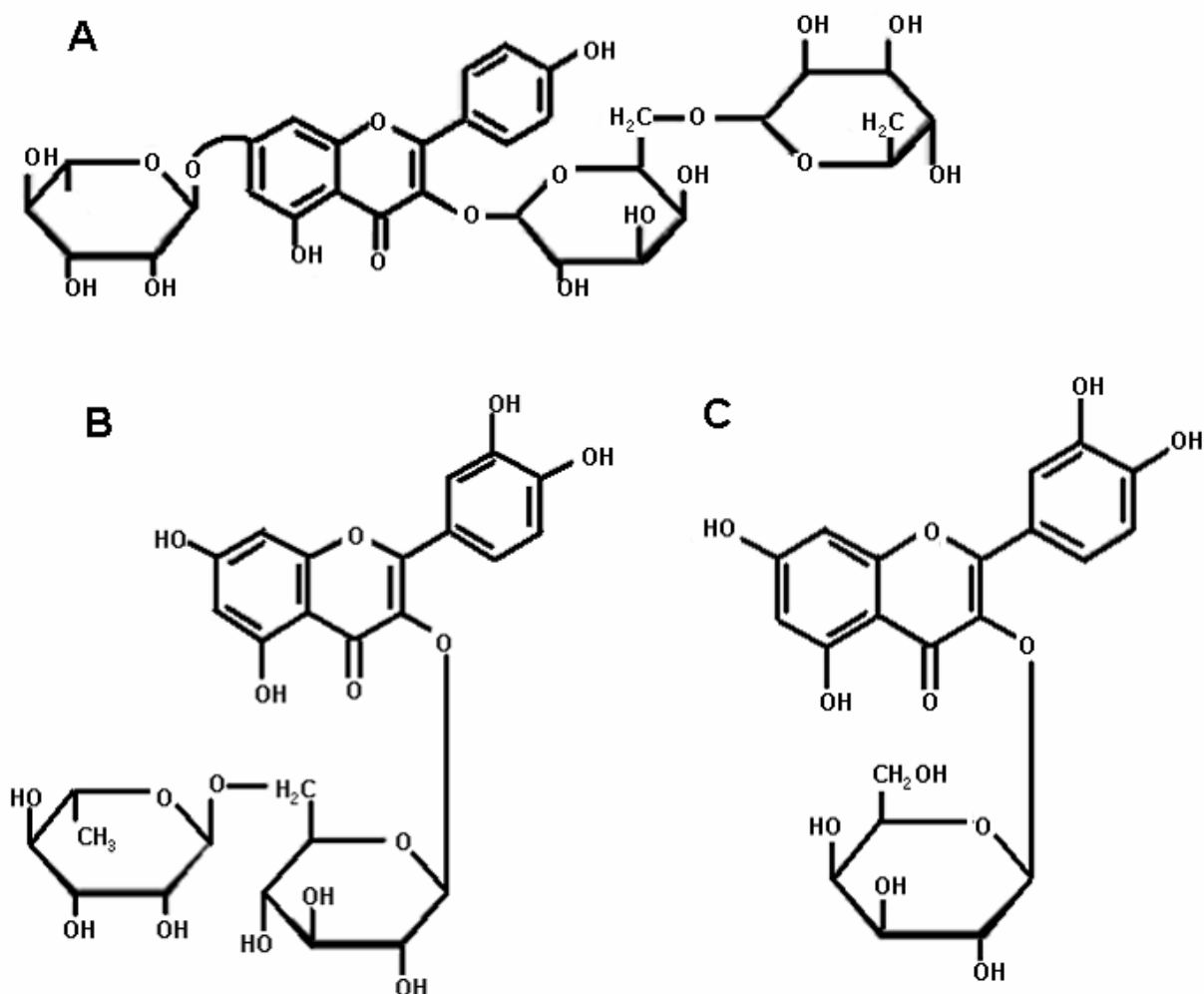
2.2.2. Származékok

A másik nagy csoportja a polifenoloknak, az aglikonok mellett, a különböző származékok. Ezek olyan vegyületek, melyek tartalmazznak egy polifenol alapvázat (aglikont), de emellett valamilyen más molekula is kapcsolódik hozzájuk. A kapcsolódó molekulák az esetek legnagyobb részében különböző cukrok, de lehetnek karbonsavak, acilezett cukrok, metil csoportok, szulfátcsoportok esetleg ezek kombinációi (Beecher 1999, de Rijke et al. 2006). Ilyen származékok elsősorban a flavonoidokra jellemzőek, de fenolos savaknál is előfordulnak. Ha a csatlakozott molekula metilcsoport vagy cukor, az nagymértékben megváltoztathatja az alapmolekula tulajdonságait. Megváltoztathatja a molekula hidrofíliáját, biológiai tulajdonságait és jelentősen növeli a molekula tömeget (Aherne, O'Brien 2002). Ha egy alapvázhoz valamilyen cukorkomponens csatlakozik, azt glikozidnak nevezzük (de Rijke et al. 2006, Aherne, O'Brien 2002).

A legnagyobb mennyiségben előforduló polifenol származékok a különböző flavonoid glikozidok. Például a kempferolnak 214 különböző glikozidját figyelték meg a természetben. Mint már említettük, a katehinek kivételével, a növényi szervezetben a flavonoidok glikolizált formában fordulnak elő. Ez növeli a polaritásukat, ami a stabilitásukhoz szükséges a vakuólusokon belül (Robards, Antolovich 1997). A leggyakoribb származékok az O- β -glikozidok (de Rijke et al. 2006). Ezen vegyületek esetében a cukor komponens a flavonoid alapvázon található valamelyik –OH csoporthoz kötődik glikozidos kötéssel egy víz kilépésével. Léteznek ezeken kívül úgynevezett C-glikozidok, ahol a cukormolekula C-C kötéssel kapcsolódik az aglikonhoz (közvetlenül az alapvázra), de ezek előfordulása nem gyakori (de Rijke et al. 2006, Robards, Antolovich 1997, Vukics, Guttman 2010). C-glikozidokat eddig még csak a 6-os illetve 8-as pozícióban találtak (Abad-Garcia et al. 2009, Cuyckens, Claeys 2004). Elvileg az alapváz valamennyi –OH csoportjára köthet cukor, de van néhány kiemelt pozíciója. Flavonok, izoflavonok, dihidro-flavonok esetében ilyen a

7-es, flavonolok, dihidroflavonolok esetében 3-as és 7-es, antocianinok esetében pedig a 3-as és 5-ös pozíció (Fereidoon Shahidi 2004, de Rijke et al. 2006). A leggyakrabban kapcsolódó cukor a glükóz, de monoszacharidok közül még gyakoribbaknak számítanak a galaktóz, ramnóz, xilóz és arabinóz, míg a fruktóz, mannóz, glükuron és galakturon savak kifejezetten ritkák (Fereidoon Shahidi 2004, de Rijke et al. 2006, Beecher 1999, Robards, Antolovich 1997, Aherne, O'Brien 2002, Abad-Garcia et al. 2009). A monoszacharidokon kívül kétfajta diszacharid is viszonylag nagy gyakorisággal kapcsolódik az aglikonokhoz. Az egyik a rutinóz (6-O- α -L-rhamno-D-glükozid) a másik a neoheszperidóz (2-O- α -L-rhamno-D-glükozid) (de Rijke et al. 2006, Beecher 1999, Robards, Antolovich 1997, Vukics, Guttman 2010, Cuyckens, Claeys 2004). Ezeken kívül még összetettebb cukrok is kapcsolódhatnak (tri- vagy tetraszacharidok), de ezek előfordulása kevés kivételtől eltekintve nem számottevő (Harbaum et al. 2007, Abad-Garcia et al. 2009). Az acilezett cukrok is előfordulhatnak melyeknél az egyik hidroxil-csoportra valamilyen szerves sav kapcsolódik, leggyakrabban ecet- vagy ferulasav (de Rijke et al. 2006, Beecher 1999). Létezik olyan eset is amikor nem csak egy hidroxil-csoportra kapcsolódik valamilyen ligandum vagy szubsztituens, hanem egyszerre többre is. Néhány jellegzetes flavonoid származék látható a **2. ábrán**.

Az eddig leírtakból is egyértelműen kitűnik ezen vegyületcsoport összetettsége mind szerkezeti, mind kémiai téren. Irodalomtól függően az eddig leírt komponensek számát több ezerre becsülik (de Rijke et al. 2006, Galati, O'Brien 2004, Beecher 1999, Harnly et al. 2007, Robbins 2003, Lin, Harnly 2007). Nagy számuk ellenére egymáshoz nagyon hasonló „építőkövekből” épülnek fel. Ezen „építőkövek” száma számottevően kisebb, mint a belőlük felépülő vegyületeké.



2. ábra Néhány jellegzetes flavonoid származék. (A) Kaempferol-3-O-robinoside-7-O-rhamnoside (Robinin), (B) Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin), (C) Quercetin-3-O-galactoside (Hiperozid)
Forrás: internet 1.

2.3. Szerepük

2.3.1. Növényvilágban

A növényvilágban betöltött szerepük és hatásmechanizmusuk nem egységes. Néhány esetben szorosan összefügg az elsődleges anyagcserével, bizonyos esetekben a hatásuk közvetett, alkalmanként közvetlen a növény fejlődésére nézve (Robards, Antolovich 1997). A polifenolok elsődleges szerepe a védekezés a különböző külső vagy belső környezeti stresszhatások ellen. Lehetnek színyanyagok pigmentek vagy aromaképző anyagok (Fereidoon Shahidi 2004, de Rijke et al. 2006, Beecher 1999, Harnly et al. 2007). Az **1. táblázatban** látható egy összefoglaló az egyes polifenolok előfordulásáról és szerepéről.

1. táblázat Polifenolok legfontosabb forrásai és funkcióik. A koncentráció értékek az érett termésre vonatkoznak (Kevin Robards és Michael Antolovich nyomán)

Polifenolok típusai	Jellegzetes képviselők	Jellemző előfordulásuk	Biológiai tulajdonságaik	Koncentráció mg/kg
Hidroxibenzoésavak		Széles körben elterjedtek		1-200
Hidroxibenzoésavak származékai		Széles körben elterjedtek		1-500
Kumarinok		Citrusfélék héjában		2000-7000
Flavonok	Apigenin, Luteolin	Általában citrusfélékben, piros szőlőben, zöldbabban	A virágokban pigmentek, a levelekben az UV sugárzás ellen védik a növényt	
Metoxilált flavonok	Sinensitin	Citrusfélék héjában, és annak olajában		1-10 g/l
Flavonolok	Kvercetin, kempferol, miricetin	Sokféle gyümölcsben és zöldségben megtalálhatók mint például kelkáposzta, spenót, hagyma, petrezselyem	A virágokban pigmentek, a levelekben az UV sugárzás ellen védik a növényt	
Flavanonok	Heszperetin, naringenin	Citrusfélékben általánosan megtalálhatók mint a grapefruit, narancs vagy a citrom		
Flavonol glikozidok	Rutin	Széles körben elterjedtek		2-300
Flavanon glikozidok	Heszperedin, neoheszperidin, naringenin	Citrusfélék	Némelyik keserű íz anyag	1000-5000
Antocianidinek és glikozidjai	Pelargonidinnek és a delphinidinnek a glikozidjai	Színes bogyósok egyéb gyümölcsök	Vörös és kék színezékek	3000-5000 20-500
flavan-3-olok	Katehin, epikatehin, galaktokatehin, epigalaktokatehin	A zöldtea leggyakoribb flavonoidjai de limitált mennyiségben előfordulnak az almában, cseresznyében, körtében		
kalkonok			sárga színezékek	
Ellaginsav(ak) (nem igazi flavonoid de nagyon hasonló) (galluszsav oligomerek)		Előfordul a legtöbb bogyósban és néhány csonthéjasban		

A polifenolok lehetnek színezékek, antioxidánsok, szubsztrátok, hogy csak a legfontosabbakat említsük. Kiemelt szerepük van a növényt ért valamilyen támadás kezelésében, mint az UV sugárzás okozta stressz, a növényi kártevők támadása, oxidatív stressz (Fereidoon

Shahidi 2004, de Rijke et al. 2006, Zimmermann, Galensa 2007, Robards, Antolovich 1997, Valls et al. 2009).

2.3.2. Emberi táplálkozásban

A polifenolok a növényvilág másodlagos metabolitjai az emberi szervezet nem képes előállítani, de egészség megőrző hatásuk miatt fontos a megfelelő mennyiséget fogyasztani belőlük. Az emberi szervezetre gyakorolt hatás szempontjából a mindezidáig legjobban megvizsgált csoport a flavonoidok csoportja. Általában ha a flavonoid bevitelről beszélünk az legtöbbször három flavonolon (kvercetin, miricetin, kempferol) és két flavonon (apigenin, luteolin) alapul (Beecher 1999, Aherne, O'Brien 2002). Ebből kifolyólag a tényleges flavonoid bevitel ettől jelentősen eltérhet. Az elsődleges polifenol források a zöldségek és gyümölcsök valamint az ebből készített italok. A **2. táblázat** mutatja néhány gyümölcs és zöldség, valamint ezekből készített ital kvercetin tartalmát.

Az elsődleges flavonoid forrás, országoktól és azon belül régióktól függően, nagy változatosságot mutat (Beecher 1999, Aherne, O'Brien 2002). Például, amíg Hollandiában, Dániában és az Egyesült Királyságban a legfontosabb flavonoid források a különböző alma és hagymafélék (Robards, Antolovich 1997, Aherne, O'Brien 2002), addig Japánban a zöldtea a domináns, Finnországban pedig a zöldség és gyümölcsfélék (Aherne, O'Brien 2002). Ez a különbség országokon belül is megfigyelhető. Olaszország déli részén a vörösborok, míg az északi részen a zöldségek, gyümölcsök, levesek és saláták az elsődleges flavonoid források (Aherne, O'Brien 2002).

A flavonoidokat elsősorban antioxidánsként, például szabadgyök-fogóként, ismerjük. Ezen kívül tulajdonítanak nekik gyulladásgátló, antiallergén, vérnyomáscsökkentő, antikarcinogén és ízületi gyulladás csökkentő hatását is (Volpi, Bergonzini 2006, Galati, O'Brien 2004, Beecher 1999, Hakkinen, Auriola 1998, Robards, Antolovich 1997, Robbins 2003, Valls et al. 2009, Tripoli et al. 2007, de Brito et al. 2007, Abad-Garcia et al. 2009, Kumar et al. 2009, Luximon-Ramma et al. 2005). In vitro kísérletek bizonyították, hogy a flavonoidok karcinogének. Mindamellett szisztematikus in vivo kísérletek ezt nem támasztották alá, sőt állatkísérletek számos esetben bizonyították ennek ellenkezőjét (Robards, Antolovich 1997). Ennek fő oka általában az, hogy a természetben előforduló mennyiség többszörösét alkalmazzák az ilyen kísérletekben, és elsősorban aglikonok formájában, és nem számolnak azon interakciókkal, amit az egyes vegyületek egymásra gyakorolnak. Ezért ezen kísérleti beállítások legtöbbször csak nagyvonalakban, vagy egyáltalán nem modellezik a természetes körülményeket (Robbins 2003).

Sokszor ezért kapunk az elvártól teljesen ellentéző eredményt. A flavonoidok, mint amilyen a kvercetin is, normális étrendi bevitel esetén nem okoznak semmilyen egészség károsodást (Boots et al. 2008). Mindemellett a flavonoid aglikonok rendelkeznek prooxidáns tulajdonságokkal, ezért alkalmazásuk önmagában terápiás céllal nem javasolt, mert átmeneti fémek jelenlétében fenoxil gyökök keletkezhetnek (Stavric 1994).

A felszívódásuk bizonyos részei a mai napig nincs teljesen tisztázva, de annyi bizonyos, hogy sokféleségüknek köszönhetően nincs egységes felszívódási útvonaluk. Nemtől, kortól, anyagi minőségtől szintén függ a hasznosulásuk. A legjobban abszorbeálódó komponensek az és hidroxibenzoésavak, ezután jönnek a flavanonok, katechin illetve kvercetin glikozidok. A proantocianidinek és az antocianidinek szívódnak fel a legrosszabbul (Aherne, O'Brien 2002).

Az antocianinok a legtöbbet tanulmányozott polifenolok közé tartoznak, a növényvilágban elterjednek számítanak mint vörös és kék színanyagok. Elsősorban piros színű bogyósokban, cseresznyefélékben, gránátalmában találhatók. Elsősorban érzékszervi tulajdonságaik miatt használják az élelmiszeriparban a megfelelő szín kialakításához. Erre a legjellegzetesebb példa a különböző vörösborok. Az utóbbi időben, az élelmiszeriparban, előtérbe került olyan irányú felhasználása mely az egészségre gyakorolt tulajdonságaival függ össze (Valls et al. 2009).

A flavan-3-olok biológiai aktivitásuk széleskörű. Elsősorban erős antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságaik miatt alkalmazzák őket. Funkcionális élelmiszerek előállításához is széleskörűen használják, például mikor teakivonatot adagolnak a különböző italokhoz. A tanninok polimerizált és monomer formában is egyaránt megtalálhatók. Cseranyagok lévén elsősorban a fanyar, kesenyés íz kialakításáért felelősek. A polifenolok fontos szubsztrátjai a polifenol-oxidáz enzimnek, így részt vesz a barnulási folyamatokban (Valls et al. 2009).

Az izoflavonok elsősorban a szójafélékben fordulnak elő. A csontritkulással és a menopauza tüneteivel szemben mutatott védő hatása irányította a figyelmet a szója alapú élelmiszerek előállítására (Valls et al. 2009).

2. táblázat Kvercetin koncentráció néhány zöldségben, gyümölcsben és gyümölcsleiben (S. Aisling Aherne et. al. nyomán)	
Megnevezés	Koncentráció mg/100g
Áfonya	10,5-16
Alma	2-26
Bodza	10,5-24
Brokkoli	0,6-3,7
Cseresznye	0,6-2,4
Endívia	0,1-2,6
Eper	0,6-1
Fehér ribiszke	0,3-2,8
Fejes saláta	0,2-47
Fekete ribiszke	3,3-6,8
Franciabab	3,2-4,5
Káposzta	0,01-0,1
Karfiol	0,1-3,1
Kelkáposzta	1,2-11
Körte	0,3-4,5
Lóbab	2-134
Málna	0,5-2,9
Meggy	2,3-8
Metélőhagyma	10,4-30
Paradicsom, koktél	0,16-40
Póréhagyma	1-2,5
Ribiszke	0,2-2,7
Sárgabarack	2,5-5,3
Szilva	0,9-1,5
Szőlő, fehér	0,2-1,2
Szőlő, vörös	1,5-3,7
Tőzegáfonya	149
Vöröshagyma	18-54
Vöröskáposzta	0,19-0,6
Megnevezés	Koncentráció mg/100ml
Almalé	0,25
Citromlé	0,74
Feketetea	1-1,6
Feketetea, filteres	1,7-2,5
Grapefruitlé	0,49
Narancslé	0,34-0,57
Paradicsomlé	1,1-1,3
Szőlőlé	0,44
Vörösbor	0,2-1,6
Zöldtea	0,11-2,3

2.4. Jelentőségük

Az antioxidánsok de ezen belül még a polifenolok szerepe is ugyancsak összetett, és az ezekből táplálkozó kutatások száma messze meghaladja azt a mennyiséget, amit ebben a dolgozatban feldolgozni lehet. Erre egy példa, hogy az EISZ keresőbe beírva az „Antioxidant” és „review” szavakat a kiadott találatok száma meghaladja a 3000-t. Ebből több mint 2600 az utóbbi tíz évben keletkezett (2010 március). Ezért csak néhány jellegzetes kutatási témát emelnénk ki.

Az egyik ilyen terület az egyszerű feltérképezése a mintában található antioxidánsoknak (Shi et al. 2008), vagy a különböző kezelések, technológiai lépések hatása az antioxidáns tulajdonságokra. Főzés, fagyasztás, tárolás, tartósítás során, hogyan változnak az eredeti nyersanyagra jellemző antioxidáns tulajdonságok és ezzel összefüggésben polifenol tartalom. Széles körben vizsgált terület az emberi és állati fiziológiára gyakorolt hatásuk, mint amilyen a felszívódás, lebomlás, kiürülés, biológiai hozzáférhetőség (Semalty et al. 2010, Bredsdorff et al. 2010, Bothe et al. 2010, Jan et al. 2010, Bolling et al. 2010, Androutsopoulos et al. 2010). Szintén népszerű terület annak vizsgálata, hogy többfajta nyersanyag összekeverése esetén, milyen hatással vannak egymás antioxidáns tulajdonságaira (Ryan, Petit 2010). És persze ezek összehangolt, komplex vizsgálata. De van két olyan nagy terület, ahol kiemelt szerepet kap a különböző polifenolok komponensenkénti meghatározása. Ilyen az eredet azonosítás és az antioxidáns jelleg leírása. Ezekkel részletesebben is foglalkozunk.

2.4.1. Eredet azonosításban

A polifenolok összetételét egy növényben sok külső és belső tényező befolyásolja. Ezek közé tartoznak a genetikai tulajdonságok (Zimmermann, Galensa 2007, Lees 2003, Aherne, O'Brien 2002), éghajlati tényezők, termesztés technológia, feldolgozás (Aherne, O'Brien 2002). A külső tényezők mennyiségi, míg a genetika inkább minőségi különbségeket eredményez.

A polifenolok eloszlása a növényen belül sem egyenletes. Elsősorban a külső szövetekben találhatók, mert sokuk szintézisét stimulálja az UV-sugárzás. Például a kvercetin glikozidok a piros szőlő, az alma a cseresznye a paradicsom héjában akkumulálódnak. De nagy különbségek figyelhetők meg ugyanazon gyümölcs két külön fajtájánál. Például a vastagabb héjú (thick-skinned) szőlőfajtákból készült borok esetében, mint amilyen a Cabernet Sauvignon, magasabb flavonoid koncentrációt mérhetünk, mint a vékonyabb héjú szőlőből készült, például Grenache, borok esetében (Aherne, O'Brien 2002). Használható mézerek eredetének meghatározásához is,

mivel a különböző virágoktól eltérő lesz a polifenol készletük (Zimmermann, Galensa 2007, Truchado et al. 2009, Pyrzynska, Biesaga 2009).

Az évszakok befolyásoló hatása szintén jelentős a polifenol tartalomra nézve. Ez igaz elsősorban a leveles zöldségekre, mint amilyen a fejeskáposzta, póréhagyma. Nyáron a flavonoidok koncentrációja ezekben a növényekben akár 3-4-szer nagyobb lehet, mint a többi évszakban. Ugyanez tapasztalható a paradicsomfélék és különböző bogyósok esetében is. Azonban fontos megjegyezni, hogy flavonoid összetételre nézve nem sikerült kimutatni az évszakok befolyásoló hatását egyik zöldség esetében sem (Aherne, O'Brien 2002).

Az éghajlat és a fényviszonyok szintén befolyásolják a polifenol-koncentrációt. Az enyhe UV-B sugárzás serkenti a polifenolok feldúsulását. Ebből következően az üvegházakban termesztett növények, melyek el vannak zárva UV-sugárzástól, lényegesen kisebb polifenol-tartalommal rendelkeznek, mint a szabad ég alatt termesztettek. Ez megfigyelhető ha összehasonlítjuk a Spanyolországban szabadban termesztett zöldségeket az Egyesült Királyságból származókkal, ahol jellemző az üvegházás növénytermesztés. De ugyanez a jelenség figyelhető meg ha összehasonlítjuk a napos, meleg éghajlaton termesztett szőlőből készült borokat, a hűvösebb éghajlaton termesztett társaikkal. A hőmérséklet nagyban befolyásolja az antocianinok képződését és stabilitását a szőlőben, de ez igaz a borkészítés folyamatára is (Aherne, O'Brien 2002).

Általánosságban elmondható, hogy az érettségi fok növekedésével a polifenol-tartalom, elsősorban a flavonoid származékok mennyisége, növekszik. Az összetételük szintén változik valószínűleg az oxidációra való hajlamuk miatt. Ebből következően a begyűjtésre a legmegfelelőbb idő akkor van, amikor a termés elérte a megfelelő flavonoid összetételt. Például a szőlő esetében, hűvös éghajlati viszonyok között azonnal megtörténik a betakarítás amint a termés elérte a kívánt cukorfokot, hogy elkerüljék az esőzések okozta degradációt. Az ilyen gyümölcsökből készült termékek flavonoid-tartalma kevesebb lesz az elvárhatónál. Az élelmiszerek polifenol tartalmát nem csak a növény hozott paraméterei határozzák meg, hanem a gyártás során használt technológia is (Aherne, O'Brien 2002).

Mint a fent leírtakból kiderült, a polifenolok mennyiségi és minőségi összetételét számos paraméter befolyásolja. Ebből következően a polifenol-összetétel meghatározásával következtetni tudunk az adott termék előéletére, mint például földrajzi eredet, termesztés technológia, fajta, hamisítások felderítése (Dragovic-Uzelac et al. 2005, Lees 2003, Dubber et al. 2005).

Az összes növény rendelkezik egy rá jellemző polifenol mintázattal (Fugel et al. 2005, Lees 2003). A hamisítások leleplezésénél általában ezt az adottságot használják ki. A leggyakrabban az adott terméket valamilyen, lényegesen olcsóbb, alapanyaggal keverik össze. Erre példa a

kajszibarack lekvárok, gyümölcslevek hamisítása almával vagy körtével, narancslé hamisítása grapefruittal vagy feketeribiszke hamisítása szederrel (Fugel et al. 2005, Dragovic-Uzelac et al. 2005, Lees 2003, Tian et al. 2005, Abad-Garcia et al. 2007). De nem csak a növényi nyersanyagokat feldolgozó területeken van ennek jelentősége, például ha hústermékekben izoflavonokat találnak, az utalhat a termék szójafehérjével történő hamisítására. Ezek mellett elmondható, hogy az úgynevezett polifenol ujjlenyomatot használják még borok, citrusfélék levének és olíva olajok eredetének azonosítására.

2.4.2. Antioxidáns jelleg leírásában

A szervezetben természetes úton lejátszódó biokémiai folyamatok során olyan vegyületek keletkezhetnek melyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek. Ezeket hívjuk szabad gyököknek (Cadenas 1989). A párosítatlan elektronszámukból kifolyólag reakcióképességük igen nagy ezért nem túl hosszú életűek. Veszélyességük is ebben rejlik, mert nagyon könnyen reakcióba lépnek a szervezetet felépítő egyéb molekulákkal (zsírsavak, szénhidrátok, fehérjék) és károsíthatják azt (Cadenas 1989). Olyan betegségeknek lehetnek a kiváltó okai, mint a rák vagy keringési, idegi rendellenességek. A szabadgyökök lehetnek oxigén, kén, nitrogén vagy szén központúak (Cadenas 1989).

A szabad gyökök, a terminális oxidációban, természetes körülmények között is keletkeznek az emberi szervezetben, de néhány külső és belső tényező hatására képződésük fokozottabbá válik. Ilyen tényezők lehetnek a kis hullámhosszú elektromágneses sugárzások (UV, radioaktív sugárzás), szmog, dohányfüst, alkoholfogyasztás, munkahelyi vagy otthoni stressz, különböző vegyi anyagok (Benzie 2000, Toporcov et al. 2004). Lévnél keletkezésük az emberi szervezetben, bizonyos mértékig, normálisnak tekinthető, rendelkezünk megfelelő védelmi rendszerrel. Ez egy bizonyos szintig képes ellátni a szervezet védelmét (Benzie 2000). Azokat a vegyületeket, melyek képesek csökkenteni vagy megakadályozni a szabadgyökök által okozott oxidatív stresszt, antioxidánsoknak nevezzük (Halliwell, Gutteridge 1995). Ezek a vegyületek kisebb mennyiségben vannak jelen, mint az oxidálandó szubsztrát. Az emberi antioxidáns hálózat legfontosabb elemeit a **3. táblázat** tartalmazza.

3. táblázat. Az emberi antioxidáns hálózat legfontosabb elemei (Cornetti után)

funkció/szerkezet/szerep	példa
vitaminok	E-, C-, A-vitamin, riboflavin, niacin, nikotinamid
zsírok	ω -3, ω -6 zsírsavak
aminosavak, tiolok	hisztidin, glicin, glutamin, cisztein, taurin N-acetil-cisztein
fehérjék, enzimek	albumin, transzferin, bilirubin, kataláz, peroxidáz, szuperoxid dizmutáz
növényi metabolitok	polifenolok-flavonoidok, karotinoidok-likopin-lutein
ásványi anyagok	cink, vas, réz, szelén
anyagcsere termékek	hugysav, liponsav

A felsorolt antioxidánsok szerepük szerint két nagy csoportra oszthatók: 1, láncreakció megszakító vagy elsődleges antioxidánsokra, 2, védő vagy másodlagos antioxidánsokra. A polifenolok ez utóbbi kategóriába tartoznak (Apak et al. 2007).

Antioxidáns tulajdonságaikat több tényező befolyásolja. Ilyenek az -OH csoportok száma, elhelyezkedése, az orto 3',4' -dihidroxi része a B gyűrűnek, az A gyűrű meta-5,7-dihidroxi-szerkezete (ez a fém kelát képzésben játszik szerepet), a B gyűrű esetében a ketol szerkezet, a C gyűrű 4-keto-, 3-hidroxi- vagy 4-keto-5-hidroxi-szerkezete (RiceEvans et al. 1997). Ezekkel összefüggésben rendelkeznek (Lees 2003):

- Gyökfogó képességgel
- Hajlamosak kelátképzésre fémionokkal a prooxidáns hatás kivédésére
- Enzim interakciókra. Ezzel csökkentik egyes betegségek kialakulásának kockázatát
- Daganatok és sejtburjánzások gátlása
- Antivirális hatással

2.5. Szelektív polifenol-analitikai módszerek

Ha a polifenolok analitikai meghatározásáról van szó alapvetően három nagy csoportot különböztetünk meg aszerint, hogy mi az analízis célja (de Rijke et al. 2006).

I) Az első az úgynevezett totál (összes) polifenol mérő módszerek, ahol nem egy kifejezett vegyületet meghatározása a cél hanem, egy vonatkoztatott mértékegység segítségével, a mintában fellelhető összes polifenolos komponens együttes meghatározása. Ilyen például a spektrofotometriás úton történő meghatározását $\lambda=760$ nm-en Folin-Ciocalteu reagens használatával. Ebben az esetben eredményeket mg galluszsav/g adják meg (Bilbao et al. 2007, Robards, Antolovich 1997, Naczki, Shahidi 2004, Robbins 2003).

II) A második csoport az úgynevezett célkomponens módszerek, ahol egy vagy több előre kiválasztott komponens minőségi és mennyiségi paramétereire vagyunk kíváncsiak.

III) A harmadik nagy csoport az úgynevezett kereső módszerek, ahol a mintában fellelhető, előre meg nem határozott, komponenseket keressük. Részletesebben az utolsó kettővel foglalkozunk.

2.5.1. Célkomponens módszerek és kereső (profilozó) módszerek jellegzetességei

A célkomponens módszerek és a nem-célkomponensek meghatározását is célul kitűző kereső (profilozási) módszerek közötti alapvető különbség, hogy az előbbinél előre meghatározott alkotókat vizsgálunk, melyek azonosításához referenciaanyagokat (preparált, szintetizált standard anyagokat) használunk. Ilyen módszerek esetében a minta-előkészítési és analitikai eljárások is jól igazodnak a meghatározandó alkotók (célkomponensek) tulajdonságaihoz, jellegzetességeihez (Naczk, Shahidi 2004). Ezzel ellentétben a kereső (profilozási) módszerek esetén a mintában megtalálható polifenol készlet minél teljesebb körű feltérképezése a cél. A meghatározandó alkotók köre nincs előre definiálva, így azok azonosítása nem referenciaanyagokhoz történő viszonyítás alapján történik (retenciós idő, spektrum képek stb.), és sok esetben az is előfordul, hogy a mintában megtalált esetleges komponens standardként nem beszerezhető (Chen et al. 2007, Ding et al. 2008, Chen, Zuo 2007, Lin, Harnly 2007). A profilozó módszerek jellemzője, hogy elsősorban korábban elvileg ismert polifenol alkotók kimutatása a céljuk, de oly módon, hogy nincs előzetes ismeretünk arról, hogy az elvileg fellelhető alkotók csoportjából melyik fordul esetleg elő az adott mintában. A profilozási módszerek további sajátága, hogy elvileg alkalmasnak kell lenniük olyan korábban ismeretlen polifenol alkotók kimutatására is, melyek létezéséről nem volt korábban tudomásunk. Ugyanakkor, az ilyen feltételeken azonosított alkotók kétséget kizáró igazolása általában már nem a polifenol profilozás része.

A profilozási módszerek lényege, hogy egy méréssel minél több komponenst tudjuk elkülöníteni és meghatározni egy mintából (Harnly et al. 2007, Lin, Harnly 2007). Ez lehet az első lépés egy bonyolult analitikai procedúrának, melynek a célja feltérképezni a mintában található ismert és ismeretlen komponenseket. Az ideális profilozó módszer a következőképpen néz ki: olyan egyszerű, amennyire csak lehetséges, az összes jelenlévő komponenst detektálni lehessen vele, a lehető legtöbb információt szolgáltatassa az adott csúcsról (azonosítás, szerkezeti felépítés, mennyiségi meghatározás, stb.), és ezeket mind egy kromatográfiás futtatáson belül. És mindezt lehessen standardizálni. A valóságban ez persze nem lehetséges, egy kromatográfiás futtatáson belül csak egyi-másik kritérium teljesülhet (Harnly et al. 2007).

Az első olyan módszereket, melyeket már profilkészítésre használtak a múlt század kilencvenes éveinek első felében publikálták. A minta-előkészítés általában egy egyszerű MeOH-os extrakcióból és savas hidrolízisből állt. Az alkalmazott mérőrendszer LC-DAD készülék volt. Ezek segítségével általában csak aglikonokat lehetett meghatározni, de egy-két esetben kifejlesztettek olyan eljárásokat, melyek segítségével különböző származékokat is meg lehetett határozni. Ez utóbbi esetben azonban mindig szükség volt az adott származék standardjára vagy egy második kromatográfiás futtatásra a hidrolízis után. A századforduló óta azonban az MS-sel történő detektálás került előtérbe. Egy profilozási módszer speciális analitikai lépéseket igényel (Harnly et al. 2007). Ezeket vesszük sorra.

Az első, és mondhatni a legfontosabb lépés, az extrakció. A fő különbség a célkomponens módszerekhez képest, hogy a kivonás során arra törekszünk, hogy minél jobban megőrizzük a mintára jellemző polifenol összetételt. Ez általában csak enyhe minta-előkészítést tesz lehetővé, ami feltételezi, hogy a komponensek nincsenek kovalens kötéssel kötve a mátrixhoz (Harnly et al. 2007). Ez jellemző a flavonoidokra és azok polimerjeire de a fenolos savakra nem. A másik fontos kritérium az extrakció során elkerülni a különböző kémiai mellék reakciókat, mint az oxidáció vagy a polimerizáció (Harnly et al. 2007).

A következő lépés az elválasztás. Az elválasztás ebben az esetben is a polaritás különbségen alapszik, de a kereső módszerek esetében jellemző a nagyobb időigény (kisebb gradiens), lévén nem tudjuk előre milyen mennyiségű és minőségű komponens található a mintában (Harnly et al. 2007).

A detektálásra manapság leggyakrabban MS/MS rendszereket használnak a vegyületek azonosításához (de Rijke et al. 2006, Ding et al. 2008). Ez lehetővé teszi az egyes molekulák fragmentálását, és a keletkező fragmensekből következtetni lehet a molekula szerkezetére. Ugyanakkor, ilyen készülékek esetében, lehetőség van a polaritás és az ionizációs potenciál változtatására is. Így lehetőség nyílik a negatív és pozitív ionizációs módban felvett spektrum vizsgálatára is. Az alacsony ionizációs energia az anyaiion meghatározására, a nagy pedig a fragmensek létrehozására szolgál. Sajnos ez az úgynevezett multisignal mode rontja a jel/zaj arányt lévén egy tömegszámra kevesebb idő jut (ennek a problémának taglalását lásd később). Ily módon lehetőség nyílik egy csúcsból azonosítani az aglikont, a számát és a típusát a kapcsolódó molekuláknak és azok lokalizációját (Harnly et al. 2007).

2.5.2. Minta-előkészítési technikák

Egy analitikai meghatározás első lépése a laboratóriumban a minta-előkészítés. Ez, mondhatni, a legkényesebb pontja a mérésnek, hiszen ha itt valami hiba történik azt a későbbiek során már nem tudjuk korrigálni (Tura, Robards 2002, Abad-Garcia et al. 2007). A minta-előkészítést döntően az elemzés célja befolyásolja. Milyen célkomponenseket keresünk, monitorozni akarjuk-e a polifenol készletet, a szabad és/vagy kötött formákra vagyunk kíváncsiak, a származékok érdekelnek vagy csak az aglikonok, és persze nagymértékben befolyásolja a vizsgálandó minta mátrixa. Ezen feltételek összessége határozza meg a minta-előkészítés összetettségét. Ez a procedúra lehet egylépéses (például egy egyszerű szűrés folyadék minták esetében) (Robards, Antolovich 1997, Robbins 2003), de sokszor több előkészítő lépés követi egymást (például extrakció – bepárlás – visszahígítás – szűrés elsősorban szilárd minták esetében) (Tura, Robards 2002, Chen et al. 2007, Hakkinen, Auriola 1998, Robbins 2003). Az egyszerű minta-előkészítés nagy előnye, hogy kevésbé torzítja el a mintára jellemző eredeti polifenol mintázatot, ennek a jelentősége a kereső/profilozó módszerek esetében meghatározó (Harnly et al. 2007). Fő hátránya, hogy a kötött, rosszul vagy egyáltalán nem oldódó formákat nem lehet ilyen módon oldatba vinni. Ezért jelentősen behatárolt azon komponensek mennyisége és minősége melyek így mérésre alkalmas állapotba kerülnek. A bonyolultabb minta-előkészítési technikák segítségével ellenben a vizsgált komponensek szélesebb skáláját lehet kivonni, beleértve a kötött és oldhatatlan formákat is, mind mennyiségi mind minőségi szempontból (Robbins 2003). Ez a célkomponens módszerek esetében döntő fontosságú. Például mások az optimális minta-előkészítési paraméterek fenolos savak, flavonoidok vagy ezek származékainak szabad és/vagy kötött formáinak vizsgálata esetén. Ebből következően a megfelelő minta-előkészítés megválasztásával ki tudjuk szelektálni azon vegyületcsoportokat, melyeket vizsgálni kívánunk (Robards, Antolovich 1997). A szükségesnél bonyolultabb minta-előkészítés alkalmazása azt a veszélyt is magába rejti, hogy esetleg olyan káros mellék reakciók is lejátszódnak melyek rontják a mérés hitelességét. Mint már említettük ez a profil készítésen alapuló módszerek esetén döntő fontosságú, hogy a vizsgált extraktum minél jobban reprezentálja a minta eredeti összetételét.

Némely minta esetében alkalmazható az úgynevezett direkt mérés, ahol nincsen minta-előkészítés (Tura, Robards 2002). Ebben az esetben változik a legkevésbé a minta polifenol összetétele, de tudnunk kell, hogy ez nem mindig célravezető ugyanis nagymértékben terheli a mérőrendszert. Ebből kifolyólag még az ilyen típusú minták esetében is célszerű alkalmazni valamilyen egyszerű előkészítő műveletet, mellyel csökkenteni tudjuk a minta mátrixának a hatását. A legegyszerűbb minta-előkészítési eljárások a szűrés, centrifugálás és/vagy hígítás. Ez

értelemszerűen csak folyékony minták esetében alkalmazható. Ezeket gyakran alkalmazzák borok, gyümölcslevek, esetleg olajok esetében (Tura, Robards 2002, Robards, Antolovich 1997, Robbins 2003). Bármennyire is egyszerű lépések ezek, ha nem megfelelő körültekintéssel végezzük őket, torzíthatják az eredményt. Például szűrés során maga a szűrő is megköthet valamennyit az értékes anyagokból, vagy hígítás esetén rossz oldószert választva kicsapódhatnak azok. De a legtöbb minta ettől lényegesen összetettebb minta-előkészítést igényel.

Az első lépésben a vizsgálandó mintán általában valamilyen feltárást alkalmaznak, hogy megkönnyítsék a későbbi extrakciót. Döntő többségében növényi mintákról lévén szó ez általában szárítást és porítást jelent (ez a lépés a minta homogenitás miatt is szükséges) (Li et al. 2007, Vukics et al. 2008). Némely esetben azonban egyből a friss mintából történik a kivonás (Robards, Antolovich 1997).

A megfelelő feltárást után általában valamilyen extrakciós eljárás következik. Ezt alapvetően a minta állaga (szemcseméret, halmazállapot), és a kinyerni kívánt komponensek köre határozza meg. A leggyakrabban vizet vagy valamilyen szerves oldószert használnak a kinyeréshez. A legnépszerűbbek az etanol, metanol, aceton, acetonitril, etil-acetát és/vagy ezeknek a kombinációi (de Rijke et al. 2006, Dragovic-Uzelac et al. 2005, Chen et al. 2007, Truchado et al. 2009, Li et al. 2007, Harnly et al. 2007, Hakkinen, Auriola 1998, de Brito et al. 2007, Wang et al. 2009, Harbaum et al. 2007) de ritkábban előfordul más oldószer is, mint a kloroform vagy N,N-dimetilformeid (DMF), etiléter (Chen, Zuo 2007), esetleg szuperkritikus állapotú széndioxid (Naczk, Shahidi 2004, Robbins 2003). Ez történhet egy vagy több lépésben, lehet segíteni a hőmérséklet emelésével, ultrahangos fürdővel, sima rázatással (Lin, Harnly 2007, Tian et al. 2005). Az időtartama általában 1 perc és 6 óra között változik, de lehet akár 24 óra is. Ettől többet nem célszerű alkalmazni, mert nem kívánt változások mehetnek végbe a vizsgálni kívánt vegyületek szerkezetében, például megnő az esélye a nem kívánt oxidációs folyamatoknak (Harnly et al. 2007, Naczk, Shahidi 2004, Robbins 2003). A nem kívánt változások elkerüléséhez több módszert is lehet alkalmazni, ilyenek az inert atmoszférában történő minta-előkészítés, antioxidánsok adagolása, fénytől való védelem, vákuum alatt történő előkészítés (Dragovic-Uzelac et al. 2005, Harnly et al. 2007, Hakkinen, Auriola 1998, Wang et al. 2009, Ferreres et al. 2008, Herrera, de Castro 2005, Hollecker et al. 2009). Ha azon polifenolokra vagyunk kíváncsiak, melyek oldhatatlan és/vagy kötött formában vannak jelen a mintában, valamilyen hidrolizációs eljárással fel kell őket szabadítani (Tura, Robards 2002, Harbaum et al. 2007). Ezek leggyakrabban valamilyen szervesetlen savas (például sósavas) vagy lúgos (például nátrium hidroxidos) kezelés (de Rijke et al. 2006, Hakkinen et al. 1999, Jin et al. 2008), de lehet enzimes eljárás is (Tura, Robards

2002, Robards, Antolovich 1997). Ezen eljárások milyenségét elsősorban az határozza meg, hogy mely kötött formákat kívánjuk felszabadítani.

Akármilyen eljárást is alkalmazunk, a végeredmény minden esetben valamilyen elegy lesz, amely számos vegyületet tartalmaz (zsírok, zsírsavak, viaszok, polifenolok, terpének stb.) (Robards, Antolovich 1997, Naczk, Shahidi 2004). Ezeknek csak egy része az, ami a mérés szempontjából fontos komponens, a többi nem lényeges vagy kifejezetten káros is lehet a meghatározásra nézve. Számos tisztítási eljárás létezik, amelyekkel a nem kívánatos komponensek jelentős részét el tudjuk távolítani.

A tisztítási eljárások során általában egy szilárd hordozón megkötik a vizsgálni kívánt komponenseket. A megkötés alapulhat ioncserén, polaritáson stb., lehetnek normál, de leggyakrabban fordított fázisúak. Anyagukat tekintve leggyakrabban gyanták vagy szilikon alapúak (Robards, Antolovich 1997). Jellegzetesen ilyen technikák a szilárd fázisú extrakció (SPE) (de Rijke et al. 2006, Harnly et al. 2007, Robards, Antolovich 1997, Naczk, Shahidi 2004, Abad-Garcia et al. 2007, Suarez et al. 2008, Hollecker et al. 2009). Az állófázis minőségét a meghatározni kívánt komponensek tulajdonságai határozzák meg (fenolos savak, flavonoidok, származékok, polimerizálódott fenolok). Az állófázist, amin már meg vannak kötve kívánt anyagok, először valamilyen poláros oldószerrel mossák át, ez leggyakrabban víz, ami tartalmazhat valamennyi szerves savat, hogy a szacharidok és a hozzájuk hasonló komponenseket eltávolítsák. Ezután valamilyen szerves oldószerrel vagy oldószer elegyvel a polifenolokat távolítják el a töltetről (Naczk, Shahidi 2004, Ferreres et al. 2009). Itt is meghatározó szerepe van a szerves oldószer anyagi minőségének, pH-jának (Robbins 2003). A lemosó folyadék összetételének változtatásával frakciók szedése is lehetséges (Harnly et al. 2007, Vukics et al. 2008). Így az egyes frakciók a vizsgálni kívánt komponensek más-más csoportját fogják tartalmazni. A lemosás azonban sohasem lesz tökéletes, valamennyi anyag rajtamarad az állófázison. Ezt hívják adszorpciós veszteségnek. Ezért fontos paraméter az állófázis kiválasztása során az anyagra jellemző visszanyerhetőség. Ezeken kívül még gyakran alkalmazott tisztítási eljárás, polifenolok esetében, az úgynevezett ellenáramú kromatográfia (Counter-current chromatography, CCC.) (Naczk, Shahidi 2004, Valls et al. 2009).

Ennek az eljárásnak a lényege, hogy két, egymással nem elegyedő, ellentétes polaritású folyadékot egy hosszú csőben egymásnak ellentétes irányba áramoltatnak. Általában használnak egy kiegészítő folyadékot, amely mind a két fázissal elegyedik. Az egyik folyadék az álló a másik folyadék a mozgófázis szerepét tölti be. Ennek a módszernek a nagy előnye a szilárdfázisú preparatív technikákkal szemben, hogy gyakorlatilag alig van adszorpciós veszteség, az egész anyagmennyiség visszanyerhető (Valls et al. 2009).

Ezekon kívül léteznek egyéb minta-előkészítési/tisztítási technikák, mint a szuperkritikus folyadék extrakció (SFE), a szilárdfázisú mikro extrakció (SPME) vagy a nagynyomású folyadék extrakció (PLE), melyek szintén helyet találtak maguknak a polifenol analitikában (Cuyckens, Claeys 2004).

2.6. Elterjedt műszeres meghatározási módszerek, eltérő megközelítések

2.6.1. Elválasztás technikák

A legelterjedtebb módszer a különböző polifenolok elválasztására az úgynevezett nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (a továbbiakban HPLC) technika (Robbins 2003). Az irodalomban túlnyomó többségében olyan cikkeket találunk, ahol fordított fázisú oszlopot használnak, C8-as és C18-as okat egyaránt (Dragovic-Uzelac et al. 2005, Truchado et al. 2009, Jin et al. 2008, Volpi, Bergonzini 2006, Li et al. 2007, Harnly et al. 2007, Naczk, Shahidi 2004, Dubber et al. 2005). De ennek ellenére kisebb mértékben más típusú oszlopok is használatosak, mint például szilika, Sephadex vagy poliamid alapúak. Az oszlopok belső átmérője 2.1 és 5 mm között változik de leggyakoribb a 4.6 mm-es. Hosszuk általában 50-300 mm (Robbins 2003). Az átlagos töltetátmérő 3-5 μm közötti (Robbins 2003), de az utóbbi időben megjelentek az úgynevezett nagyfelbontású oszlopok, melyek töltetátmérője 2 μm alatti (Klejdus et al. 2007). Sok esetben előtétoszloppal vagy belső szűrővel védik az oszlopokat a bekerülő szennyeződések ellen (Robbins 2003). Az általánosan alkalmazott elválasztási eljárás a gradiens elúció (Robbins 2003, Zhang et al. 2007, Chen, Zuo 2007, de Brito et al. 2007, Ferreres et al. 2008, Tian et al. 2005, Luximon-Ramma et al. 2005). Ezt egy bináris pumparendszer mozgatja, és az összetételét tekintve egy szerves és egy vizes fázisból áll (Zhang et al. 2005). Gradiens elúció alkalmazása esetén, a mérés során a mozgófázis összetétele változik az idő függvényében. Attól függően, hogy normál vagy fordított fázisú kromatográfiáról van szó, a vizes vagy a szerves eluens aránya nagyobb a kromatográfia elején. Ez a mérés során folyamatosan csökken, és a mérés végére a másik fázis kerül túlsúlyba. A szerves fázis leggyakrabban acetonitril vagy metanol (Chen et al. 2007, Bilbao et al. 2007, Truchado et al. 2009, Jin et al. 2008, Harnly et al. 2007), de egyéb másik szerves oldószer is lehet, mint például butanol, propanol, etilacetát. Azonban a legtöbb esetben nem lineáris profilú gradienst alkalmaznak, hanem attól jóval bonyolultabbakat anélkül, hogy ennek az okára magyarázattal szolgálnának. Az esetek többségében ezek tartalmaznak valamilyen puffert vagy szerves savat a pH beállításához és/vagy az ionizáció elősegítéséhez (Truchado et al. 2009, Naczk, Shahidi 2004, Maul et al. 2008, Zhang et al. 2007, Herrera, de Castro 2005). A

leggyakoribb pufferek acetát vagy formiát alapúak (Bilbao et al. 2007, Volpi, Bergonzini 2006, Naczk, Shahidi 2004), a foszfát alapúak nem terjedtek el széles körben, mert kontaminációt okozhatnak ha MS detektálást alkalmaznak. Az áramlási sebesség szintén anyagi minőségtől függően 0,15-1,8 ml/perc lehet (Robbins 2003). Az injektált mennyiség, általában az oszlop méreteinek függvényében, 3-50 µl lehet (Bilbao et al. 2007, Li et al. 2007). Az elválasztás nem igényel különleges hőmérsékleti beállításokat, szobahőmérsékleten is működik, de a futtatás lerövidítése végett az oszlopot gyakran 40⁰C körüli hőmérsékletre termosztálják (Maul et al. 2008, Zhang et al. 2007, Dubber et al. 2005). Ennek másik előnye, hogy szabályozott hőmérsékleti körülmények között a futtatás ismételhetősége javul. Abban az esetben, ha a kísérlet célja a mintában található fő polifenolok meghatározása, a kromatográfia időtartalma tizenegynéhány perctől több óráig is terjedhet (Robbins 2003). Abban az esetben, ha a minta polifenolos komponens összetételének a feltérképezése a cél ez az idő jóval hosszabb is lehet. Az elválasztás időtartalmát erősen befolyásolja az átlagos töltetátmérő, minél kisebb, annál kisebb a kromatográfia időigénye. Több komponens megfelelő elválasztásához több idő kell. Mindemellett létezik még néhány kevésbé frekvenciált technika, mint amilyen a gázkromatográfia vagy a kapilláris elektroforézis (Naczk, Shahidi 2004, de Rijke et al. 2006).

Gázkromatográfiás (továbbiakban GC) módszereket a 60-as évek óta használják flavonoidok meghatározására, de a folyadékkromatográfiás (továbbiakban LC) módszerek hátérbe szorították őket (de Rijke et al. 2006). Ugyan a GC módszerek nagyobb érzékenységgel és kisebb kimutatási határral rendelkeznek, de jóval munkaigényesebbek mert a származék képzés elkerülhetetlen a megfelelő ionizáció és hő stabilitás eléréséhez (Hakkinen, Auriola 1998, de Rijke et al. 2006, Cuyckens, Claeys 2004). Ez általában metilálást jelent leggyakrabban trimetilszilillel (TMS). Azonban ha egy flavonoid több mint egy hidroxil-szubsztituenssel rendelkezik, akkor a metiláció során többfajta származék keletkezik, ami nagyban megnehezíti a kvantifikálást. Az elválasztási beállítások nem változtak sokat az 1960-as évek óta. Általában apoláros oszlopokat használnak. Az injektálás úgynevezett split vagy splittess módban történik, az elválasztáshoz 30-90 percig terjedő fűtőprogramot használnak 300 °C fölött. Általában metablizáció, antioxidáns aktivitás vagy taxonómiai vizsgálatokra használják (de Rijke et al. 2006).

Szintén használatos, bár kevésbé elterjedt módszer a kapilláris elektroforézis (CE). Általában foszfát vagy borát puffereket használnak a mérésekhez, a kapillárisok 50-100 µm átmérőjűek a feszültség 10-30 kV és az injektált mennyiség 10-50 µl. A detektor lehet UV, fluoreszcenciás vagy MS (de Rijke et al. 2006).

2.6.2. Detektálási módszerek

A széles körben alkalmazott detektálási eljárások közül az egyik legelterjedtebb az UV abszorpción alapuló módszer (de Rijke et al. 2006, Robbins 2003, Lin, Harnly 2007). Az összes polifenol komponens rendelkezik legalább egy fenolos gyűrűvel, ezért az UV fény bizonyos tartományában elnyelési maximummal rendelkeznek. Flavonoidok esetében, lévén kettő gyűrűvel rendelkeznek, kevés kivételtől eltekintve, legalább két elnyelési maximum található. Az első a 240-285 nm-es tartományba esik a másik a 300-550 nm-ig terjedőbe (de Rijke et al. 2006). A gyűrűkhöz kapcsolódó egyszerű szubsztituensek, mint a metil csoport, a hidroxil csoport nem tolják el jelentősen az abszorpciós maximumot. Az UV detektáláson alapuló módszerek több tíz éves múltra tekintenek vissza. Manapság az egyik legnépszerűbb technika aglikonok mennyiségi meghatározására. Diódasoros detektálással kiegészítve screening módszereknél az aglikon mennyiségi azonosításához és/vagy a szubsztituensek előzetes feltérképezésére is alkalmassá tehető. Általánosságban elmondható, hogy segíthet az egymáshoz kapcsolódott csoportok azonosításában, mint amilyenek az aglikonok, a glikozidok, a glikozid-malonátok és esetleg az acilált glikozidok. Sajnos azonban meg kell jegyezni, hogy az olyan alkotók, mint a glikozidok vagy ezek acilezett változatai nem túl kromofórok, ezért nem könnyű őket ily módon megkülönböztetni. Az eddigi tapasztalatokból azonban két dolog leszűrhető: 1, az egyes flavonoid csoportokat el lehet különíteni egymástól DAD-UV detektálás segítségével, ami fontos kiegészítő módszer lehet egy szerkezet meghatározó eljárás során (de Rijke et al. 2006) 2, elég kevés számú hullámhosszon mérni a sikeres monitorozáshoz (az információvesztés, amit a nem teljes mértékben optimált hullámhosszok figyeléséből ered elfogadható mértékű). A kimutatási határ néhány ng/g-os nagyságrendbe esik.

Kevésbé elterjedt módszerek közé tartoznak a fluoreszcenciás detektáláson alapuló eljárások (de Rijke et al. 2006, Robbins 2003). Használatuk esetlegességének fő oka, hogy az ily módon mérhető komponensek száma nagymértékben limitált. Azonban UV-detektálással kombinálva lehetőséget ad olyan koeluálódott vegyületek megkülönböztetésére, melyek közül az egyik detektálása lehetséges fluoreszcenciával a másiké nem. Azokat a flavonoidok lehet ezzel a módszerrel detektálni, melyek rendelkeznek –OH csoporttal a 3. pozícióban (de Rijke et al. 2006).

Az összes flavonoid rendelkezik elektrolaktivitással, ezért elektrokémiai detektálási (továbbiakban ED) módszerekkel is lehet őket mérni (de Rijke et al. 2006, Robbins 2003). Természetesen a szelektivitása alacsonyabb mint a fluoreszcencia technikáké, de a kimutatási határ alacsonyabb. Az összes flavonoid két maximummal rendelkezik. Az első a B gyűrű oxidációs állapotával van összefüggésben a második a kevésbé oxidálható fenolos csoporttal. ED vel történő

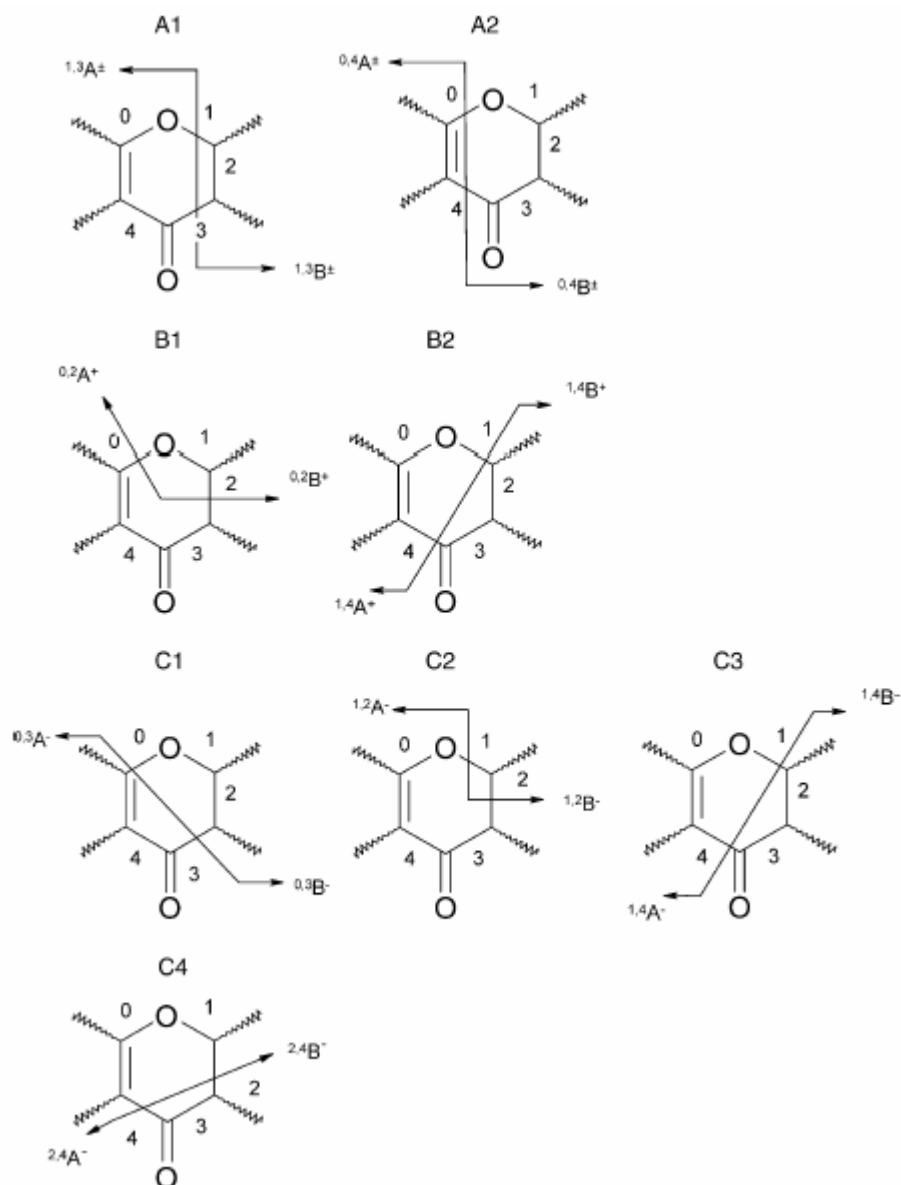
detektálás esetén nem található azonban egyértelmű lineáris kapcsolat az antioxidáns kapacitás és a mért jel között. Ennek elsődleges oka, hogy ezen tulajdonságok kialakításában sok különböző csoportnak van szerepe. Erre jó példa a 3-as hidroxil-csoport glikolizálása után az antioxidáns/gyökfogó kapacitás csökken, de az elektrokémiai viselkedésük nem változik (de Rijke et al. 2006).

Napjainkban a tömegspektrometria képezi a detektálási technikák csúcsát. Két nagy csoportra bonthatók. Az első az egyszerű tömegspektrométerek (MS) a másik az úgynevezett tandem készülékek (MS/MS vagy MSⁿ). Ez utóbbi szerkezet azonosításra is alkalmassá tehető (de Rijke et al. 2006, March et al. 2006, Lin, Harnly 2007, Kumar et al. 2009, Vukics, Guttman 2010).

Polifenolok meghatározása esetén, csakúgy mint más területeken, a légköri nyomáson ionizáló (továbbiakban APCI) és elektro spray ionizációs (továbbiakban ESI) ionforrásokat használnak a leggyakrabban. Bár az ESI frekvenciáltabb helyet foglal el a flavonoid analitikában, az APCI is szert tett bizonyos méretű népszerűsége, mert bizonyos esetekben jobb eredményeket szolgáltat. Ezeken kívül létezik még számos más elven működő ionforrás, mint az elektronütközéses ionizációs (EI), kémiai ionizációs (CI), gyors atom bombázás (FAB), mátrix segített lézer ionizáció (MALDI) (de Rijke et al. 2006). Mind pozitív, mind negatív ionizációs módban alkalmazzák őket, de a legtöbb tanulmány szerint polifenolok esetében a negatív ionizációs mód érzékenyebb (Harnly et al. 2007, Cuyckens, Claeys 2004). Ez alól kivételt képeznek az antocianinok. A különböző ionizációs módokban az egyes molekulák más és más fragmentumokat képeznek, ezért egy molekula szerkezetének meghatározásához mind a két ionizációs mód értékes információkkal járulhat hozzá (de Rijke et al. 2006). Ha a mennyiségi meghatározás mellett szerkezeti azonosítást is akarunk végezni ahhoz valamilyen LC-MS/MS készülékre van szükség. Napjainkban kétség kívül ez az egyik legfontosabb a technika a kiválasztott komponensek szerkezeti azonosítására vagy az ismeretlen komponensek feltérképezésére. Mára a tandem-MS technikák döntő részt kiszorították a „szimpla” MS technikákat, köszönhetően nagyobb szelektivitásuknak és annak, hogy egy komponensről több információt szolgáltatnak egyszerűbb társaiknál (de Rijke et al. 2006).

Az MS/MS vagy MSⁿ technológiák a vizsgálni kívánt molekula ionizációjával, majd hasításával (fragmentálásával) és a keletkezett fragmentumok vizsgálatával igyekezik információt szolgáltatni az adott komponensről. A különböző fragmentmolekulák leírásához Ma et al. (Ma et al. 1997) dolgozott ki egy azonosítási eljárást, mely egyértelműen leírja egy fragmentáció során keletkezett molekula fragmentációs útját. Ez pozitív ionizációs módban következő ${}^{i,j}A^+$ és ${}^{i,j}B^+$. Az A ion jelöli azt a fragmentumot, mely az A-gyűrűt tartalmazza a B ion jelöli azt a fragmentumot mely az B-gyűrűt tartalmazza. Az indexben lévő i és j azokat a helyeket jelöli, ahol a C gyűrűn felhasadtak

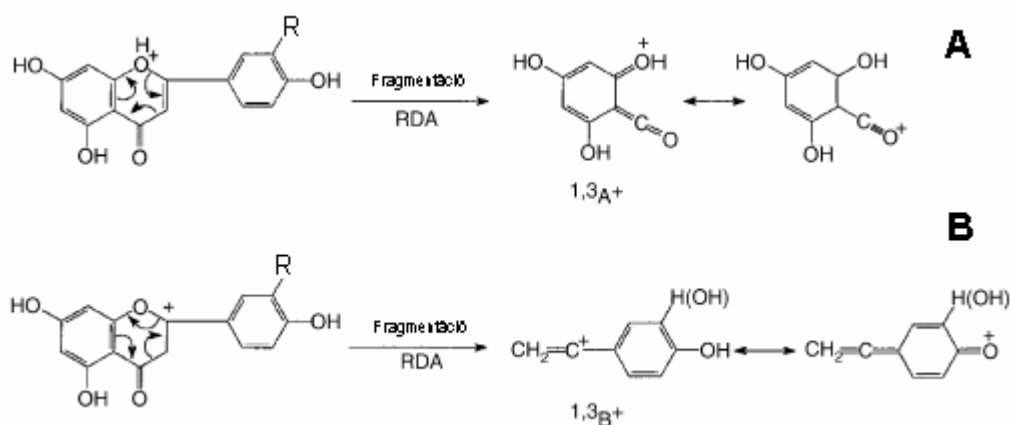
a kötések. Ugyanezen analógia alapján működik negatív ionizációs módban ($^{i,j}A^-$ és $^{i,j}B^-$). Azon ionokat, melyek a fragmentekből képződnek egy X rész elvesztésével [$^{i,j}A^{+-}X$] és [$^{i,j}B^{+-}X$] formával jelölik (de Rijke et al. 2006, March et al. 2006, Vukics, Guttman 2010). A C-gyűrű lehetséges fragmentációs útjait a **3.ábrán** látható.



3. ábra A flavonoidok C gyűrűjének hasadása által lehetséges fragmentációs utak; (A) mind pozitív mind negatív módban: (A1) 1 és 3, (A2) 0 és 4; (B) csak pozitív módban: (B1) 0 és 2, (B2) 1 és 4; (C) csak negatív módban (C1) 0 és 3, (C2) 1 és 2, (C3) 1 és 4, (C4) 2 és 4. (de Rijke mtsi. nyomán)

A fragmentáció során lejátszódó legfontosabb jelenség a flavonoidok esetében az úgynevezett retro-Diels-Alder (a továbbiakban RDA) reakció (Cuyckens, Claeys 2004). Ez a

jelenség olyan hatos gyűrűk esetében figyelhető meg, mely rendelkezik kettős kötésekkel és rendelkezik három szabadon mozgó elektron párral. A jelenség tulajdonképpen egy töltés átrendeződés, két σ -kötés felszakadásával két π -kötés keletkezik. Erre a legáltalánosabb példa a ciklohexen esete, ami butadiénre és etilénre fragmentálódik (de Rijke et al. 2006). A **4.ábrán** egy másik jellegzetes példa látható már a flavonoidok világából az apigeninen és a luteolinon keresztül bemutatva. A molekula hasadása során két (egymásnak komplementer) fragmens keletkezik $^{1,3}A^+$ és $^{1,3}B^+$. Mind a két formán megmaradhat a töltés. A keletkező fragmensekből következtetni lehet a rájuk kapcsolódó szubsztituensekre. Ennek a két vegyületnek a példájánál maradva az $[M+H]^+$ az apigenin esetében $m/z = 271$ a luteolin esetében $m/z = 287$ lesz. Az $^{1,3}A^+$ fragmens tömege mind a két esetben $m/z = 153$, de az $^{1,3}B^+$ fragmens tömege az apigenin esetében $m/z=119$, míg a luteolin esetében $m/z = 135$ lesz. Ez jelzi, hogy a két molekula közti különbség (egy $-OH$ csoport) a B-gyűrűn található. Az apigeninnek egy, a luteolinnak kettő van belőle.



4. ábra A RDA reakció bemutatása az apigenin ($R=H$) és a luteolin ($R=OH$) példáján bemutatva (A) az $^{1,3}A^+$ és (B) az $^{1,3}B^+$ fragmens keletkezése esetén. A nyilak jelzik az elektronpárok átrendeződését. (de Rijke mtsi. nyomán)

Pozitív módon történő ionizáció során $^{1,3}A^+$ és $^{1,3}B^+$ fragmensek keletkezése mondható a legáltalánosabbnak és a legfontosabbnak is egyben. A $^{1,3}B^+$ fragmens az egyik legfontosabb az adott flavonoid azonosítása szempontjából. Azon flavonoidok esetében, melyek metoxi csoporttal rendelkeznek lényegesen ritkábban játszódik le a RDA reakció a hasadás során. Flavonok és flavonolok esetén 0,2 kötések hasadása általánosan elterjedt, a relatív intenzitásuk 1-90 % közé esik. Ezt a fragmentációs utat negatív ionizációs módban eddig még nem írták le. A 0,4-es fragmentációs út nem gyakori, mindössze protonálódott flavonok hasadnak ily módon, ebből következően flavon aglikonok azonosítására alkalmas. A legjobb tudomásunk szerint 1,4-es fragmentációs utat eddig egy esetben írtak le a naringenin esetében, itt az $m/z = 147$ volt. Ilyen

tömegű fragmens azonban keletkezhet 0,4-es fragmentációs úton is egy víz veszttéssel. Ezeken kívül léteznek más tömegű fragmensek, melyek egyszerű molekulák veszttésével jönnek létre mint a H₂O (18 Da), CO (28 Da), C₂H₂O (42 Da) vagy a H₂O és a CO együttes veszttése (46 Da). Ezek szintén fontosak lehetnek egy-egy komponens vagy vegyület csoport azonosításában (de Rijke et al. 2006).

Ahogy a pozitív ionizáció esetén, negatív módban is a ^{1,3}A⁻ és ^{1,3}B⁻ fragmensek keletkezése a leggyakoribb és ezek a legfontosabbak is, noha relatív intenzitásuk jelentősen eltérhet az egyes vegyületek esetén. Ezzel együtt kempferol esetében még nem mutattak ki RDA ion keletkezését. Ezeken kívül az izoflavonoidokra jellemző fragmens a ^{0,3}B⁻. A 0,4 fragmensek alacsony intenzitásúak, de minden csoportban előfordul olyan tag melyik ezen az úton hasad. Ebben az esetben is keletkeznek olyan ionok, melyekből kisebb molekulák, funkciós csoportok szakadtak le. Jellegzetes példa erre egy m/z = 15 veszttése, amely megfelel egy metil csoportnak ugyan úgy, mint pozitív módban. Ez az egyik meghatározó fragmense az olyan flavonoidoknak, melyek rendelkeznek metoxi csoporttal (de Rijke et al. 2006).

Az irodalomban számos olyan módszer található, ami ezen jelenségeket eltérő készülékek és kondíciók használata mellett. Szerencsére az eddigi tapasztalatok arra engednek következtetni, hogy a fragmentációs utak döntőrészt függetlenek a használt ionforrástól (ESI, MALDI stb.) vagy analizátortól (QQQ, ITRAPP stb.). Másfelől azonban jelentős eltérés figyelhető meg az egyes fragmensek relatív intenzitásában (de Rijke et al. 2006, Vukics, Guttman 2010).

Az esetek döntő többségében az UV és az MS detektálást sorba szokták kötni, így több információ nyerhető egy csúcsról ugyanazon a futtatáson belül (Bilbao et al. 2007, Yoshida, Majors 2006, de Rijke et al. 2006, Jin et al. 2008, Li et al. 2007, Harnly et al. 2007, Robards, Antolovich 1997, Ding et al. 2008, Robbins 2003, Herrera, de Castro 2005).

3. Célkitűzések

Mint a bevezetőből kiderült a polifenolokkal kapcsolatos mérésekben rejlő lehetőségek tárháza szinte kimeríthetetlen (kezdve az élettani hatások vizsgálatán át a különböző vegyületek analitikai meghatározásáig). Én ebből két nagy területre koncentráltam a doktori munkám során: a kereső és a célkomponens módszerek kidolgozására.

Az első pontban bormintákat vizsgáltam. Itt egy célkomponens módszer kidolgozását tűztem ki célul, mégpedig a következő szempontok alapján:

- melynek segítségével el tudjuk különíteni egymástól a vizsgált bormintákat földrajzi eredetük, fajtájuk valamint évjáratuk szerint
- mindezt egy gyors, könnyen reprodukálható módszer segítségével, amely a későbbiekben akár rutin analitikai célokra is alkalmassá tehető
- megvizsgálni milyen szerepet tölthet be a nagy felbontású úgynevezett „rapid resolution” oszlop a borok polifenol készlet alapján történő besorolásában, az így nyert többlet információk mennyivel növelik a módszer megbízhatóságát

Ezt követően egy kereső módszer kidolgozása volt a célom, melynek segítségével egy ismeretlen mintából meg tudom határozni a bennük található flavonoidokat. Itt a következő pontokat állítottam be, mint kritériumokat:

- a lehető legkevesebb futtatásból minél több információt nyerni
- MRM módszer alkalmazása monitorozásra az „ionforrásban történő fragmentálódás” jelenség segítségével
- különböző aglikonok, mono- és diglikozidjaik azonosítása standardok használata nélkül
- a kidolgozott módszer alkalmazása valódi mintára

Az utolsó fejezetben egy olyan monitorozó módszer kifejlesztése volt a cél, melyben az előző módszer tapasztalatait felhasználva, annak tovább bővítését igyekeztünk megvalósítani a következő szempontok alapján:

- az azonosításhoz szükséges lépések számának csökkentése
- a módszer kiterjesztése összetettebb származékok azonosítására (például triszacharidok, acilezett szacharidok stb.)
- szerkezeti izomer aglikonok és azok glikozidjainak szelektív meghatározása ugyanazon futtatáson belül
- a kidolgozott módszer alkalmazása valódi mintára

4. Anyag és módszerek

4.1. Használt vegyszerek, standardok

Az 5.1-es fejezetben ismertetett méréshez használt vegyszerek.

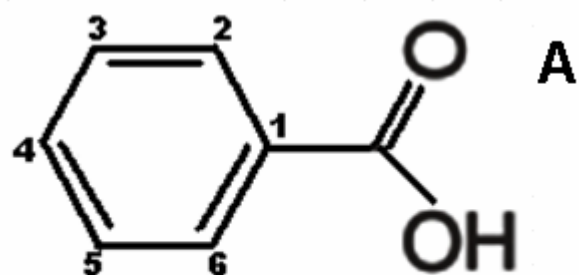
A mérésekhez használt a galluszsav hidrátot, a ferulasavat, a kávéssavat Carl Rhot-tól (Karlsruhe, Németország), a trans-para-kumársavat, a miricetint, a kempferolt, a trans-resveratrolt, a (+)-katehin hidrátot, az (-)- epikatehint a Flukától (Buchs, Svájc), a kvercetin dihidrátot és a naringenint a Sigmától (Bécs, Ausztria) szereztük be. A HPLC-hez használt nagy tisztaságú metanolt és acetonitrilt a Fisher Scientific-től, a nagy tisztaságú hangyasavat és ammóniumhidroxidot pedig a Merck-től (Dramstadt, Németország) vásároltuk.

Az 5.2-es fejezetben ismertetett méréshez használt vegyszerek.

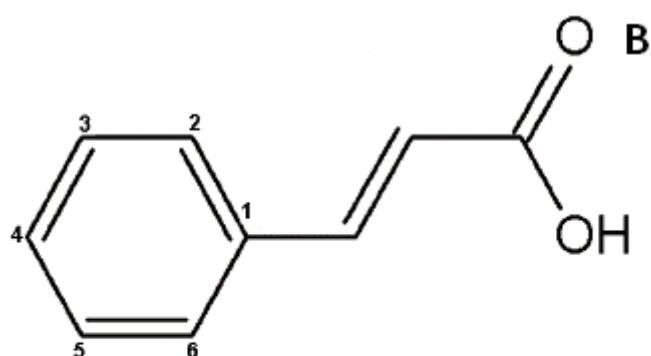
A kristályos flavonoid standardokat (apigenin, apigenin-7-O-glükozid, luteolin, miricetin, naringenin, naringin, kvercetin, rutin) a Sigmától (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) szereztük be. A HPLC tisztaságú metanolt, acetonitrilt és hangyasavat pedig a Scharlautól (Barcelona, Spanyolország). A kísérletekhez használt nagy tisztaságú vizet ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) mi állítottuk elő egy Milli-Q rendszer (Billerica, MA, USA) segítségével. A teszteléshez használt gyümölcslevet egy helyi boltban vettük.

Az 5.3-as fejezetben ismertetett módszerhez használt vegyszerek.

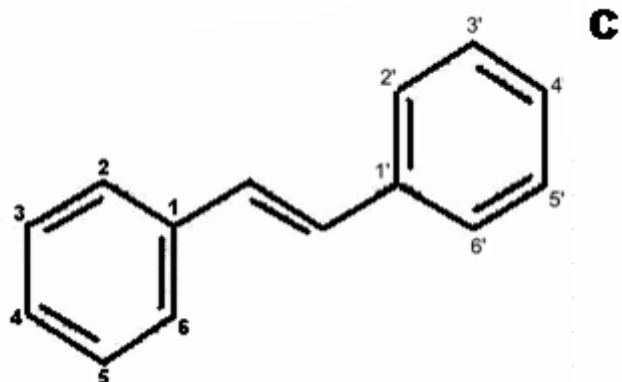
A luteolit, a miricetint, a naringenint, a naringint, a kvercetin, a rutint, a isokvercitrint, a hiperozidot, a daidzeint, a genisteint, a heszperitint, a heszperidint és a fizetint a Sigmától (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) a robinint, a luteolin-7-O-glükozidot és a kempferol-3-O-glükozidot pedig az Extrasynthesetől (EXTRASYNTHÈSE, Lyon, Franciaország) szereztük be. A HPLC tisztaságú metanolt, acetonitrilt és hangyasavat pedig a Scharlautól (Barcelona, Spanyolország). A kísérletekhez használt nagy tisztaságú vizet ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) mi állítottuk elő egy Milli-Q rendszer (Billerica, MA, USA) segítségével. A használt standardok szerkezeti képletei az **5. ábrán** láthatók.



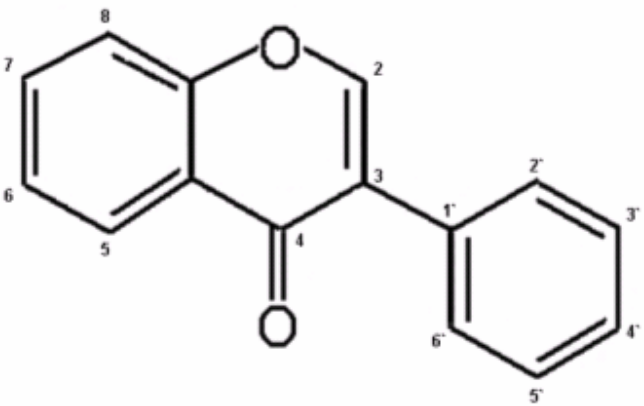
Benzoésavak				
Név	3	4	5	
Galluszsav	-OH	-OH	-OH	



Fahéjsavszármazékok			
Név	3	4	
Ferulsav	CH ₃ O	-OH	
Kávéssav	-OH	-OH	
p-Kumársav		-OH	

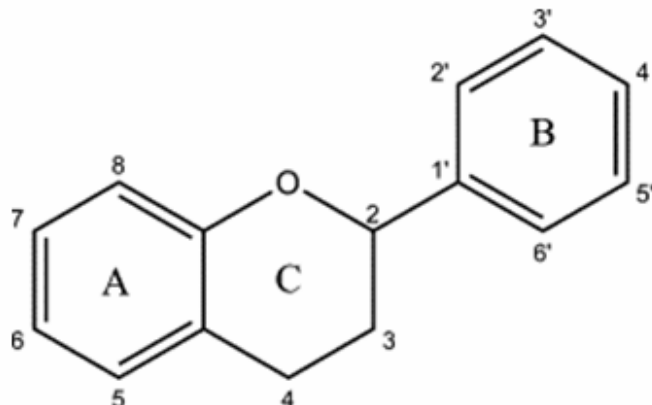


Stilbének			
Név	3	5	4'
Resveratrol	-OH	-OH	-OH



D

Izoflavonok							
Név	3	4	5	7	3'	4'	5'
Daidzein				-OH		-OH	
Genistein			-OH	-OH		-OH	



E

Flavonoidok							
Név	3	4	5	7	3'	4'	5'
Apigenin		=O	-OH	-OH		-OH	
Apigenin-7-o-glükózid		=O	-OH	glükóz		-OH	
Fizetin	-OH	=O		-OH		-OH	-OH
Hesperetin		=O	-OH	-OH	-OH	-OCH3	
Hesperidin		=O	-OH	rutinóz	-OH	-OCH3	
Hiperozid	galaktóz	=O	-OH	-OH	-OH	-OH	
Izokvercitrin	glükóz	=O	-OH	-OH	-OH	-OH	
Katehin/Epikatehin	-OH		-OH	-OH		-OH	-OH
Kempferol	-OH	=O	-OH	-OH		-OH	
Kempferol-3-O-glükózid	glükóz	=O	-OH	-OH		-OH	
Kvercetin	-OH	=O	-OH	-OH	-OH	-OH	
Kvercitrin	ramnóz	=O	-OH	-OH	-OH	-OH	
Luteolin		=O	-OH	-OH	-OH	-OH	
Luteolin-7-O-glükózid		=O	-OH	glükóz	-OH	-OH	
Miricetin	-OH	=O	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
Naringenin		=O	-OH	-OH		-OH	
Naringin		=O	-OH	rutinóz		-OH	
Robinin	robinóz	=O	-OH	ramnóz		-OH	
Rutin	rutinóz	=O	-OH	-OH	-OH	-OH	

5. ábra A kísérletek során használt standardok szerkezeti képletei. (A) benzoésavak, (B) fahéjsavak, (C) stilbének, (D) izoflavonok, (E) flavonoidok.

4.2. Alkalmazott berendezések

Az 5.1-es fejezetben ismertetett méréshez használt műszerek.

A méréshez Agilent 6410 (Palo Alto, CA, Egyesült Államok) tömegspektrométert használtunk melyhez Agilent 1200 (Palo Alto, CA, Egyesült Államok) HPLC rendszert csatlakoztattunk. Az ionokat elektropray ionizációs (ESI) ionforrás biztosította negatív ionizációs módban. A tömeganalizátor egy hármas kvadrupól (QQQ) rendszer volt. A porlasztáshoz és a molekulák fragmentálásához egyaránt N₂ gázt használtunk. A HPLC torony felépítését tekintve egy négycsatornás pumpából, egy gáztalanító készülékből, az oszlop termosztátból és az automatikus mintaadagolóból állt (6. ábra).



6. ábra Az 5.1-es fejezetben használt mérőrendszer.

Az 5.2-es fejezetben ismertetett méréshez használt műszerek.

A kísérletekhez egy Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) 1100 HPLC rendszert használtunk, amelyet csatlakoztattunk az Applied Biosystem (Foster City, CA, USA) által forgalmazott 3200 Q-Trapp hibrid (triple kvadrupól/linear ion trapp) MS/MS készülékhez. Az ionforrás Turbo-V ESI rendszerű volt melyet negatív ionizációs módban használtunk.

Az 5.3-as fejezetben használt műszerek (7. ábra).

Ebben az esetben ugyanazt a mérőrendszert használtuk, mint az 5.2-es fejezetben. A különbség mindössze a kromatográfiában volt.



7. ábra Az 5.2-es és 5.3-as fejezetben használt mérőrendszer.

4.3. Kidolgozott analitikai rendszer

4.3.1. Minta-előkészítés

Az 5.1-es fejezetben bemutatott módszer esetében alkalmazott eljárás.

Az autentikus borokat a Federal College and Research Institute for Viticulture and Pomology in Klosterneuburg-tól (HBLAuBA) szereztük be. Autentikus borok alatt azon borokat értjük, melyek mind a termesztés mind az előállítás technológiái azonosak és ismertek. A kísérlet során 97 autentikus bort vizsgáltunk, melyek 6 különböző szőlőfajtából készültek. A minták 11 különböző ausztriai borvidékről és 5 különböző évjáratból (2003-2007) származtak.

Standard eljárás szerint körülbelül 50 kg száratlanított termést zúztak össze és literenként 30 mg SO₂-ot adtak hozzá. A gyors alkoholos fermentáció elősegítésére egy speciális, szárított élesztőt adtak hozzá, 20 g-ot hektoliterenként. A fermentáció végét a visszamaradt cukortartalom alapján határozták meg FT-IR elven működő Winescan 120 NIR (Foss, Rellingen, Németország) célkészülék segítségével. A borokat sötétben 4 °C-on tárolták.

A vizsgálat előtt a borokat leszűrtük (Iso-Disc™, N-4-4, Nylon, 4 mm * 0,45 µm, Supelco, Bellefonte, PA, Egyesült Államok), majd pH 3,75 10 mM-os ammónium-formiát oldat segítségével, mely 10 % metanolt tartalmazott, 1:10 arányban hígítottuk. Utólag 20 µl belső standardot (50 mg/l koncentrációjú metanolban oldott naringenint) adtunk hozzá.

A mennyiségi meghatározást külső kalibrációval oldottuk meg. A kalibráló sort minden esetben 1 mg/ml-es metanolos standard oldatból hígítással készítettük. A koncentrációk beállításához ugyanazt az ammónia puffert használtuk, mint a minták hígításához. A megfelelő koncentrációjú munkatartomány minden egyes célkomponensre más és más volt, ezért ezt minden egyes anyagra egyedileg határoztuk meg.

Az 5.2-es fejezetben bemutatott módszer esetében alkalmazott eljárás.

Itt mintaként feketeribiszke levét használtunk, amit egy közeli hipermarketben szereztünk be, melyet mérés előtt 0,45 µm PTFE szűrőn szűrünk mielőtt injektáltunk volna belőle az oszlopra.

Az 5.3-as fejezetben bemutatott módszer esetében alkalmazott eljárás.

2,5 g liofilezett mintához 25 ml 50 %-os metanolt adtunk, és tálcás rázatóban 2 órán keresztül ráztuk. Ezután centrifugában 6000 RPM-mel centrifugáltuk 10 percig. A felülúszóból 8 ml-t kipipettáztunk, és ezt vákuumbepárlón szárazra pároltuk. A visszamaradt anyagrészhez 1 ml vizet adtunk, és 1 percig ultrahanggal ráztuk. Ezt követően még 1,6 ml metanolt adtunk az elegyhez és még egy percig ultrahangoztuk. Ezután 0,45 µm teflonos szűrőn szűrtük. Ez az oldat került injektálásra.

4.3.2. Kidolgozott kromatográfiák

Az 5.1-es fejezetben bemutatott méréshez alkalmazott kromatográfia.

Kromatográfiás elválasztáshoz Agilent Zorbax fordított fázisú, nagy felbontású (RP-RR) 50*2,1 mm-es 1,8 µm töltetátmérőjű C-18 oszlop használtunk **(8. ábra)**. Az A csatornán használt eluens víz volt, mely 1 % acetonitrilt és 0,1 % hangyasavat tartalmazott. A B csatornán használt eluens, ennek az ellentétje, acetonitril 1 % víz és 0,1 % hangyasav volt, az áramlási sebesség 0,4 ml/min. Az oszlophőmérséklet 20 °C-ra volt temperálva, az injektált mennyiség pedig 3 µl volt. A gradiens programot a **4. táblázat** szemlélteti.

4. táblázat az 5.1-es fejezetben alkalmazott gradiens

idő [perc]	B %	áramlási sebesség [ml/perc]
0,00	2	0,4
1,50	2	0,4
11,25	45	0,4
12,75	70	0,4
12,82	2	0,4

Az 5.2-es fejezetben bemutatott méréshez alkalmazott kromatográfia.

Az ebben az esetben alkalmazott kromatográfiás oszlop ugyanaz volt mint az 5.1-es fejezetben. Az oszlopot egy 0,45 µm porozitású belső szűrővel védtük. A vizes eluens 0,1 %-os hangyasav volt (A eluens), a szerves eluens pedig acetonitril volt (B eluens), mely szintén 0,1 % hangyasavat tartalmazott. A gradiens programot az **5. táblázat** szemlélteti.

5. táblázat az 5.2-es fejezetben alkalmazott gradiens

idő [perc]	B %	áramlási sebesség [ml/perc]
0,0	3	0,3
1,5	3	0,3
35,0	30	0,3
35,1	99	0,3
40,0	99	0,3
40,1	3	0,3
45,0	3	0,3

Az injektált mennyiség 3 µl volt. A nagy felbontású oszlop és MS detektálás használata mellett, a futtatási idő hosszúnak tűnhet, de az ismeretlen komponensek elválasztásához szükséges volt, mert nagyrészüik hasonló polaritás-tartományban található, ezért retenciójuk között alig van különbség.

Az 5.3-as fejezetben bemutatott méréshez alkalmazott kromatográfia.

A kromatográfiás oszlop egy Agilent Eclipse XDB-C18 RP 4,6*250 mm-es oszlop volt, melynek az átlagos töltet átmérője 5 µm. Az A csatornán áramló eluens víz volt 0,1 % hangyasav tartalommal, míg a B csatornán áramoltatott eluens metanol (MeOH) volt szintén 0,1 %-os hangyasavval. A kromatográfia 60 perces volt. Az ez idő alatt alkalmazott gradienst a **6. táblázat** szemlélteti. Az injektált mennyiség 10 µl volt.

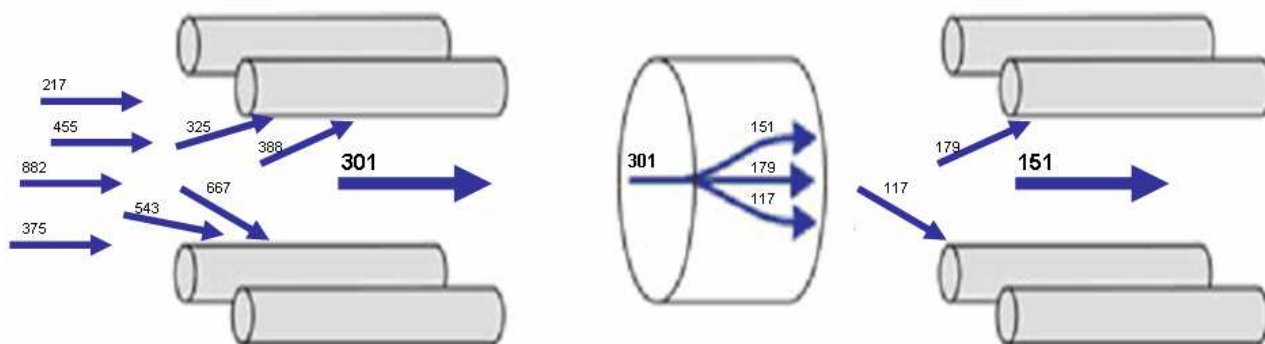
6. táblázat az 5.3-es fejezetben
alkalmazott gradiens

idő [perc]	B %	áramlási sebesség [ml/perc]
0,0	20	1,0
10,0	20	1,0
50,0	70	1,0
50,1	99	1,0
55,0	99	1,0
55,1	20	1,0
60,0	20	1,0

4.3.3. Tömegspektrometriás módszerek összefoglalása

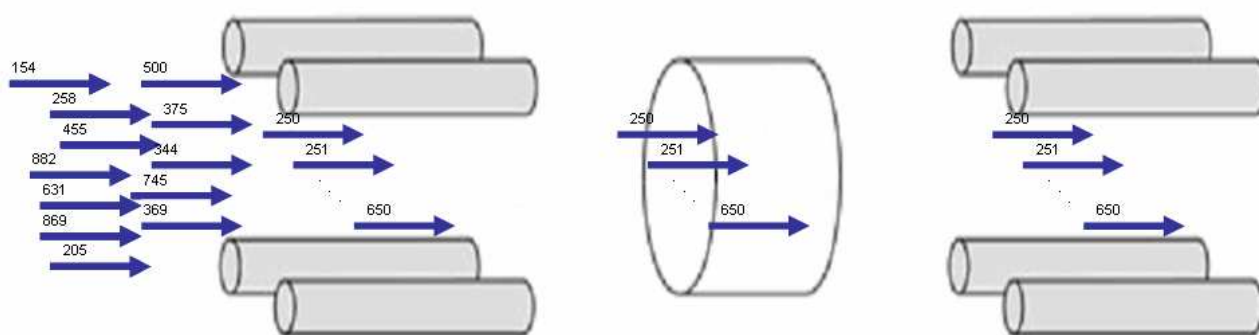
A mérések során négyféle tömegspektrometriás monitorozást alkalmaztunk attól függően, hogy milyen tulajdonságai alapján vizsgáltuk az adott komponenst. Ez a fejezet ezen pásztázástípusokat foglalja össze és pár szóban ismerteti azok működési mechanizmusát. Azonban itt jegyzem meg, hogy hivatalosan elfogadott egységes magyar terminológia hiányában az általam használt szakkifejezések -az előzetes egyeztetések ellenére- eltérhetnek más szerzők által használtakétól.

A dolgozatban megjelenő sorrend szerint az első típus az úgynevezett „Multiple Reaction Monitoring (továbbiakban az angol rövidítés alapján MRM)” módszer, amely egymást követő kémiai reakciók megfigyeléséből áll. Ez kifejezetten a hármas kvadrupol készülékekre jellemző pásztázási módszer. Működési elvének sematikus ábrázolása a **8. ábrán** látható. Ezen pásztázástípus esetén az első úgynevezett Q1 kvadrupolnak megadjuk a vizsgálni kívánt molekula anyaionjának protonált, deprotonál tömegét, a ionizációs módnak megfelelően. A Q1 csak ezt az m/z -t engedi át. Ezután az ütközési cellában N_2 gáz használatával ún. ütközés indukált fragmentációt hajtunk végre. A harmadik Q3 kvadrupolnak meg olyan tömegszámot adunk meg, melynek megjelenését feltételezzük az anyain fragmentálódása során. A Q3 csak ezt engedi át és ez az ion érkezik a detektorba. Elsősorban célkomponens módszerek során használják.



8. ábra A „Multiple Reaction Monitoring (MRM)” módszer működésének sematikus ábrája az $m/z = 301/151$ példáján keresztül bemutatva.

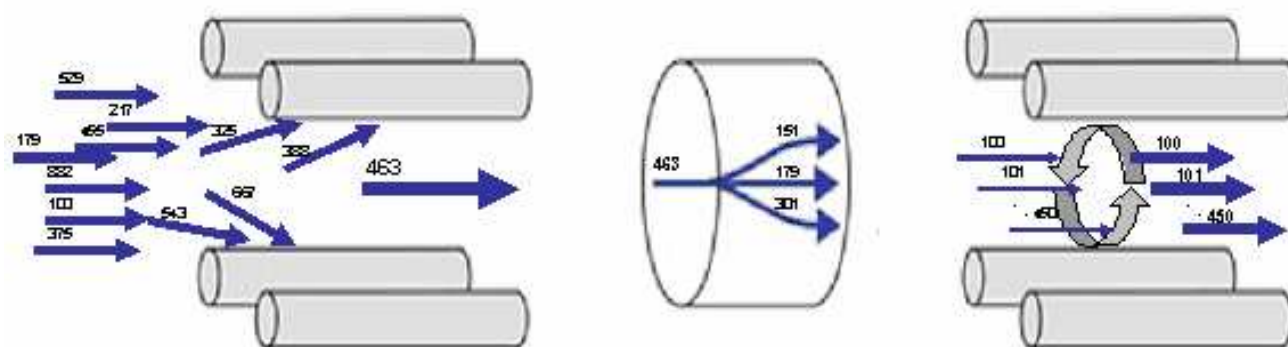
A másodiknak megjelenő pásztázástípus az úgynevezett teljes monitorozás (Q1). A **9. ábra** szemlélteti a működési elvét. Ez a módszer csak az első kvadrupolt használja mint tömegszűrőt. Ebben az esetben a készülék egyszeres tömegspektrométerként működik. Az ütközési cella és a harmadik kvadrupol nincs használatban, azaz csupán iontovábbítást végez. A Q1 egy előre megadott tömegtartományon belül m/z szerinti engedi át az ionokat, amiket aztán a detektor érzékel.



9. ábra A teljes monitorozás (Q1) módszer működésének sematikus ábrája az $m/z = 250$ -tól $m/z = 650$ -ig történő monitorozás példáján keresztül bemutatva.

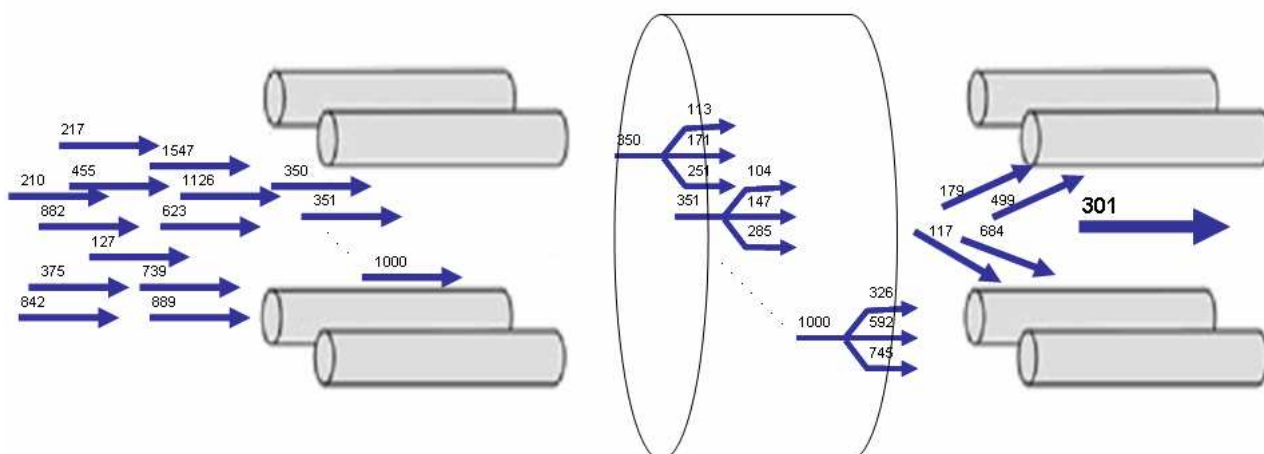
A harmadik típus az úgynevezett „Enhanced Product Ion (EPI)” módszer. Ebben az esetben a Q1 szintén csak egy előre meghatározott m/z -t enged át, ami utána az ütközési cellába kerül és ott fragmentálódik. A Q3 ekkor lineáris ioncsapdaként működik, mely a kiválasztott ionokból

származó fragmenseket, előre megadott m/z tartományban gyűjti mielőtt tovább engedné őket tömegszámok szerint egyesével a detektorba. A módszer sematikus rajza a **10. ábrán** látható.



10. ábra Az „Enhanced Product Ion (EPI)” módszer működésének sematikus ábrája az $m/z = 463$ ion termékion felvételéről.

A negyedik típus az úgynevezett „Precursor Ion (Prec)” pásztázás. Ez kifejezetten a hármas kvadrupol készülékekre jellemző pásztázási módszer az MRM-hez hasonlóan. MS/MS pásztázás, ahol az eddigiektől eltérően a Q3-nak állítunk be előre meghatározott tömeg/töltést, és csak ezen tömeg/töltéssel rendelkező ionokat engedi át. A Q1 viszont előre beállított skálán belül engedi át az ionokat tömeg/töltés szerint egyesével. Ezután bekerülnek az ütközési cellába és fragmentálódnak. Az ütközési cellából érkező ionokból a Q3 csak az előre meghatározott tömeg/töltésűt engedi át. A valóságban ezért egy származtatott ábrát kapunk, ha ábrázolunk egy így felvett spektrumot. A sematikus rajza a **11. ábrán** látható.



11. ábra A „Precursor Ion (Prec)” módszer működésének sematikus ábrája a Prec $m/z = 301$ monitorozás példáján keresztül bemutatva.

4.3.4. Az alkalmazott statisztikai módszerek

Számos olyan helyzet van, amikor szeretnénk tudni, hogy az egyes termékek milyen csoportba tartoznak. A csoportot itt igen tágan értelmezhetjük. Tulajdonképpen bármilyen csoportosítást kialakíthatunk, amelyet (megfelelő paraméterek hozzárendelésével) vizsgálni lehet: eredet-azonosítás, munkaalkalmassági vizsgálatok stb. Hogy a csoporttagságokat előre tudjuk jelezni, valamilyen jellemző paraméter(ek) mérése szükséges (független változók). Például elemösszetétel, biológiailag aktív komponensek összetétele, szennyezők stb. A diszkriminancia-analízisben tehát azt a problémát járjuk körül, hogyan lehet a termékek egyes csoportjait valamilyen vizsgált jellemzők alapján szétválasztani, az egyes csoportokat azonosítani, valamint a csoporttagságokat az előbb említett vizsgált jellemzők alapján előre jelezni. Ez egy felügyelt tanulási módszer, a leggyakrabban használt statisztikai módszer diszkriminancia vizsgálatokra.

A diszkriminancia-analízis számos célra felhasználható:

1. Megfigyelési egységek csoportokba sorolása egy diszkriminancia-egyenlet előrejelzése alapján
2. Elmélet tesztelése annak megfigyelése alapján, hogy a megfigyelési egységek csoportba tartozása valóban az előjelzés alapján alakul-e
3. Csoporton belüli és csoportok közötti különbségek vizsgálata
4. A „leggazdaságosabb” módszer kialakítása a csoportok közötti különbségek meghatározására, lévén diszkrimináló hatásuk alapján rangsorolja a változókat és kiszorja azokat, melyek diszkrimináló értéke nem kielégítő. Ezáltal csak a „legerősebb” változókat használja.
5. Annak meghatározása, hogy a független változók a függő változó varianciájának hány százalékát magyarázzák

Általános esetben van 'm' random minta, melyek különböző csoportokból származnak, melyek száma $n^1, n^2 \dots n^m$ az ismétlések száma pedig $n^1_1, n^1_2 \dots n^1_i$. Ezen túl a minta minden egyes tagjáról rendelkezésünkre áll p darab változó: $X_1, X_2, \dots X_p$. Ezeket az adatokat a **7. táblázat** szemlélteti.

7. táblázat A diszkriminancia analízis során alkalmazható mintatábla általános formája				
minták	X_1	X_2		X_p
$n1_1$	$n1_{11}$	$n1_{12}$		$n1_{1p}$
$n1_2$	$n1_{21}$	$n1_{22}$		$n1_{2p}$
.	.	.		.
.	.	.		.
.	.	.		.
$n1_i$	$n1_{i1}$	$n1_{i2}$		$n1_{ip}$
$n2_1$	$n2_{11}$	$n2_{12}$		$n2_{1p}$
$n2_2$	$n2_{21}$	$n2_{22}$		$n2_{2p}$
.	.	.		.
.	.	.		.
.	.	.		.
$n2_i$	$n2_{i1}$	$n2_{i2}$		$n2_{ip}$
.	.	.		.
.	.	.		.
.	.	.		.
nm_1	nm_{11}	nm_{12}		nm_{1p}
nm_2	nm_{21}	nm_{22}		nm_{2p}
.	.	.		.
.	.	.		.
.	.	.		.
nm_i	nm_{i1}	nm_{i2}		nm_{ip}

A diszkriminancia-analízis esetén az adatokat nem szükséges standardizálni, ennek oka, hogy az analízis eredményét nem befolyásolja jelentős mértékben az egyes változók mértékegysége. A lineáris diszkriminancia analízis esetén a csoportok közti szórást maximalizálni, a csoporton belüli szórást pedig minimalizálni igyekszünk. Ez feltételezi azt, hogy a minták normál eloszlást követnek. Ezt a sok dimenziójú teret a legkisebb dimenziójú térbe vetíti le a lehető legkisebb információ veszteséggel. Ezt úgynevezett kanonikus diszkriminációs függvények segítségével teszik. Ezek a függvények az eredeti változók lineáris kombinációja. Az első függvény:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1p}X_p$$

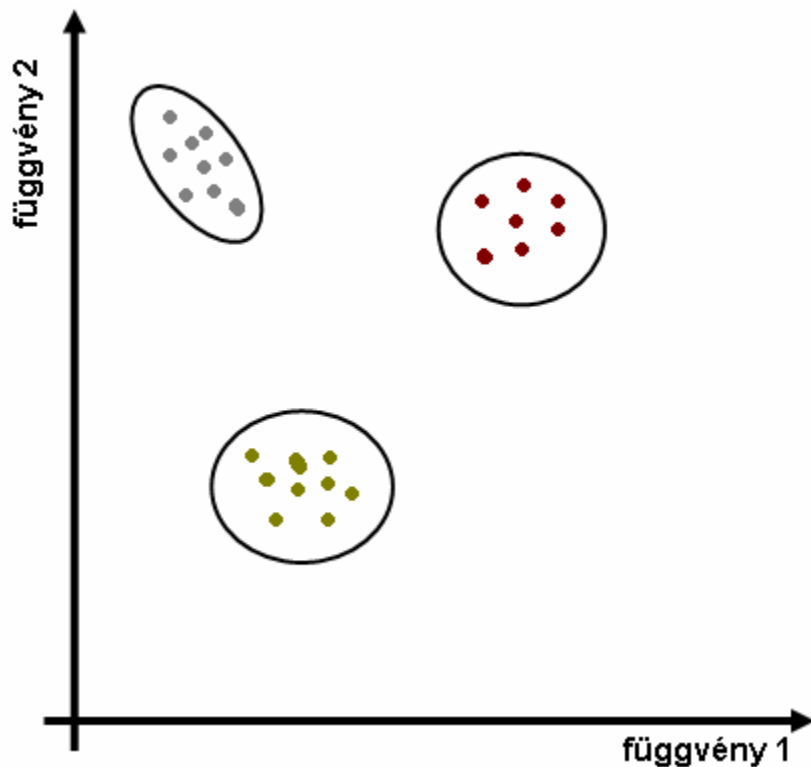
adja az egy-szemponthos variancia analízis F (csoportokon belüli és csoportok közötti) arányának lehető legnagyobb értékét. Ha egynél több függvény van, akkor a második függvény, vagyis:

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2p}X_p$$

az egy-szemponthos variancia analízis F arányának a lehető legnagyobb értékét adja, azzal a feltétellel, hogy Z_1 , Z_2 között csoporton belül nincs korreláció. A további függvényeket is ugyanígy határozzuk meg. Vagyis az i -edik kanonikus diszkriminancia függvény:

$$Z_i = a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2 + \dots + a_{ip}X_p$$

az a lineáris kombináció, amely esetén a variancia analízis F arányának értéke maximális, azzal a feltétellel, hogy Z_i és $Z_1, Z_2, \dots, Z_{i-1}$ között csoporton belül nincs korreláció. A függvények megoldásai a gyökök, ezt tudjuk ábrázolni (**12. ábra**). Ebben a térben a két függvény merőleges egymásra.



12. ábra A kanonikus diszkriminancia analízis eredményének kétdimenziós ábrázolása.

A kanonikus diszkriminancia-függvény együtthatóinak meghatározásakor egy sajátérték problémával találjuk magunkat szembe. $Z_1, Z_2, \dots, Z_i$ kanonikus diszkriminancia függvények az eredeti változó lineáris kombinációiként keletkeznek oly módon, hogy Z_1 a lehető legnagyobb mértékben mutatja a csoportok közötti különbséget; Z_2 a lehető legnagyobb mértékben mutatja a csoportok közötti különbségek azon aspektusát, amelyet Z_1 nem foglal magában; Z_3 a lehető legnagyobb mértékben mutatja a csoportok közötti különbségek azon aspektusát, amelyet Z_2 nem foglal magában, és így tovább. Mindezzel a cél az, hogy az első néhány függvénnyel magyarázni tudjuk a legfontosabb csoportok közötti különbségeket.

A minta-felismerési eljárások egyik legfontosabb része a modell validációja. A modell validációs eljárás ellenőrzi hogy a felépített modell alkalmas-e ismeretlen minták megfelelő besorolására. Ideális helyzetben elég sok mintánk van ahhoz, hogy különálló tanító-, kalibrációs- és teszt-mintahalmazt készítsünk, melyek egyenként elég nagyok, hogy reprezentálják a csoportokat. Ezt a validációt hívják külső validációnak, a teszt mintahalmaz teljesen független a modellt építő folyamattól. Az élelmiszer-analitikában általában nem ez a helyzet, ezért különféle kereszt-validációs eljárásokat használunk, azaz a mintáink egy részét kiválasztjuk és elnevezzük tanító-mintahalmaznak, a maradék részét pedig teszt-mintahalmaznak.

A „leave-one-out” módszer a kereszt validációs (cross-validation) eljárás egyik változata. A lényege az, hogy az N minta közül egyszerre csak egy mintát választunk ki és ezt használjuk tesztmintának. Ez a módszer kis mintaelem-számú méréseknél hasznos, ahol nehéz igazságosan kétfelé vágni az adathalmazt teszt- és tanító-halmazra. Minden tanítási ciklusban első lépésként kiválasztjuk a tesztelemet, majd a fennmaradó $N-1$ elemen tanítjuk be az algoritmust. Ez összesen N tanítási ciklust jelent, és minden ciklusban új tesztmintán vizsgáljuk az előrejelzést. A validáció végső mérőszámát a teszt minta besorolásának (helyes -1 / nem helyes - 0) átlaga adja meg. Ez az érték a legrosszabb esetben N osztály esetén a véletlen választás módszerének várható értéke szerint $1/N$ értéket vesz fel. A mintafelismerő módszert sikeres működése esetén ez az érték 1 közeleli lesz.

5. Eredmények

5.1. Autentikus borok eredetének meghatározása polifenol készletük alapján

Borok eredetének meghatározására számos módszer ismert. Ide tartozik a különböző elemek izotóparányának mérése magmágneses rezonancia (NMR) méréssel, ellemujljenyomat készítése induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS), valamint szerves vegyületcsoportok profiljának készítésével akár optikai (UV-VIS), akár szerves tömegspektrometriás (LC-MS) módszerekkel (Saurina 2010). Ebben a dolgozatban polifenolok mérésével próbáltunk következtetni a vizsgált borok eredetére.

5.1.1. Meghatározott komponensek köre

A vörösborokban legnagyobb mennyiségben előforduló polifenolok az antocianinok és antocianidinek. Ezen vegyületek - borok eredetére vonatkozó - információ-tartalma már ismert (Dopico-Garcia et al. 2008, Jin et al. 2009, Gonzalez-Neves et al. 2010). Számos tanulmány foglalkozik borok antocianin profiljának feltérképezésével, akár optikai, akár tömegspektrometriás módszerekkel. Ezért olyan vegyületekre koncentráltunk, melyek a borokra általánosan jellemzőek, de nem tartoznak a legnagyobb mennyiségben előforduló komponensek közé. Arra voltunk kíváncsiak, hogy ezen – ilyen szempontból kevésbé vizsgált - vegyületek, és izomerjeik, hordoznak-e információt a vizsgált borok eredetére vonatkozóan.

A vizsgálandó komponensek körét úgy igyekeztünk kiválasztani, hogy azok lehetőség szerint reprezentálják azon polifenolok körét, melyek a szőlőből természetes úton vagy a technológiai lépések során belekerülhetnek borokba. A főbb polifenolos komponens csoportok, amik előfordulhatnak a borokban, a hidroxibenzoesav származékok, a hidroxifahéjsav származékok, a trihidroxistilbenek és a flavonoidok. Azt, hogy melyikből mennyi és milyen formában található meg az adott borban, olyan tényezők határozzák meg, mint az éghajlat, a szőlőfajták, a zúzás fajtája, a fermentáció fajtája, annak hőmérséklete, ideje és a borok kora. A fiatal borok elsősorban kisebb molekulatömegű polifenolokat tartalmaznak, míg ezzel szemben az öregebb borokban egyre nagyobb mennyiségben fordulnak elő polimerizált formában. A borokba alapvetően két helyről kerülhetnek polifenolok. Az első maga a szőlő növény, a másik a fermentáció során használt közeg, elsősorban tölgyfahordók. A szőlőből elsősorban fenolos savak, antocianinok, flavonolok, tanninok és flavononok, a tölgyfából kondenzálható tanninok, bizonyos flavonoidok, és egyszerű polifenolok kerülhetnek a borba. A vörösborokban található flavonoid mennyiség

nagyságrenddel nagyobb, mint a fehérborokban. Az előállítási technológiát figyelembe véve ez nem meglepő, hiszen a vörösborokat „héjon erjesztik”. Mindezek ismeretében a kiválasztott komponensek a következők lettek: galluszsav, ferulasav, kávéssav, trans-para-kumársav, miricetin, kempferol, trans-resveratrol, (+)-katehin, (-)- epikatehint, kvercetin és a naringenin. Ez utóbbi nem tartozik a borokban széles körben előforduló polifenolok közé, ezért belső standardként alkalmaztuk. Mint a felsorolásból látható a polifenolok négy, borokban gyakran előforduló csoportja képviselteti magát. A hidroxibenzoésavakat a galluszsav, hidroxifahéjsavakat a ferulasav, kávéssav és a trans-para-kumársav, a stilbeneket a resveratrol, a flavonoidokat a miricetin, a kempferol, a katehin, az epikatehin és a kvercetin.

5.1.2. A nagy kromatográfiás felbontás szerepe a polifenolok mérésben

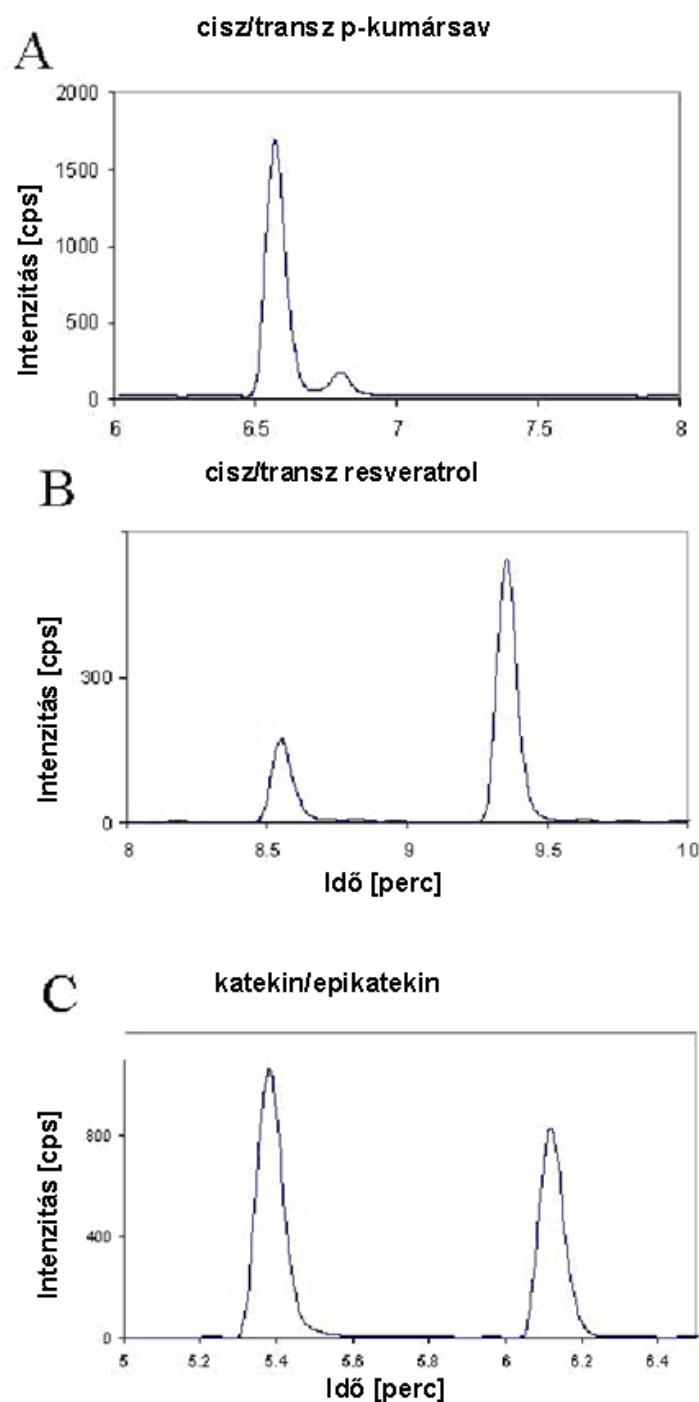
A folyadékkromatográfiás oszlopok felbontóképességének hatékonyságát a módszer megjelenése óta vizsgálják. Ezt elsősorban az áramlási sebesség és az átlagos töltetátmérő függvényében teszik. Ennek célja, hogy az oszlop hatékonyságát minél jobban megnöveljék. Ez a költségek csökkentése érdekében fontos. Ha le akarjuk csökkenteni az analízis idejét, célszerű rövidebb oszlopot használni, de ezzel azt kockáztatjuk, hogy csökken az elméleti tányérszám. Ez a felbontó képesség csökkenésével jár, ami pedig szükséges lehet a vizsgálathoz, ha összetett mátrixról van szó. A problémát a szemcseméret csökkentésével hidalhatjuk át (Yoshida, Majors 2006).

Az irodalomból kiderül, hogy a kisebb töltetátmérő esetén (például ha 5 μm helyett 1,8 μm használunk) a futtatás ideje akár az ötödére is csökkenthető azonos áramlási sebesség mellett (Yoshida, Majors 2006). Ez magával vonja azt, hogy oldószert és időt takaríthatunk meg. Az injektált mennyiséget is csökkenthetjük, hiszen a csúcsok keskenyebbek, így jóval koncentráltabbak lesznek. Ebből következően a módszer érzékenyebb lesz, mert kisebb koncentrációjú anyagok esetén jobban érzékelhető csúcsokat kapunk. Azonban meg kell jegyezni, hogy kisebb töltetátmérőnél nagyobb nyomás alkalmazása szükséges azonos térfogatáram eléréséhez (Yoshida, Majors 2006).

A másik előny, ami a nagy felbontású oszlop alkalmazásával együtt jár, hogy képesek leszünk az egyes vegyületek izomerjeit is elválasztani egymástól. Ez nagy jelentőséggel bírhat olyan módszerek esetén, melynek végső célja valamilyen profil készítés, melyből aztán további következtetéseket kívánunk levonni (Yoshida, Majors 2006).

Az eddig publikált irodalmakat alapul véve az elválasztás hatékonyságát a 2 μm alatti átlagos töltet átmérőjű szilárdfázis alkalmazásával lehet a legjobban növelni. Ebből következően lehetőség

nyílt különböző izomerek elválasztására, mint a *cisz*-/transz- resveratrol, a katehin/epikatehin egy futtatáson belül. Az **13. ábra** mutatja be azon kromatogramokat, melyeken az egymástól elválasztott izomerek láthatók. Az összes komponens elválasztása megvalósul 10 perc alatt, és a 15 perces kromatográfia magába foglalja az oszlopkondicionálást is.



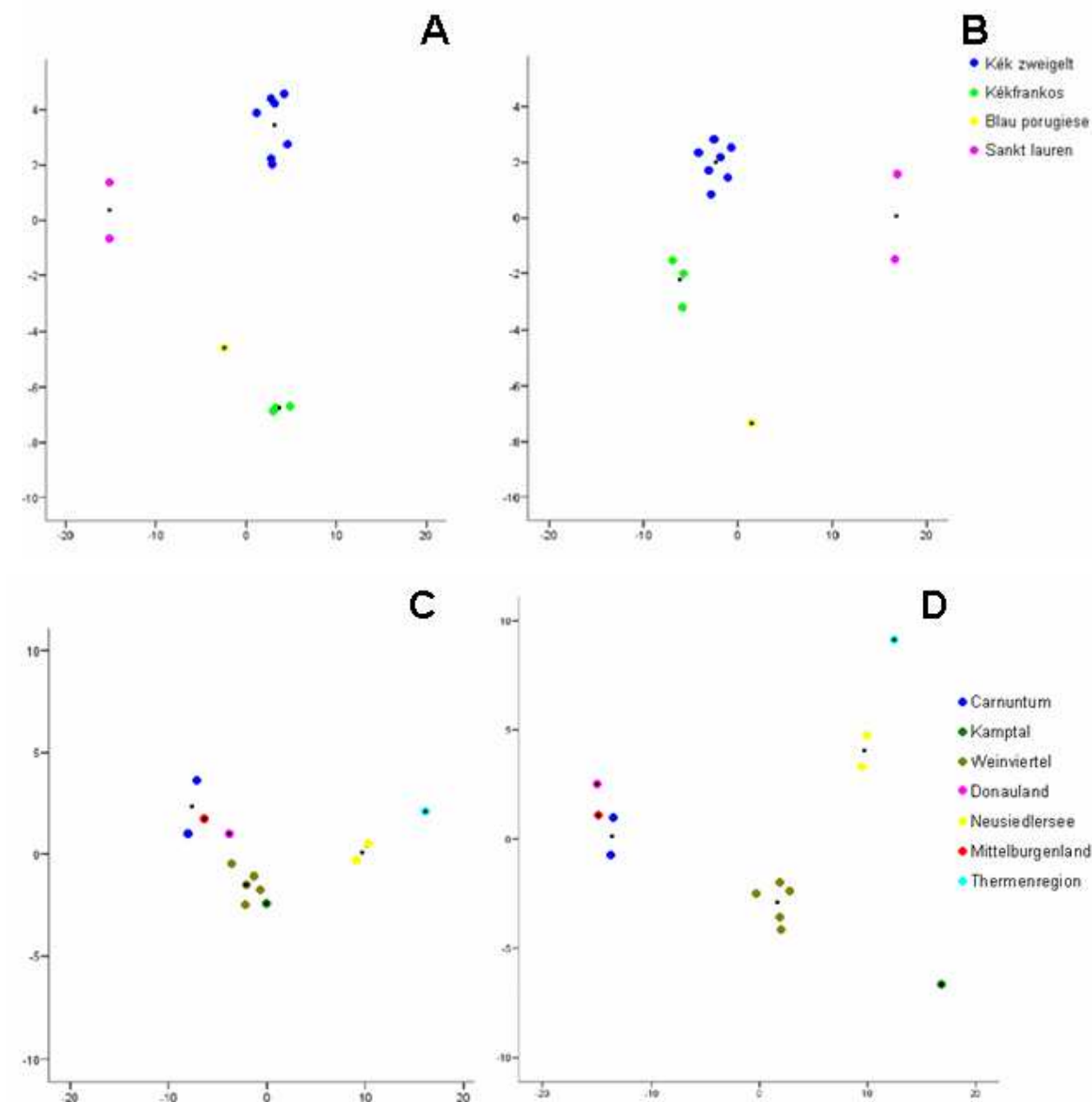
13. ábra Az 5.1-es pontban kifejlesztett módszer segítségével egymástól elválasztott izomerek kromatogramjai: (A) *cisz*/transz parakumársav, (B) *cisz*/transz resveratrol, (C) katehin/epikatehin.

5.1.3. A statisztikai értékelés eredménye, izomerek diszkrimináló hatása

A besoroláshoz egy egyszerűsített diszkriminancia-analízist használtunk. Ezekhez a számításokhoz az SPSS 15 (SPSS, Chicago, Egyesült Államok) programját alkalmaztuk. A bevitt változók a polifenolok koncentrációi voltak. A borok évjárat, termőterület, szőlőfajta szerinti eredetét vizsgáltuk. Kiemelendő ebben az esetben, hogy a változók közé került nem csak az alapvegyület, hanem ha van, annak izomerje is. Ez tovább növelheti a csoportok közti különbséget és az így kapott adatok megbízhatóságát. Arról, hogy ezen vegyületek tényleges befolyásoló hatásáról meggyőződünk, az eredetmeghatározás szempontjából, előkísérleteket végeztünk. Ehhez 13 autentikus bort használtunk. Négyfajta, Ausztriában nagy mennyiségben előállított vörösbort használtunk 7 különböző borvidékről. Ezen borok adatai az **8. táblázatban** megtalálhatók.

8. táblázat Az elő kísérletekhez használt borok	
Bor	Borvidék
Zweigelt	Donauland
Zweigelt	Weinvirtel
Zweigelt	Weinvirtel
Zweigelt	Weinvirtel
Zweigelt	Weinvirtel
Zweigelt	Kamptal
Zweigelt	Carnuntum
Kékfrankos	Mittelburgenland
Kékfrankos	Carnuntum
Kékfrankos	Neusiedlersee
Kékoportó	Weinvirtel
Sanktlauren	Thermenregion
Sanktlauren	Neusiedlersee

A kidolgozott módszerrel elvégzett mérés után kétféleképpen végeztük el a diszkriminancia-analízist. Először az izomerek nélkül, majd az izomerek használatával próbáltuk meg elkülöníteni a borokat termőhelyük és fajtájuk szerint. Mivel az összes bor a 2006-os évből származott, évjárat szerinti besorolással nem próbálkoztunk. A kétféle változókészlet felhasználásával készült diszkriminancia-analízis eredményei a **14. ábrán** láthatók.



14. ábra Az előkísérletek során végzett diszkriminancia-analízis eredménye: (A) a szőlőfajták szerint elvégzett diszkriminancia-analízis eredménye az izomerek használata nélkül, (B) a szőlőfajták szerint elvégzett diszkriminancia-analízis eredménye az izomerek használatával, (C) a termőhelyek szerint elvégzett diszkriminancia-analízis eredménye az izomerek használata nélkül, (D) a termőhelyek szerint elvégzett diszkriminancia-analízis eredménye az izomerek használatával.

A **14.A és B ábrán** látható a fajta szerinti besorolás eredménye. Mint látható a csoportok mind a két esetben tisztán elváltak egymástól. Az egyetlen figyelemre méltó különbség a Zweigelték esetében jelentkezett (az ábrán a kékszínű foltok). Az izomerek használata nélkül két csoportra válnak szét, de izomerek használatával ez a két csoport összeolvad. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a növény genetikája elég szigorúan meghatározza a fellelhető polifenolok körét és izomerjeiknek arányát, ezért azok diszkrimináló hatása nem annyira meghatározó. A **14.C és D ábra** esetében viszont szemmel látható a különbség a két ábra között. Izomerek használata nélkül a statisztika nem tudta elválasztani egymástól a csoportokat, míg ezzel szemben, ha az izomereket is bevesszük a változók közé, a csoportok közti távolság jelentős mértékben növekszik. Sajnos ebben az esetben sem különül el egymástól minden csoport, aminek egyik magyarázata lehet az alacsony mintaszám és a korlátozott számú, előre kiválasztott célkomponens, de kijelenthetjük, hogy a földrajzi eredet szerinti besorolás esetében jelentős szerepet játszanak az izomerek. Ezért ezek után az izomereket is bevettük a statisztikai elemzésekbe. Az összes autentikus bor felhasználásával elvégzett statisztikai elemzés után kapott driszkimináló függvényeket a **9. táblázatban** foglaltuk össze. DF1-es függvények = Zweigelték, DF2-es függvények = kékfrankosok földrajzi eredet szerinti elkülönítésére, DF3-as függvények = borok 1. csoportjának DF4-es függvények = borok 2. csoportjának szőlőfajták szerint eredet-meghatározására, DF5-ös függvények = összes bor DF6-os függvények = Zweigelték és DF7-es függvények = kékfrankosok évjárat szerinti besorolására vonatkoznak.

9. táblázat A 5.1-es fejezetben vizsgált borokon elvégzett egyszerűsített diszkrimnancia analízis eredménye.

Function	Eigenvalue	% of Variance	Canonical correlation
DF 1_1	20.633	78.9	0.977
DF 1_2	5.221	20.0	0.916
DF 1_3	0.308	1.1	0.485
DF 2_1	1.868	69.1	0.807
DF 2_2	0.837	30.9	0.675
DF 3_1	6.327	74.5	0.929
DF 3_2	2.160	25.5	0.827
DF 4_1	2.398	93.9	0.840
DF 4_2	0.157	6.1	0.368
DF 5_1	11.582	54.6	0.959
DF 5_2	6.356	30.0	0.930
DF 5_3	2.086	9.8	0.822
DF 5_4	1.174	5.5	0.735
DF 6_1	19.173	53.7	0.975
DF 6_2	9.034	25.3	0.949

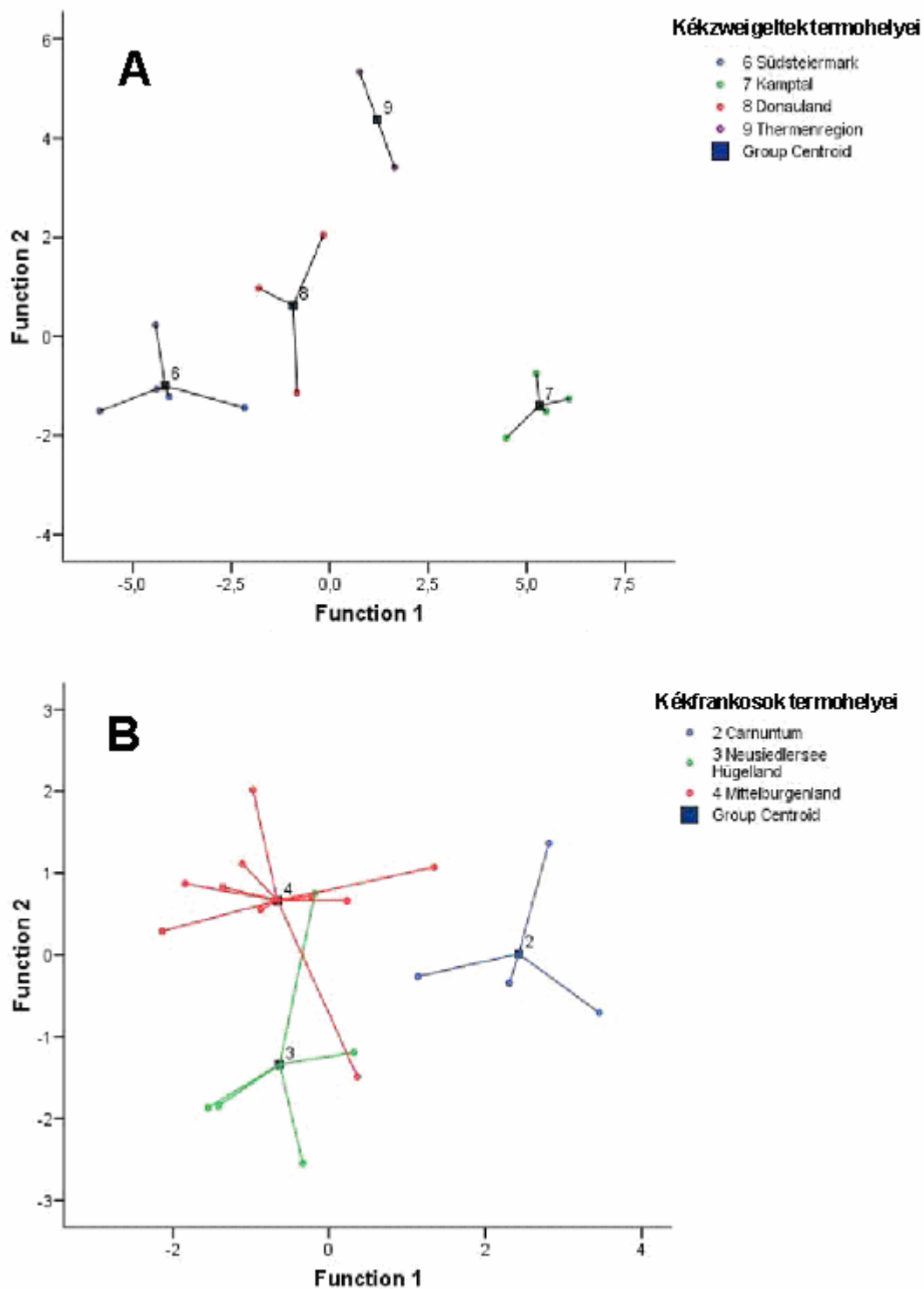
DF 6_3	3.969	11.1	0.894
DF 6_4	3.549	9.9	0.883
DF 7_1	112.020	71.2	0.996
DF 7_2	25.782	16.4	0.981
DF 7_3	11.224	7.1	0.958
DF 7_4	8.219	5.2	0.944

Földrajzi eredet szerinti besorolás

Ebben az esetben a vizsgált anyagok és a földrajzi eredet közötti összefüggést vizsgáltuk. A Zweigelt és a Kékfrankos, mint az Ausztriában termesztett két legfontosabb fajta, szolgáltatta a legfontosabb eredményt. A Zweigelt a következő borvidékekről származott: Südsteiermark, Kamptal, Donauland és Thermenregionből, a Kékfrankos pedig: Carnuntum, Neusiedlersee Hügelland és Mittelburgenlandból. A borvidékek voltak a csoportos változók, a borokban mért polifenol koncentrációk pedig a független változók.

Ez a fajta diszkriminancia analízis, a Zweigelt borok esetében, háromféle diszkrimináló függvényt eredményez (**DF 1_1 - DF 1_3; 9. táblázat**). Az eredmények helyessége úgynevezett leave one out (LOO) teszttel vizsgáltuk. A besorolás helyességét 100%-ra sorolta. A **15.A. ábra** illusztrálja a Südsteiermark, Kamptal, Donauland és Thermenregion –ből származó Zweigelt szőlők egymáshoz való viszonyát. Látható, hogy teljesen elkülönülnek.

A második analízis a Carnuntum, Neusiedlersee Hügelland és Mittelburgenlandból származó Kékfrankosok elkülönítésén alapult. Ebben az esetben a diszkriminancia analízis kétféle diszkrimináló függvényt eredményezett (**DF 2_1, DF2_2; 9. táblázat**). Az ellenőrzés 84 % -nak ítélte az eredmények megbízhatóságát. Ez jóval kisebb, mint az előző esetben. Ennek fő oka az lehet, hogy ezen borvidékek relatíve kis területen helyezkednek el (a régió sugara, ahonnan ezek a borok származnak, mindössze 50 km). **15.B. ábra.**

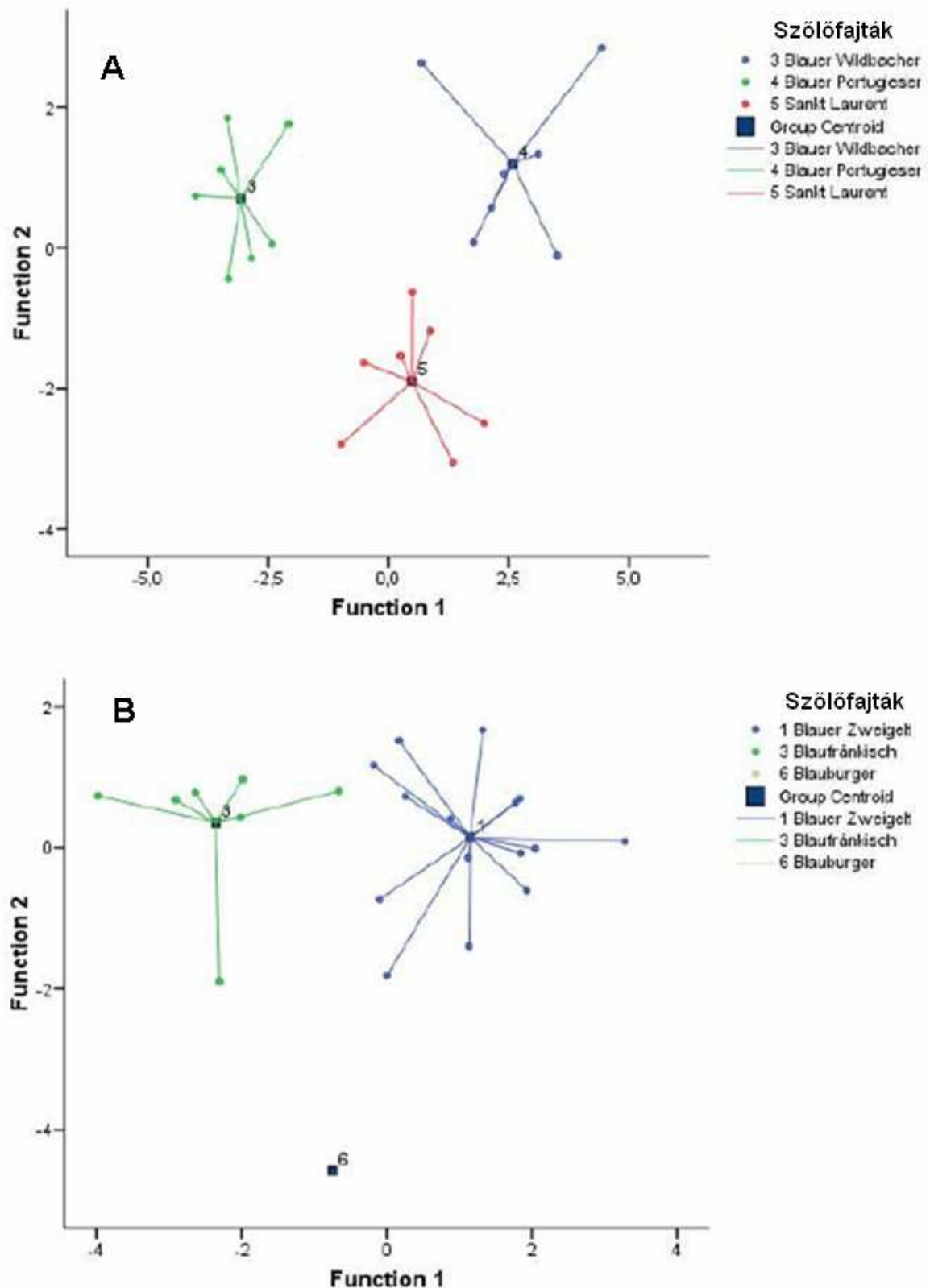


15. ábra A Kékfrankosok és a Kékzweigelt termőhely szerinti statisztikai besorolásának ábrázolása. (A) Kékzweigelt termőhelyek: Süsteiermark, Kamptal, Donauland, Thermenregion, (B) Kékfrankos termőhelyek: Carnuntum, Neusiedlersee Hügelland, Mittelburgenlad

A kiválasztott szőlőfajták földrajzi eredetének meghatározását túlnyomórészt gazdasági körülmények indokolják. A különböző régiókból származó borok minősége és ára nagymértékben eltérő lehet. Egy másik ok lehet az ausztriai DAC (Districtus Austriae Controllatus), mely meghatároz négy magas-minőségű régiót Ausztriában. A kapott eredmények alapján ki lehet jelenteni, hogy a kidolgozott módszer segíthet az olyan irányú csalások kimutatásában, melyek a földrajzi eredet meghamisítására irányulnak.

Szőlőfajták szerinti besorolás

A statisztikai kiértékeléshez használt adatokat a Weinvirtel régióból származó borok adták (Blauer Portugieser, Blauer Wildbacher, Sankt Laurent, Blauer Zweigelt, Blaufränkisch, Blauburger). Itt a csoportos változók a borfajták, a független változók pedig a polifenolok koncentrációi voltak. Az előzetes vizsgálatok alapján látszott, hogy az adatok két csoportra válnak szét. Az első csoportba Blauer Portugieser, Blauer Wildbacher, Sankt Laurent tartozott. A másodikba Blauer Zweigelt, Blaufränkisch, Blauburger. Ez a két különböző csoport négy különböző statisztikai függvényt eredményezett (**D3_1, D3_2, D4_1, D4_2**). Mind a kettő csoportot ellenőriztük az LOO teszttel. Az első esetében 100 %, míg a második esetében 65 % lett a besorolás megbízhatósága. Az eredmények a **16.A és B ábrán** láthatóak.



16. ábra A borok szőlőfajták szerinti statisztikai besorolásának ábrázolása. (A) Ábrázolt szőlőfajták Blauer Wildbacher, Blau Portugieser, Saint Laurent az összes borvidékről, (B) ábrázolt szőlőfajták Blau Zweigelt, Blaufrankiesher, Blauburger az összes borvidékről

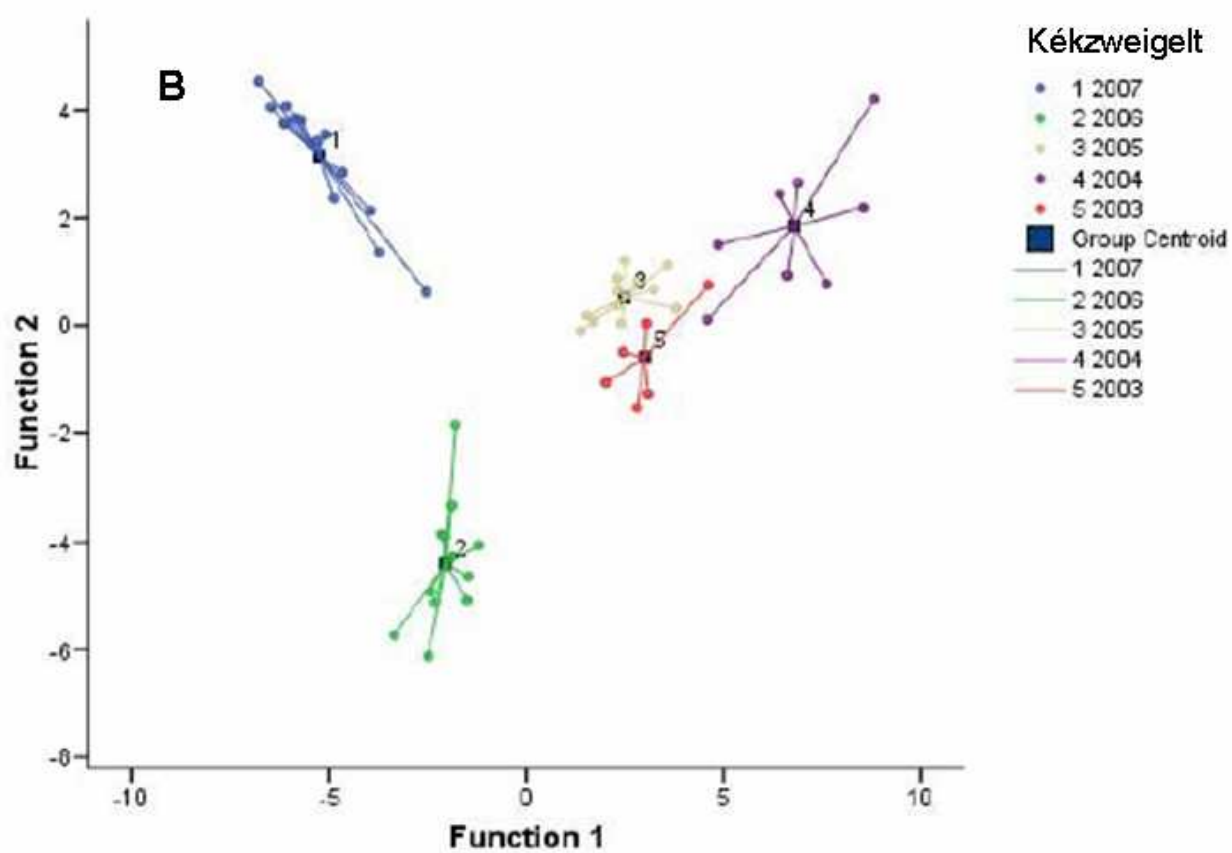
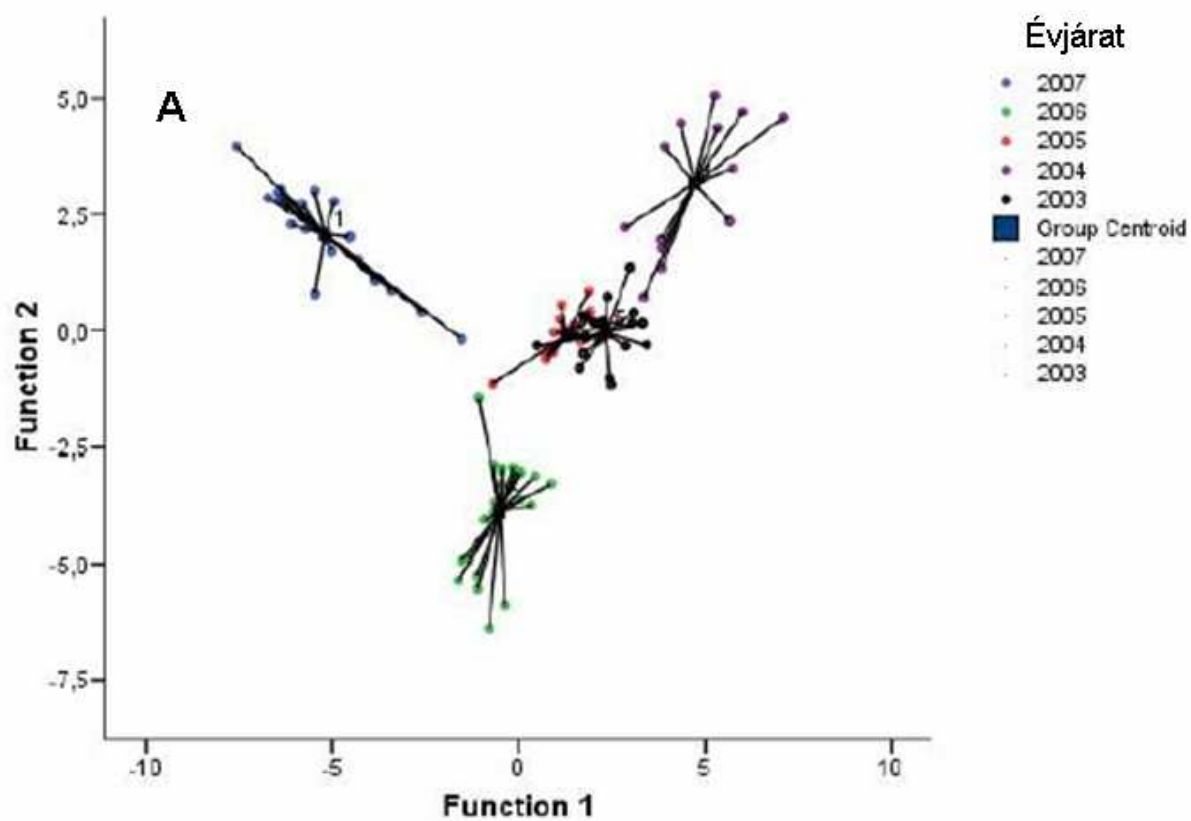
Az első csoport eredményei kielégítőek, a csoportok jól láthatóan elkülönülnek egymástól és a diszkrimináló értékeik is magasak. Ezzel szemben a második csoportról ez nem mondható el. Ezt bizonyítja az alacsony diszkrimináló értékek és az LOO teszt által adott alacsony megbízhatóság (mindössze 65%).

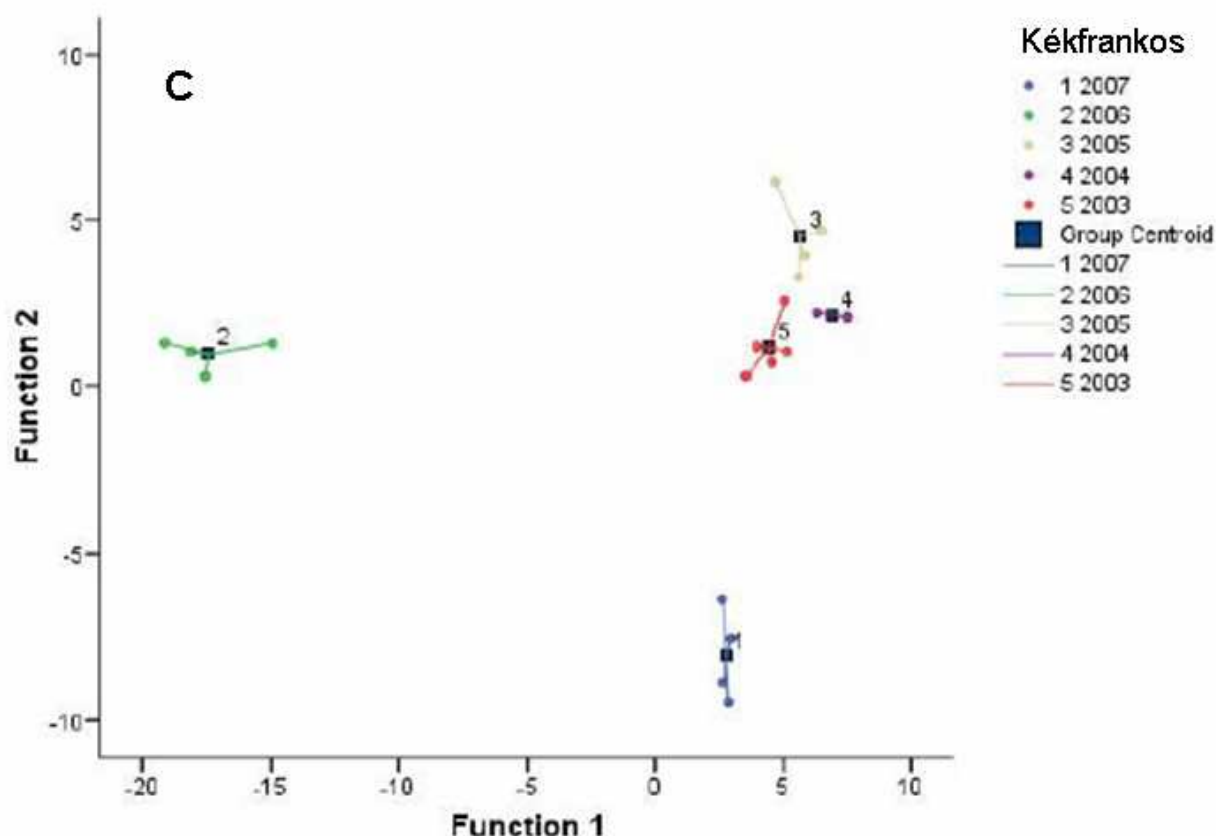
Évjárat szerinti besorolás

Ehhez a besoroláshoz 3 különböző adatsort vizsgáltunk. Az első (A) az összes elérhető bor adatai, a második (B) a Kék Zweigelt adatai, a harmadik (C) a Kékfrankos borok adatai voltak. Ebben az esetben a csoportos változók az évjáratok voltak (2003-2007), a független változók pedig a polifenolok koncentrációi. A Kékfrankost és a Kék Zweigelt azért választottuk külön, mert jól reprezentálják a kiválasztott autentikus bormintákat, de emellett jól reprezentálják az Ausztriában általánosan hozzáférhető vörösborokat is.

Ebben az esetben a diszkriminancia-analízis négy statisztikai függvényt eredményezett: **(DF 5_1. - DF 5_4, DF 6_1. - DF 6_4 és DF 7_1. - DF 7_4)**. Az LOO teszt 95 %-os megbízhatóságot adott az (A) csoport esetében és 100 %-ot a (B) és (C) csoport esetében. A **17.A, 17.B, 17.C ábra** mutatja a statisztikai értékelés eredményeit vizualizálva. Ebből is látszik, hogy az egyes évjáratok egymástól szépen elkülöníthetők a polifenol összetételük alapján.

Az évjáratból eredő hamisítás megakadályozása gazdasági szempontból nagy jelentőségű, lévén néhány ismert és kedvelt borfajta (Hispanic Reserva, Gran Reserva) csak bizonyos idő, esetenként több év elteltével értékesíthető és ez nagymértékben befolyásolhatja az árat.

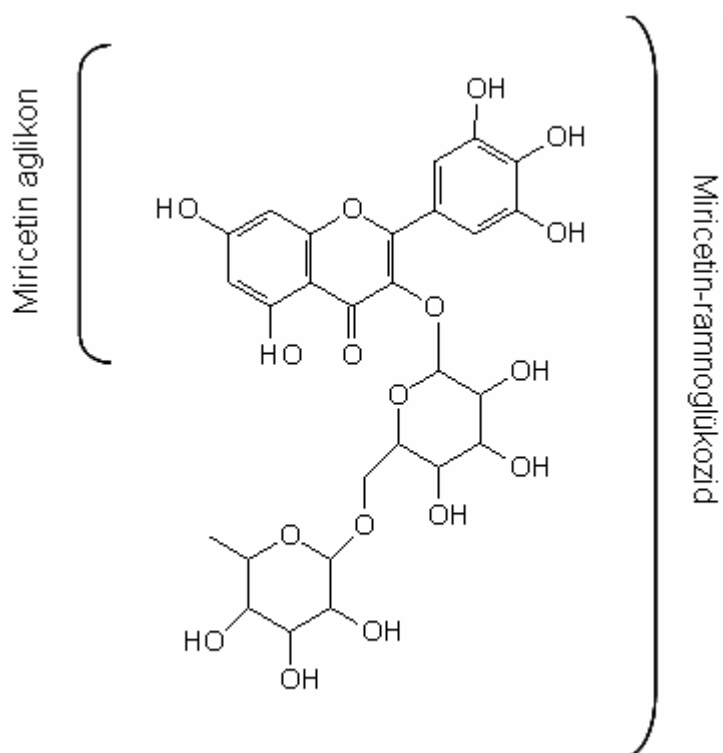




17. ábra A borok évjáratok szerinti statisztikai besorolásának ábrázolása, (A) az összes borfajta 2003-2007 között, (B) és (C) a két Ausztriában legelterjedtebb bor évjárat szerinti besorolásának ábrázolása

5.2. Háromlépéses flavonoid mono- és diglikozid azonosítási módszer

A módszer azon a tényen alapul, hogy minden flavonoid származék tartalmaz egy jellemző flavonoid alapvázat, amely mint egy címke, felhasználható az azonosításhoz. A miricetin esetét mutatja be a **18. ábra**. Minden miricetin-származék esetében ez a címke a miricetin alapváz. Tehát első lépésként arra fókuszáltunk, hogy az alapvázat - mintegy címkének használva - azonosítani tudjuk azon származékok aglikonjait, melyek a mintában előfordulhatnak. Eszerint a monitorozott komponensek számát ki lehetne terjeszteni az összes származékra, amivel az adott aglikon rendelkezik. De be kell látni, hogy az aglikonok száma messze meghaladja azt a mennyiséget, amely ésszerű keretek között egyetlen mérésbe befoglalható. Ezért előre meghatároztuk azon származékok körét, melyet vizsgálni kívánunk. Jelen esetben ezek öt, általánosan előforduló aglikonnak (apigenin, miricetin, luteolin, naringenin, kvercetin) a származékai voltak (lásd az **5. ábrán**).



18. ábra A miricetin ramnoglükozid szerkezeti felépítése

5.2.1. Első lépés bemutatása

Az alapvázak azonosításához MRM módszert használtunk. Vegyületenként két jellegzetes fragmensét választottunk az azonosításhoz. A módszer elvének sematikus rajza a **8. ábrán** látható. Az irodalom és a saját tapasztalatainkat felhasználva a negatív ionizációs módot alkalmaztuk ezen és a későbbi lépésekben egyaránt. Ennek oka, hogy negatív ionizációs módban a mérés érzékenyebb a flavonoidokra és származékaikra. Az MRM módszer beállításait standardok segítségével optimalizáltuk. Az optimálás során kapott paramétereket és standard kromatogramról leolvasott retenciós idők az **10. táblázatban** foglaltuk össze.

10. táblázat A standardok optimalizálása során kapott tömegspektrometriás paraméterek, **(a)**
a fragmentációs képek megértéséhez jegyzetként szolgál Ma és mtsi.

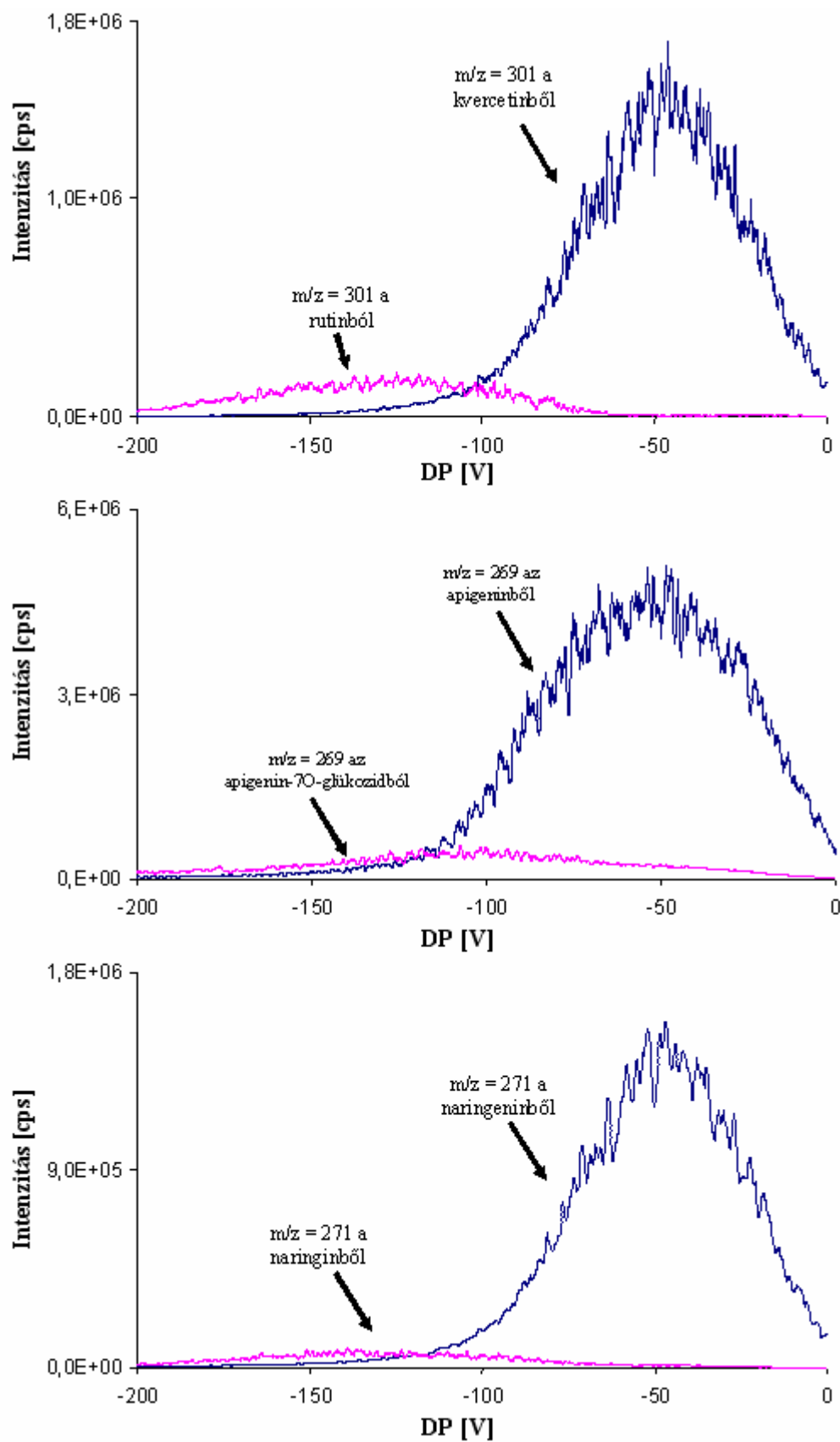
Célkomponens	Anyaiion [M-H] ⁻	Kiválasztott átmenetek és a fragmentációs utak képletei ^a	RT	DP	EP	CEP	CE1	CE2	CXP1	CXP2
Apigenin	269	117 (¹³ B ⁻) 149 (¹⁴ B ⁻ +2H)	30.7	-65	-4	-14	-42	-32	0	0
Naringenin	271	151 (¹³ A ⁻) 119 (¹³ B ⁻)	29.4	-45	-3	-14	-24	-32	-2	0
Luteolin	285	133 (¹³ B ⁻) 151 (¹³ A ⁻)	27.0	-65	-5.5	-22	-44	-34	0	0
Kvercetin	301	151 (¹³ A ⁻) 179 (¹² A ⁻)	26.5	-50	-4.5	-14	-28	-26	0	0
Minicetin	317	151 (¹³ A ⁻) 137 (¹² B ⁻)	21.3	-65	-5.5	-36	-34	-34	-2	0
Apigenin-7- glükózid	431	268 (A-2H ⁻) 117 (¹³ B ⁻)	21.7	-80	-8.5	-20	-42	-84	0	0
Naringin	579	271 (M-H ⁻) 151 (¹³ A ⁻)	21.5	-80	-10	-30	-40	-50	0	0
Rutin	609	300 (A-2H ⁻) 301 (A-H ⁻)	18.6	-90	-9	-20	-48	-40	0	-2

Ionforrásra kicsatolt feszültség: -4500 V

Ionforrás hőmérséklete: 350 °C

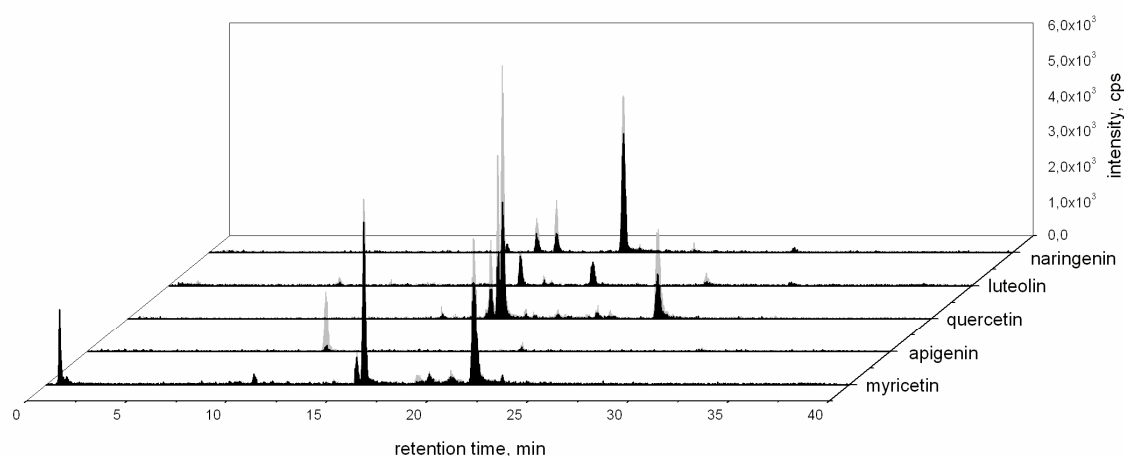
Szellőztető és porlasztógáz: 50 psi

Az MRM módszer lényegéből fakadóan nem tudjuk azonosítani a származék aglikonját, amíg az hozzákapcsolódik az anyamolekulához, ezért le kell szakítanunk azt róla, mielőtt az analizátorba érkezne. E célból használtuk ki az ionforrásban történő fragmentáció jelenségét. A beállítási paraméterek között szerepel az úgynevezett klaszter mentesítő potenciál (továbbiakban az angol 'declustering potential' megfelelője alapján DP), melynek célja a vizsgálandó molekulával az ionforrásban kialakuló molekula-klaszterek eltávolítása (Cuyckens, Claeys 2004). Ennek az értéknek extrém magasra állításával érhető el, hogy az aglikon leszakadjon az anyamolekuláról az ionforrásban. Az irodalomból már ismert jelenség, hogy magas fragmentációs energia alkalmazása esetén az aglikonnal megegyező fragmensek képződnek a különböző származékokból (Vukics, Guttman 2010). Többfajta flavonoid származéka és egyfajta alapmolekulának több származéka is várható egy mintából, melyekre kellett találni egy kompromisszumos DP értéket. Ezért három kiválasztott származékon teszteltük, hogy ez a feltétel megvalósítható-e. Az apigenin-7-O-glükózid, a naringin (naringenin-7-O-rutinozid) és a rutin (kvercetin-3-O-rutinozid) ionforrásban történő fragmentációját vizsgáltuk meg. Ezek a glikozidok reprezentálják a különböző aglikon és glikozid részt és a különböző térállású kapcsolódó molekulákat. A flavonoid standardokat egyenként juttattuk be az MS-be és csak az aktuális aglikon $m/z = [M-H]^-$ értékét detektáltuk egyszeres MS detektálással a DP függvényében. Az eredményt a **19. ábra** mutatja.



19. ábra A származékokból megjelenő aglikonok jelének intenzitása a DP függvényében.

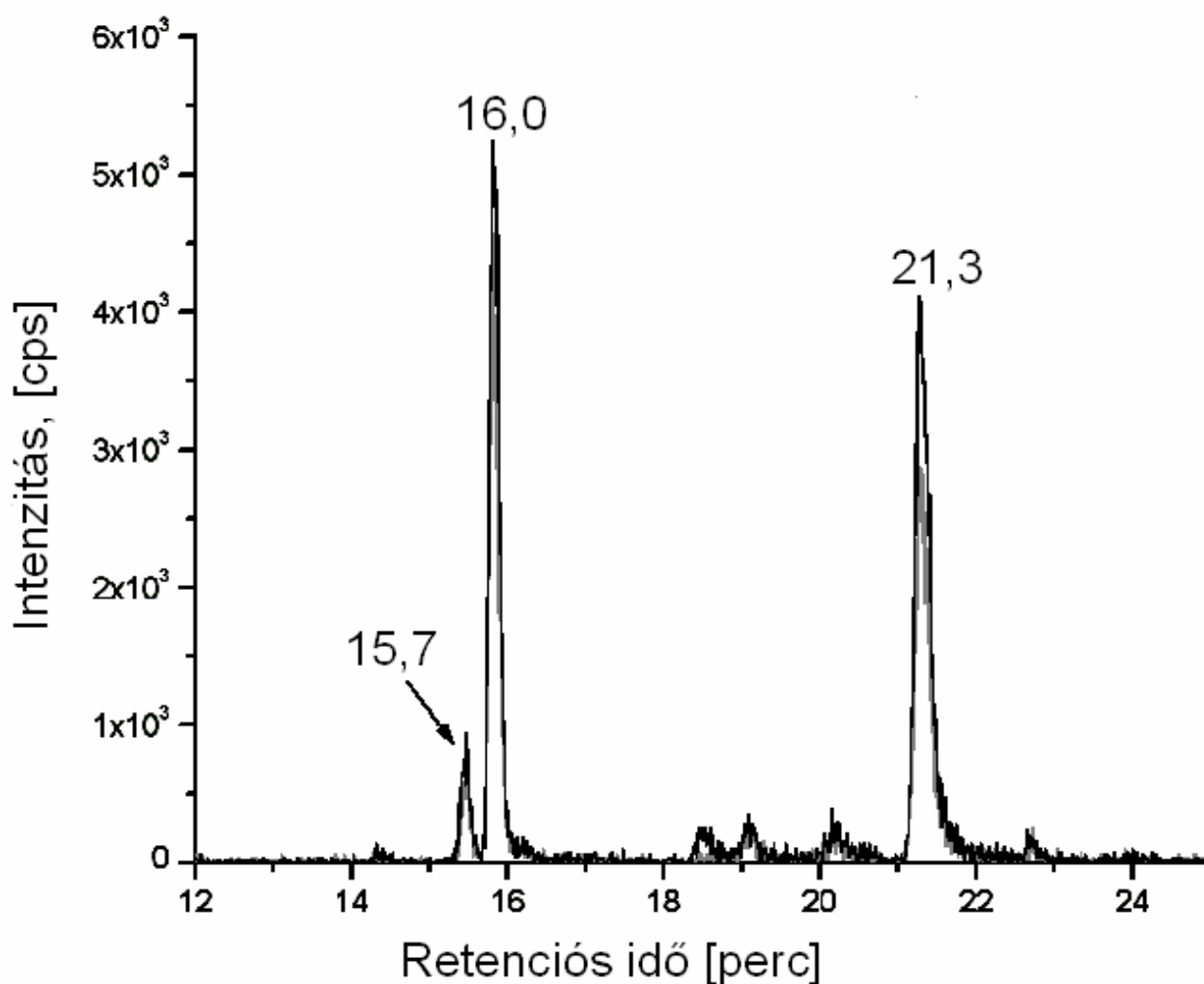
Mint a **19. ábrán** látható, a származékokból keletkező aglikonok intenzitása folyamatosan növekszik egy bizonyos maximum eléréséig. Ez a DP érték azonban jól láthatóan alatta van annak a maximum értéknek, mely az egyes származékokhoz tartozó eredeti aglikonokat jellemzi. Azonban még a maximum környékén is ionforrásban történő fragmentáció hatásfoka mindössze 5-10 %. Mindettől függetlenül a maximum értékek nem mutatnak túl nagy eltérést, függetlenül a különböző alapvázaktól, cukroktól és a kapcsolódó molekulák térállásától. Ezért van lehetőség egy kompromisszumos DP érték kiválasztására. Kompromisszumos DP értéknek a -120 V-ot választottuk és ezt az értéket állítottuk be az MRM módszerben. Ezután, a módszer teszteléseképpen, kipróbáltuk azt a feketeteribiszke nektáron. A kapott kromatogramon az ötfajta aglikon monitorozása látható (**20. ábra**).



20. ábra A monitorozás során az összes aglikonra kapott kromatogramok együttes ábrázolása.

A **20. ábrából** látható, hogy az apigenint leszámítva mindegyik aglikon több retenciós időnél is megjelent (az ábra szerinti sorrendben luteolin, miricetin, naringenin és kvercetin). Az apigenin esetében csak az aglikont (30.7 percnél) sikerült kimutatni, azt is csak nyomokban, a másik eluálódott komponens (11.9 percnél) pedig nem apigenin származék. Általában az aglikon eluálódik utoljára, mint a legkevésbé poláros komponens, amit a kapcsolódó poláros molekulák - mint például a cukrok - hiánya okoz. Az aglikonok mellett található többi csúcs, melyek azonos MRM átmeneteket adnak, és mind a kettőnek az aránya hasonló, joggal feltételezhetően

valamilyen származékai (például glikozidjai) az alap molekulának. A **21. ábrán** látható a miricetin két átmenete.

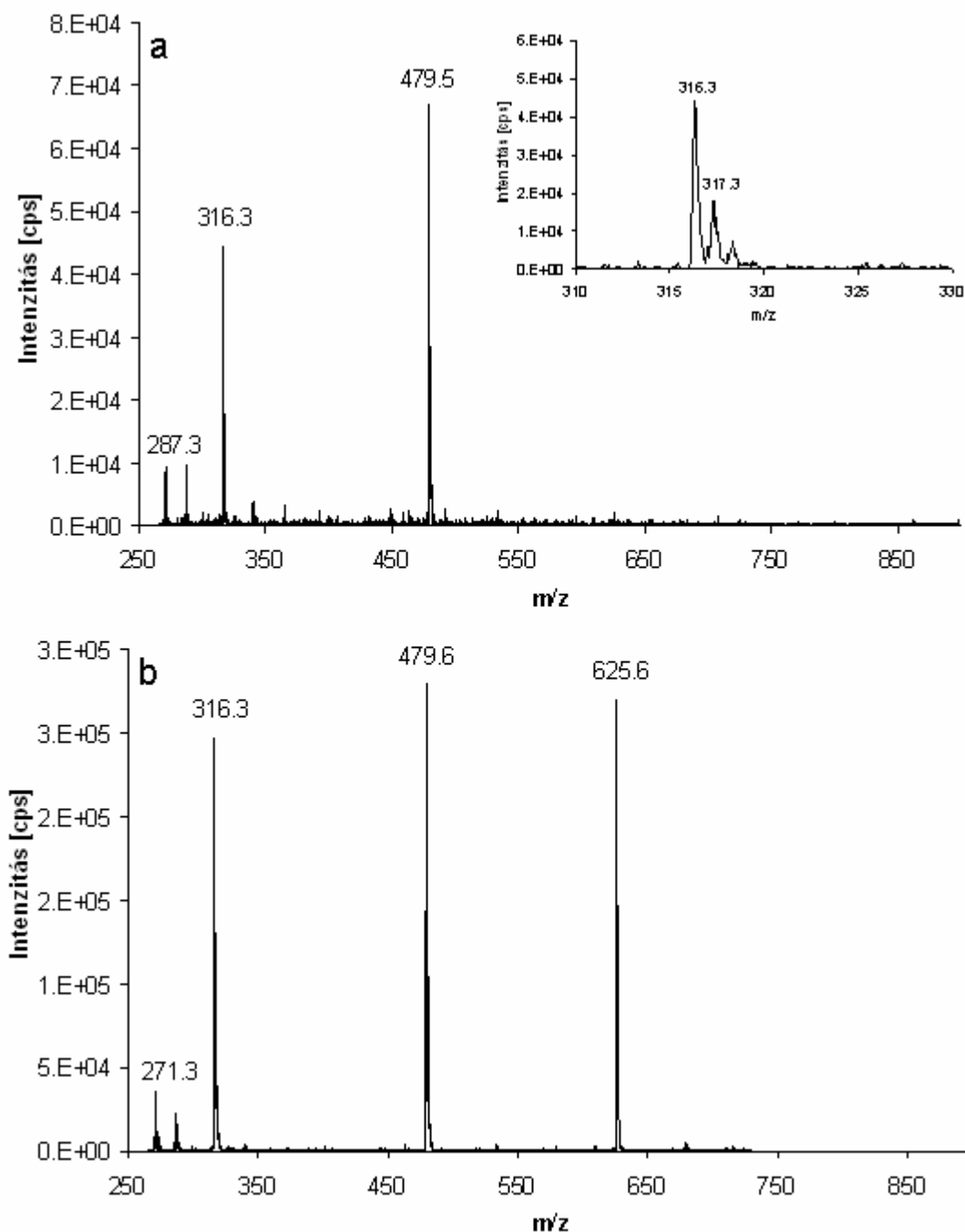


21. ábra A miricetin MRM kromatogramja.

Mint látható, három retenciónál kaptunk jelet mind a két átmenetre (15,7, 16,0 és 21,3 percnél). A tömegspektrometriában általánosan elfogadott minőségi azonosítási protokoll szerint, ha egy anyagra jellemző két fragmens egyazon időpillanatban szolgáltat jelet, akkor az ott eluálódó vegyület részét képezi a detektált komponens, jelen esetben a miricetin. A retenciós idők alapján a 21,3 percnél megjelenő vegyület az aglikon. A további két csúcs a legnagyobb valószínűség szerint valamilyen származékai a miricetinnek, melyekről az ionforrásban leszakadt az alapváz. Ennél a pontnál csak annyit tudni ezekről a vegyületekről, hogy feltételezhetően polárosabbak az alapváznál, hiszen fordított fázisú kromatográfiás körülmények között attól előbb eluálódnak. Az eddig leírt MRM módszer után a következő lépésben további információkat kellett szerezni a talált komponensekről. Az ezután következő lépéseket a miricetin példáján keresztül mutatjuk be.

5.2.2. Második lépés bemutatása

Az első lépés után meg lehet állapítani, mely aglikonok származékai találhatók a mintában, de további információt nem szolgáltat róluk. Ez az oka annak, hogy második lépésként $m/z = 250$ - 900 -ig egy monitorozást végeztünk, azonos kromatográfiás beállítások mellett. A módszer elvének sematikus rajza a **9. ábrán** látható. Az **22. ábra** mutatja be az ismeretlen komponensek így módon felvett spektrumát.



24. ábra Ismeretlen miricetin származékok $m/z = 250$ - 900 -ig felvett tömegspektruma.

Az $m/z = 479$ mellett mind a két csúcs esetében megtalálható az $m/z = 316$ és 317 . E két utóbbi megegyezik az ionforrásban a nagy DP hatására leszakadó miricetin aglikon fragmens m/z -vel. Az $m/z = 317$ megfelel az ionforrásban lehasadó alapváz $[M-H]^-$ fragmensének, míg az $m/z = 316$ megfelel az ugyanott gyökösen lehasadó alpmolekula $[M-2H]^-$ fragmensének (Vukics, Guttman 2010). Az előzetes méréseink alapján azt tapasztaltuk, hogy a gyökös aglikon nagyarányú megjelenését a magas DP érték okozza, és aránya a B gyűrű hidroxiláltsági fokával nő. Ez egybevág az irodalomban publikáltakkal (Ding et al. 2008, Cuyckens, Claeys 2004). Nagy negatív értékek esetén ($<-80V$) a gyökös változat aránya kiemelkedően megnő.

A miricetin aglikonhoz köthető csúcsok mellett még van néhány meghatározó tömegcsúcs az ismeretlenek spektrumában. Ezek a tömegek (15,7 percnél az $m/z = 479$, 16,0 percnél az $m/z = 479$ és 625) utalhatnak az eredeti molekulákra. A 15,7 percnél lévő miricetein származék esete relatíve egyszerű. Itt csak egy domináns csúcs van (az $m/z = 479$) az aglikon mellett. A különbség a két tömeg között 162 Da. Valószínűsíthetően a 162 Da vesztese egy hexozid molekula lehasadását jelenti, amely eredetileg glikozidos kötéssel csatlakozott az alpmolekulához. A 16,0 percnél jelentkező ismeretlen komponens esetében két domináns csúcs található az aglikoné mellett és ez némileg bonyolítja a dolgot. Egyfelől elképzelhető, hogy egyetlen komponens ad jelet ennél a retenciónál. Ebben az esetben a legnagyobb tömegű csúcs ($m/z = 625$) az eredeti molekula deprotonált ionját, a második legnagyobb tömegű csúcs ($m/z = 479$) egy másik fragmens, és az $m/z = 316$ és 317 pedig az aglikon tömegét jelöli. Az eltérés 146 Da az $m/z = 479$ és $m/z = 625$ között, ami megfelel egy dezoxihexóz csoport elvesztésének. A kezdeti gondolatmenetet követve ez a molekula valószínűleg egy kettős glikozid, feltételezhetően egy miricetin-hexóz-dezoxihexóz. Itt meg kell jegyeznünk, hogy az elmélet ideiglenesen azon alapul, hogy az egy kromatográfiás csúcsban megjelenő fragmensek egymásból származnak, például az alacsonyabb tömegszámú fragmensek a nagyobbakból keletkeznek az ionforrásban. Másfelől lehetséges, hogy a megjelent fragmensek egymástól teljesen különböznek és két különböző vegyületből származnak, melyek részben vagy teljesen együtt eluálódnak az elégtelen elválasztás következtében. Az előzőekben leírt bizonytalanságok megszüntetésére egy harmadik MS módszert dolgoztunk ki.

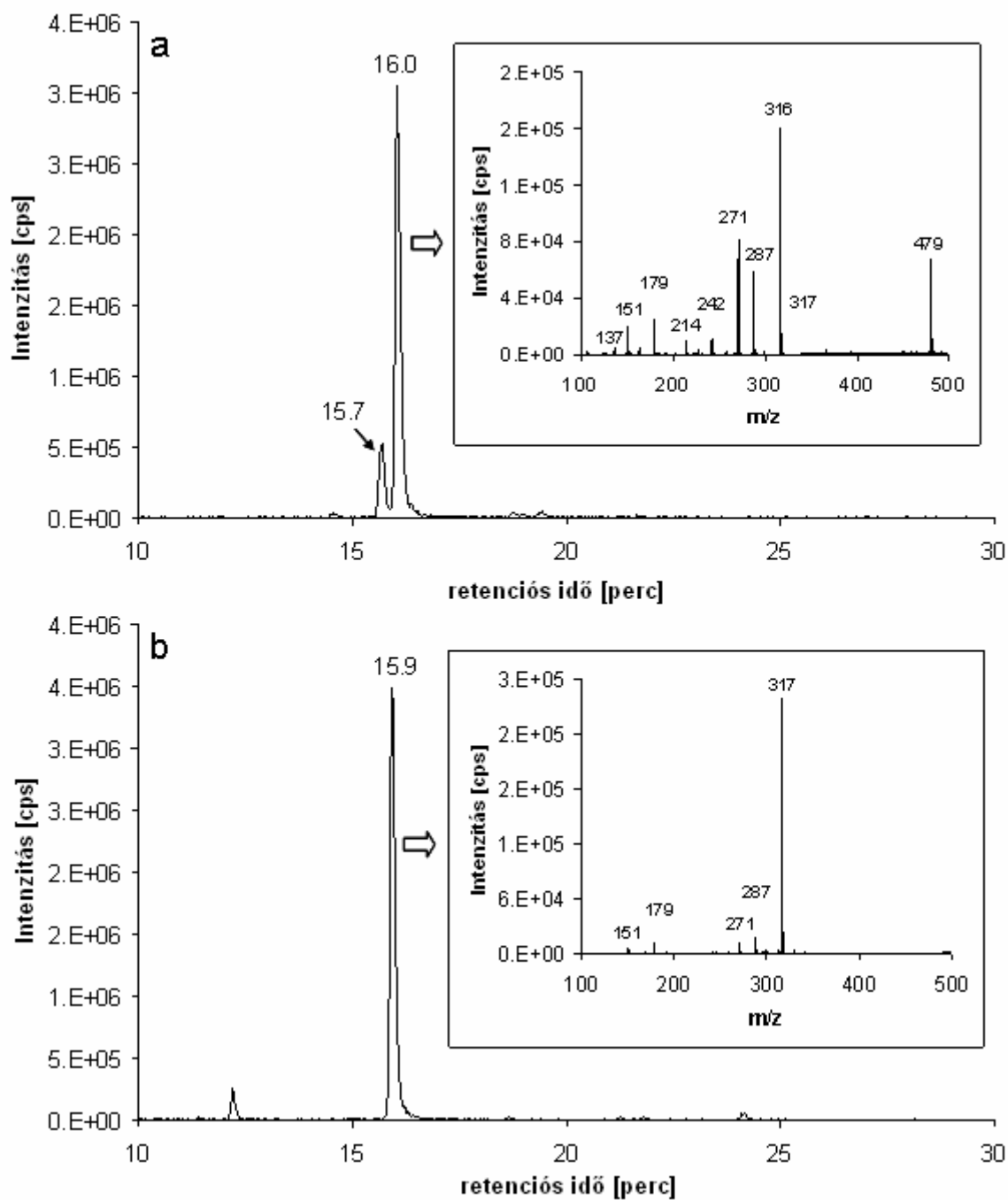
5.2.3. Harmadik lépés bemutatása

A harmadik lépésben azokat a tömegeket elemeztük, melyek a második lépés alapján, feltételezhetően a különböző származékokhoz tartoznak. Ez a lépés a kiválasztott tömegek termékion (az angol 'endhance product ion' kifejezés rövidítése alapján: EPI) spektrumának

felvételén alapul. A módszer elvének sematikus rajza a **10. ábrán** látható. Ez a harmadik lépés nem foglalható bele az első két lépésbe, hiszen a vizsgálni kívánt tömegszámok előzetesen nem ismertek. Ez teszi szükségessé egy harmadik független kromatogram lefuttatását. A termékion-spektrum felvételéhez EPI pásztázást használtunk, aminek az érzékenysége nagyobb az eddigi lépéseknél, mivelhogy ebben az esetben a harmadik kvadrupol úgy működik, mint egy lineáris ioncsapda. Az EPI spektrumokat $1000 \text{ amu} \cdot \text{sec}^{-1}$ monitorozási sebességgel (ez egy köztes érték) vettük fel. Tapasztalataink alapján ennél a sebességnél a monitorozott tömegszámok száma nem haladhatja meg a négyet egy futtatáson belül, ennél több olyan hosszú ciklusidőt eredményezne, ami már a megbízható szint alá csökkentheti az érzékenységet.

A miricetin példájánál maradva az $m/z = 479$ és 625 vizsgáltuk meg ezzel a módszerrel. Az így készült termékion spektrumot a **23. ábra** mutatja be, melyen a 15,9 illetve a 16,0 percnél érkező csúcst ábrázoltuk.

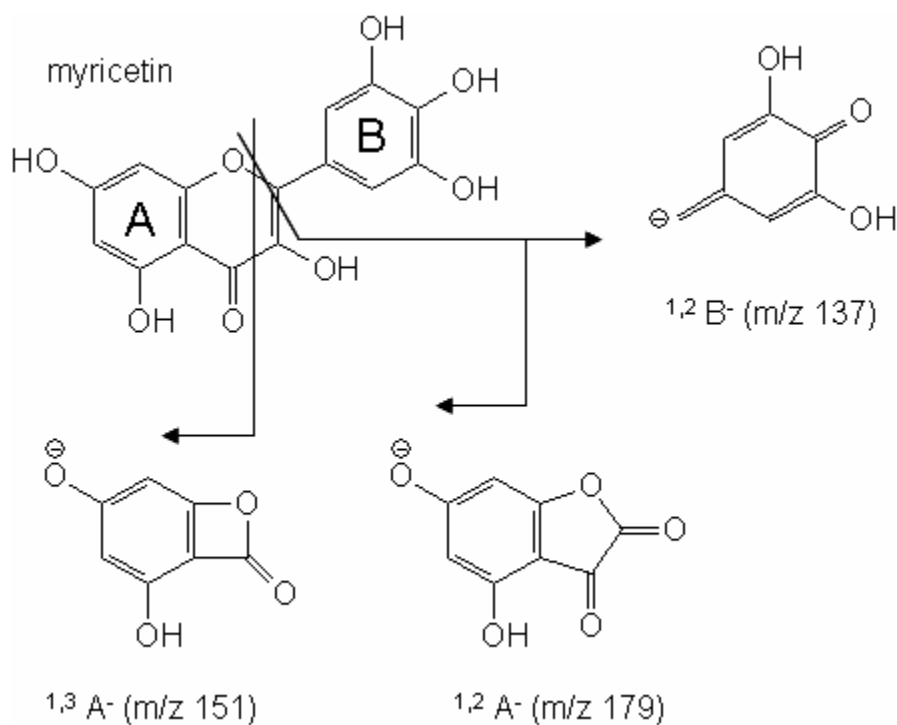
A **23/a. ábrán** látható két csúcs két különböző izomerje a miricetin-hexozidnak. Tehát $1,8 \mu\text{m}$ alatti töltettel rendelkező RP-HPLC oszlop sikeresen használható szerkezeti izomerek elválasztásához. Ezzel ellentétben a **23/b. ábrán** látható 15,9 percnél eluálódó ($m/z = 625$) miricetin-hexóz-dezoxihexozid nem tudott tisztán elkülönülni a 16,0 percnél jelentkező miricetin-hexozidtól. Ez a példa tisztán rávilágít arra a problémára, hogy - még a nagy felbontású kromatográfia ellenére is - ez a végső lépés nélkülözhetetlen az együtt eluálódásból eredő hibák kizárásához. Ez a harmadik lépés további információkat szolgáltat az azonosított komponensről. Mint a **23/b. ábrán** látható termékion spektrumból kitűnik, itt nem jelent meg az $m/z = 479$ csúcs. Ez egy újabb bizonyíték az együtt eluálódás mellett.



23. ábra Az (A) $m/z = 479$ és (B) $m/z = 625$ EPI kromatogramja és a detektált csúcsok tömegspektrumai.

Ezek mellett néhány karakterisztikus fragmens is megjelenik a spektrumban. Például: az $m/z = 317$ megfelel az egyszerűen deprotonált, párosított elektronokkal rendelkező miricetin aglikon fragmentjének. Az $m/z = 317$ fragmens intenzitása jóval magasabb, ha az ütközési cellában állítjuk elő azt N_2 gáz segítségével -30 eV energia felhasználásával (ezt használtuk általános értéknek), mintha ugyanezt az ionforrásban tennénk. Ezen kívül az aglikontól kisebb m/z -vel

rendelkező fragmensek is jellegzetesek. $m/z = 179$ ($^{1,2}A^-$) és 151 ($^{1,3}A^-$) tipikusan a flavon-3-ol vegyületekből, a retro Diels-Alder (RDA) reakció során, az A gyűrűből keletkező fragmensek míg az $m/z = 137$ ($^{1,2}B^-$) ugyanilyen módon keletkezik a B gyűrűből. Ez azt jelenti, hogy ezek a fragmensek együtt a 317-sel egyértelműen a miricetinre jellemzőek. A miricetin lehetséges fragmentációs útjait a **24. ábra** mutatja be.



24. ábra A miricetin lehetséges fragmentációs útvonalai.

5.2.4. A mintában talált komponensek

A leírt 3 lépéses módszer segítségével 13 flavonoid vegyületet sikerült azonosítani. 3 miricetin, 2 luteolin és 3 kvercetin származékot valamint az aglikonokat. A naringenin és az apigenin esetében csak az aglikonokat sikerült azonosítani.

A luteolin esetében 3 csúcs jelentkezett az első lépésnél, amelyek közül az utolsó az aglikon volt. A másik kettő, 17,8 és 21,3 percnél, a második lépés alapján, feltételezhetően luteolin-hexozidok ($m/z = 447$) voltak. Ezt a feltételezést a harmadik lépés megerősítette.

A kvercetin esetében az MRM monitorozás 18,4, 18,7, 19,0 és 26,7 percnél adott csúcsot. Ebben az esetben is az utolsó csúcs az aglikoné. A 18,4 és 19,0 percnél talált komponensek a teljes tömegspektrum monitorozása alapján kvercetin-hexozidoknak tűntek ($m/z = 463$). Ugyanígy a 18,7 percnél megjelenő komponens kvercetin-hexóz-dezoxihexozidnak ($m/z = 609$) látszott. A harmadik lépés ezeket is megerősítette. Ezen kívül az $m/z = 609$ komponens retencióját

összehasonlítottuk a rutin standard retenciós idejével és a kettő egyezést mutatott. Ezért kijelenthetjük, hogy a megtalált komponens egy kvercetin-3-O-rutinozid, amit általában rutinnak hívnak.

5.3. Kétlépéses flavonoid származék azonosítási módszer

Célunk egy olyan kereső módszer kidolgozása volt, melynek segítségével, az eddigiekkel szemben, nem csak mono- és diglikozoidjait tudjuk meghatározni az egyes flavonoidoknak, hanem ezeknél nagyobb, összetettebb származékaikat is.

5.3.1. A módszer elvének bemutatása

A mérés elve ebben az esetben is az, hogy az ionforrásban történő fragmentációt használjuk ki. Mint már említettük, az úgynevezett klasztermentesítő potenciált (DP), ami a molekulákra tapadt klaszterek eltávolítására szolgál az ionforrásban, olyan magas értékre kell állítani, hogy az aglikonokat is leszakítsa a molekuláról. Itt törekedni kell arra, hogy ez a szint ne érje el azt az értéket, ami már a leszakadó aglikont is károsítja. Ez az optimum minden egyes vegyületre más és más, de vegyületcsoportonként, mint például a mono- vagy a diszacharidok, található olyan kompromisszumos érték, melynek közelében az adott vegyületcsoport tagjainak optimumai találhatók.

Első lépésként, a különböző flavonoid-származék standardok segítségével MRM módszert dolgoztunk ki azok detektálására. A **11. táblázat** mutatja a származékok optimálásának eredményeit. A két legerősebb átmenetet tüntettük fel. Az irodalmi adatoknak megfelelően (Vukics, Guttman 2010) a két átmenet közül az egyik mindig megegyezik a származék aglikonjának tömegével. Ennek a későbbiek során lesz még jelentősége.

11. táblázat Az 5.3-as fejezetben használt flavonoid származékok tömegspektrometriás optimálása során kapott értékek

Célkomponens	MT	Mennyiségi átmenet	Minősítő átmenet	RT	Ionizációs mód	DP	EP	CEP	CE1	CE2	CXP1	CXP2
robinin	740	593	283	27,5	negatív	-100	-7	-28	-34	-76	-8	-2
kempferol-3-O-glükozid	448	284	255	32,2	negatív	-95	-7,5	-16	-34	-50	-6	-2
kvercitrin	448	300	301	31,9	negatív	-80	-6	-22	-32	-30	-4	-4
hiperoxid	464	300	301	28,0	negatív	-95	-5,5	-22	-40	-30	-4	-8
izokvercitrin	464	300	301	28,5	negatív	-100	-4	-18	-36	-32	-4	-4
luteolin-7-O-glükozid	448	285	284	27,2	negatív	-120	-4	-22	-36	-48	-4	-4
naringin	580	271	151	28,2	negatív	-110	-7,5	-30	-46	-54	-4	0
heszperidin	610	301	164	29,4	negatív	-95	-5	-32	-32	-68	-4	0
rutin	610	300	301	28,4	negatív	-110	-5,5	-32	-50	-42	-4	-4

Második lépésként az aglikonok standardjaira dolgoztunk ki MRM módszert. Minden vegyületnél a két leggyakoribb átmenetet optimaltunk. Ezek az eredmények a **12. táblázat** mutatja be.

12. táblázat Az 5.3-as fejezetben használt aglikonok tömegspektrometriás optimálása során kapott értékek

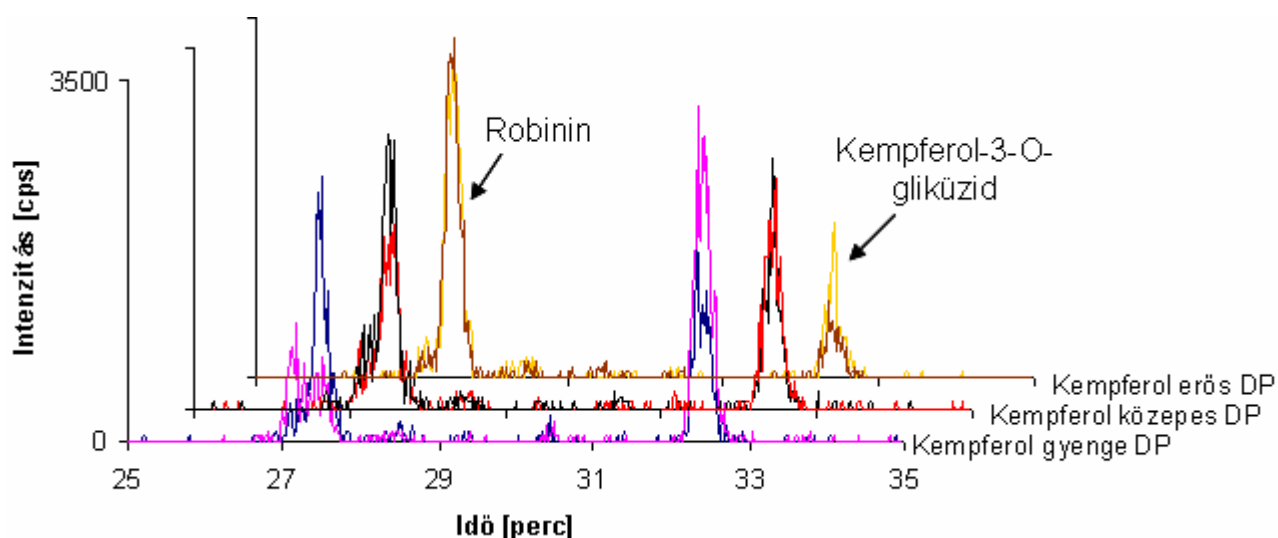
Célkomponens	MT	Mennyiségi átmenet	Minősítő átmenet	Ionizációs mód	DP	EP	CEP	CE1	CE2	CXP1	CXP2
apigenin	270.2	117	149	negatív	-65	-4	-14	-42	-32	0	0
naringenin	272.0	177	119	negatív	-45	-3	-14	-24	-32	-2	0
luteolin	286.0	133	151	negatív	-65	-5.5	-22	-44	-34	0	0
quercetin	302.2	151	179	negatív	-50	-4.5	-14	-28	-26	0	0
myricetin	318.0	151	137	negatív	-65	-5.5	-36	-34	-34	-2	0
heszperetin	302.0	164	136	negatív	-75	-3.5	-14	-32	-30	-2	-2
fisetin	286.0	135	121	negatív	-55	-7	-18	-30	-22	-2	0
daidzein	254.0	133	132	negatív	-70	-7	-38	-50	-42	0	0
genistein	270.0	133	159	negatív	-85	-5	-16	-38	-50	0	0
kaempferol	286.0	117	93	negatív	-60	-3	-16	-58	-48	-2	0

Ezt követően az egyes csoportokhoz tartozó azon DP értékeket kerestük, negatív ionizációs módban, ahol az anyamolekulából a legtöbb aglikon keletkezik. Ehhez az **13. táblázatban** bemutatott származékokat használtuk fel. A kompromisszumos értékek meghatározását ugyanazzal a módszerrel végeztük el, mint az 5.2 pontban (**19. ábra**). Az egyes vegyületekhez tartozó azon DP értékek, ahol a legtöbb aglikon keletkezik, a **13. táblázatban** láthatók. A későbbiek során ezeket a lehasadó aglikonokat detektáltuk.

13. táblázat Az egyes flavonoid származékokhoz tartozó optimális DP értékek

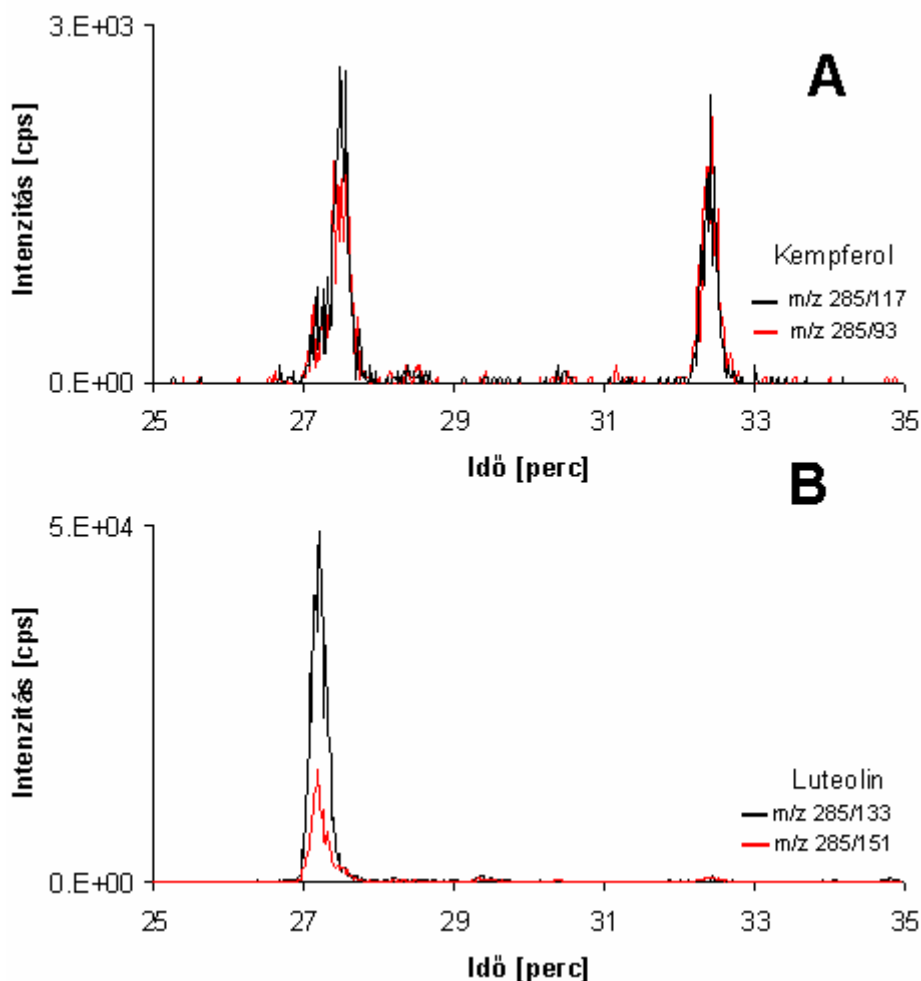
Célkomponens	optimális DP érték [V]
robinin	-195 (+/-10)
kempferol-3-O-glükózid	-140 (+/-15)
kvercitrin	-140 (+/-15)
hiperozid	-130 (+/-10)
izokvercitrin	-130 (+/-10)
luteolin-7-O-glükózid	-150 (+/-15)
naringin	-165 (+/-10)
heszperidin	-160 (+/-10)
rutin	-155 (+/-15)

A kétféle eljárás során kapott eredményeket úgy kombináltuk össze, hogy az aglikonok optimálása során kapott DP értékeket elhagytuk és azzal az értékkel helyettesítettük, melyet, mintegy kompromisszumos megoldásként, akkor kaptunk, amikor a származékokból leszakadó aglikonok mennyiségét optimaltunk. A többi értéket változatlanul hagytuk. A **13. táblázatból** kitűnik, hogy ez a kompromisszumos érték az alapvázhoz kapcsolódó molekulák számával változik, és jelentősen eltérhet mono- vagy diszaharidok vagy még összetettebb molekulák esetén. Ez azt jelenti, hogy nem állapítható meg egyetlen kompromisszumos érték, mivel az érzékenység egyes vegyületekre nagymértékben csökkenhet. Ezért az ugyan kis koncentrációban, de jelenlévő komponenseket nem érzékelné a módszer. Ezért az optimális értéket tömegtartományonként állapítottuk meg a **13. táblázat** alapján. Ezek a következők lettek: monoglikozidokra ($m/z = 385-500$ között) -125 V, diglikozidokra ($m/z = 500-700$ között) -160 V, az ezektől összetettebb molekulákra ($m/z = 700-1000$) -195 V. Ez azt jelenti, hogy minden egyes átmenetet 3 különböző DP értékkel mértünk. Ez aglikononként 6 MRM-t jelent. Ezzel sikerült elérni azt, hogy a nagyobb molekulákról is le tudjuk hasítani az aglikont, melyek a kis DP értéknél nem jelennének meg. Ugyanakkor detektálni tudjuk a kisebb molekulákból származó aglikonokat, melyek erős DP mellett már szétesnek. Ezt ábrázolja a robinin és a kempferol-3-O-glükózid példáján keresztül a **25. ábra**. A robininből (ami egy triglikozid) származó aglikonok intenzitása növekszik az erősebb DP használatával, míg a kempferol monoglikozidja esetén ez a hatás ellentétes. Ezt a módszert használtuk az első futtatások alatt. Így meg tudjuk állapítani, milyen fajta származékok lehetnek jelen a mintában.



25. ábra A robinin és a kempferol-3-O-glükózidból származó kempferol aglikon fragmentek MRM monitorozása három különböző DP értéken.

Ami ebben az esetben külön említést érdemel azok az izomerek, mint amilyen a heszperetin-kvercetin, vagy a luteolin-kempferol esete. Az aglikonok névleges tömege mind a két esetben megegyeznek (heszperetin-kvercetin esetében 302, kempferol-luteolin esetében 286). Míg a heszperetin-kvercetin páros összegképlete eltérő, de ennek ellenére névleges molekulatömegük megegyezik, addig a kempferol-luteolin páros esetében szerkezeti izomerekről van szó, azaz elemösszetételük teljesen azonos. Így ezeket tömegük alapján nem lehet megkülönböztetni (azonos összegképletük miatt a kempferol-luteolin esetében ez még nagy tömegfelbontással sem valósítható meg). De eltérő szerkezetük miatt másképpen fragmentálódnak, ezért az egyes vegyületek fragmentációs képe más és más lesz. Ebből kifolyólag minden esetben mások lesznek a jellemző fragmentumok. Ezért jó eséllyel minden anyag esetében találunk olyan jellemző átmeneteket, melyek különböznek egymástól, de ezek nem feltétlenül a legintenzívebbek. Erre egy szemléltető példa a luteolin-kempferol esete (**26. ábra**).



26. ábra Azonos koncentrációjú glikozid standardokon elvégzett (A) kempferol (B) luteolin aglikon MRM monitorozás kromatogramjai.

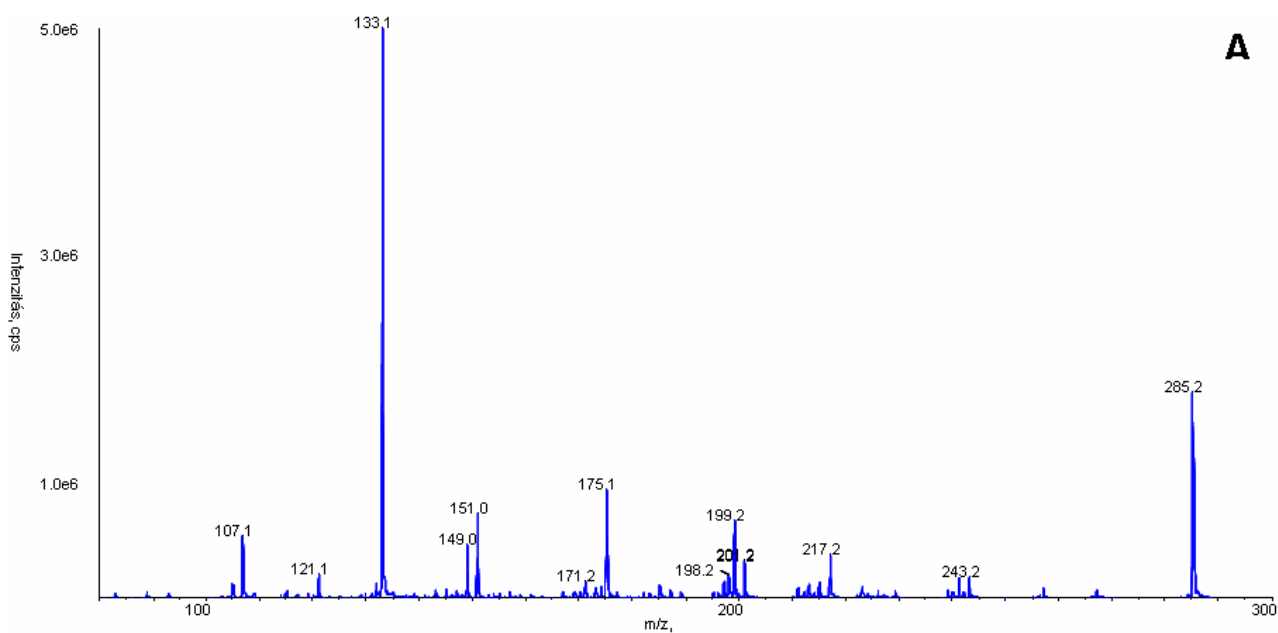
Jól látható, hogy a megfelelő átmenetválasztásnak köszönhetően a luteolin nem ad jelet a kempferol származékok esetében és a két vegyület átmeneteinek együttes értékelésével megkülönböztethetők a kérdéses komponensek. Ez annak a fényében is érdekes, hogy a kempferol köztudottan rosszul fragmentálódik, számos fragmense van, melyek intenzitása között nincs szignifikáns különbség. A probléma akkor van, ha olyan fragmens keletkezik, amely az egyik anyagra jellemző, a másakra nem, de elég nagy mennyiségben keletkezik belőle ahhoz, hogy a mérésünket zavarja. Mind a két vegyületre jelezni fog a készülékünk. Mivelhogy a vegyületeket az átmeneteik alapján tudjuk megkülönböztetni, az első lépésben nem fogjuk tudni eldönteni, hogy melyik a valós. Hogy ezen problémákat kiküszöböljük, minden anyagból egyszerre két átmenetet mérünk és csak abban az esetben jelentettük ki egy anyagról egyértelműen, hogy ez mely flavonoidnak a származéka, ha mind a két átmenet egyszerre adott jelet. Ezt a kérdést érdemes egy kicsit jobban is megvizsgálni. A **27. ábrán** látható a luteolinnak és a kempferolnak a fragmentáció során felvett tömegspektruma. Ezekből jól látható a két vegyület fragmentációs tulajdonságai közti

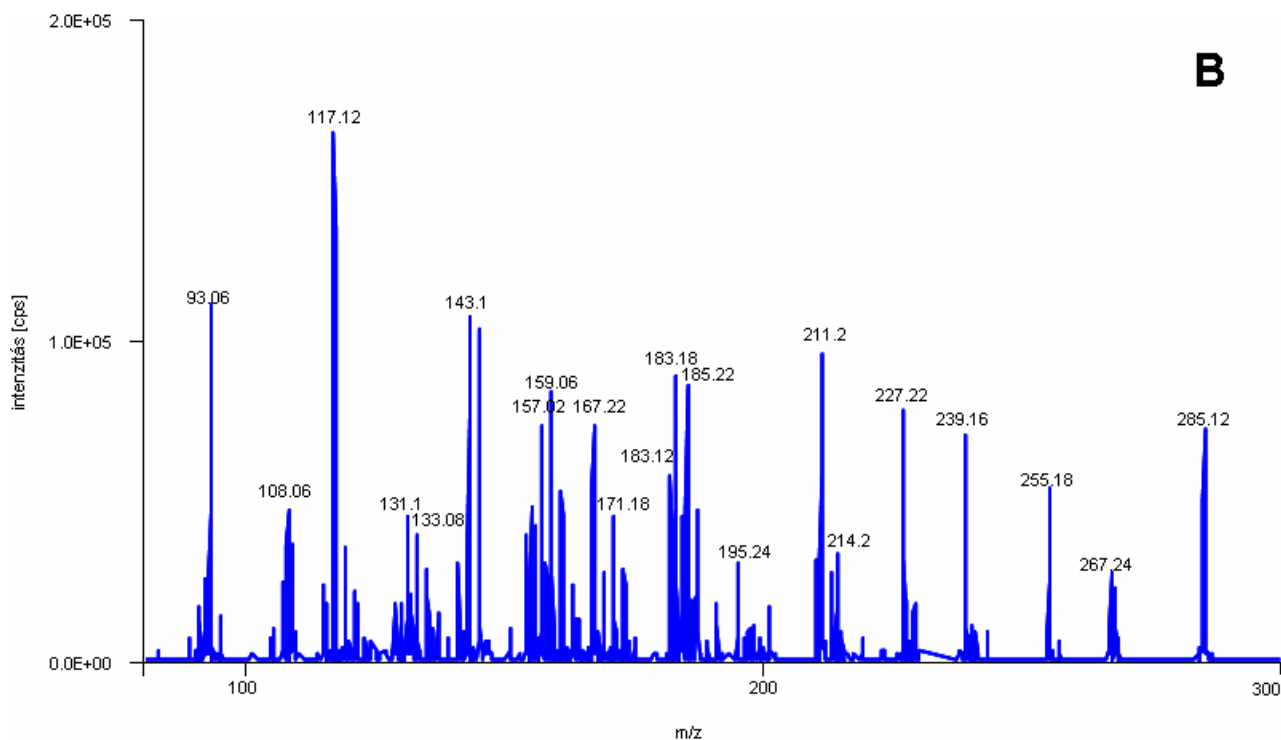
különbség. Míg a luteolin kevés jellegzetes fragmenssel rendelkezik, addig a kempferol hasadása során számos egymáshoz viszonyítva nagy intenzitású termék keletkezik. A domináns fragmenseket a **14. táblázatban** foglaltuk össze.

14. táblázat A luteolin és kempferol fragmentálása során keletkezett jelentősebb fragmensek és fragmentációs utak a 27. ábra alapján. Vastagítva jelölve a méréshez kiválasztott átmenetek.			
Luteolin		Kempferol	
<i>m/z</i>	<i>fragmentációs út</i>	<i>m/z</i>	<i>fragmentációs út</i>
107	^{1,3} A-CO ₂	93	C ₆ H ₅ O (ez valószínűleg a B gyűrű)
121		108	
133	^{1,3} B ⁻	117	C ₈ H ₅ O (elképzelt, hogy a 267-esből keletkező fragmens, amely a B gyűrűt is tartalmazza)
149		119	
151	^{1,3} A ⁻	131	
175	[M-C ₂ H ₂ O-CO ₂ -C ₂ H ₂ O]-	133	
199	[M-C ₂ H ₂ O-CO ₂]-	143	
201		145	
217	[M-C ₃ O ₂]-	155	
285	[M-H]-	157	
		161	
		167	
		171	
		183	
		185	
		187	
		195	
		210	
		211	[M-CO ₂ -CO-H ₂]-
		214	
		227	[M-2CO ₂ -H ₂]-
		239	[M-CO ₂ -H ₂]-
		255	[M-CO-H ₂]-
		267	[M-H-H ₂ O]-
		285	[M-H]-

A két spektrumból és a táblázatból is látszik, hogy a kempferol átmeneteinek kiválasztása nem ütközik különösebb nehézségekbe lévén a két legintenzívebb fragmense esetében ($m/z = 93$ és 117) nincsen a luteolinból származó interferencia. Ezért ezt a két átmenetet választottuk ki az azonosításhoz. Ellenben a luteolin esete ennél bonyolultabb, hiszen kevés jellegzetes fragmenssel rendelkezik és ezek jó része zavart a kempferol által. Luteolin esetében kézenfekvő lenne az $m/z = 133$ kiválasztása, lévén ez a legintenzívebb átmenet, de figyelembe kell vennünk azt a tényt is, hogy ez a fragmens, ugyan lényegesen kisebb intenzitással, de a kempferolból is keletkezik. Ez azt a veszélyt hordozza magában, hogy egy esetleges kempferol származékot is luteolin vegyületként azonosíthatunk. Ha viszont figyelembe vesszük azt a tényt, hogy a már kiválasztott

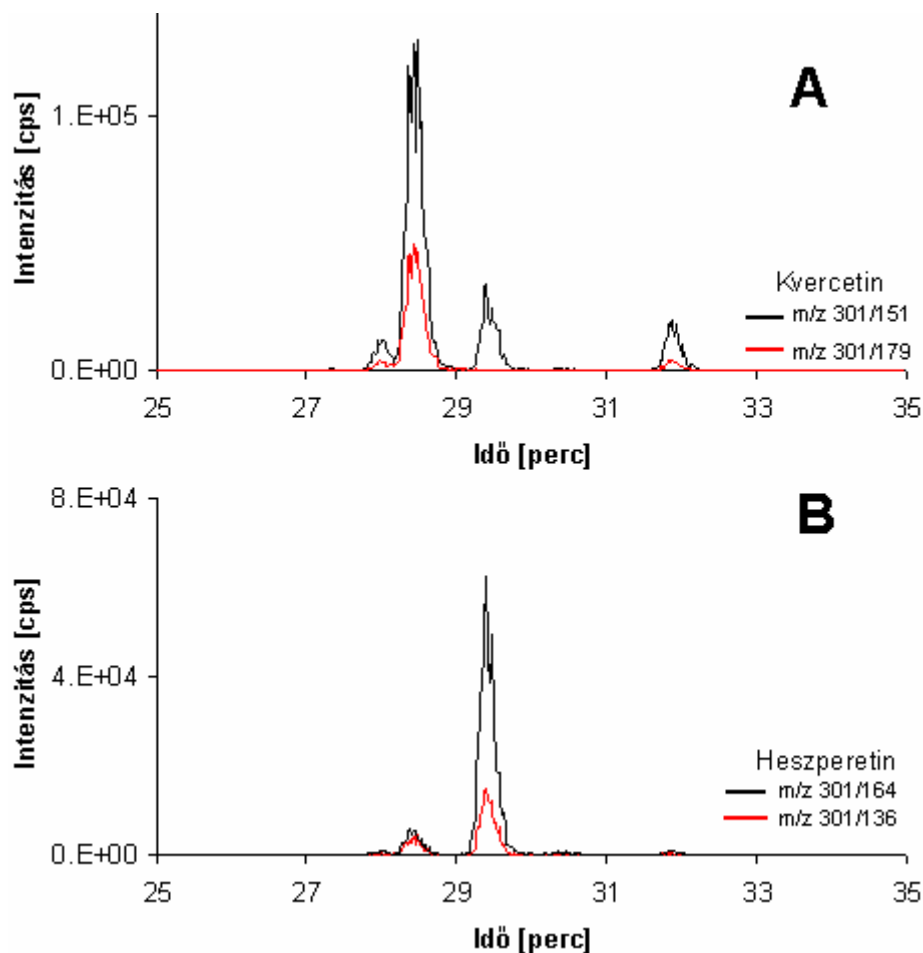
kempferol átmenetek ($m/z = 285/93$ és $285/117$) nem jelennek meg a luteolin esetében könnyen beláthatjuk, hogy nem jelent problémát a két vegyület szimultán meghatározása, hiszen ha a $285/133$ -as átmenet mellett nem jelennek meg a kempferolra jellemző átmenetek, akkor valószínűleg luteolinnal van dolgunk. Ha ezzel egyidőben megjelennek a kempferol átmenetek is, akkor két lehetőség van. Az egyik, hogy a luteolinra jellemző fragmens is a kempferolból keletkezett vagy ko-elúcióról van szó. Ennek megnyugtató módon történő eldöntéséhez, és a minőségbiztosítás végett, szükségünk van egy másik luteolin átmenetre is. Tovább vizsgálva a két spektrumot láthatjuk, hogy luteolin esetében az $m/z = 107, 151, 175$ és 199 jöhet szóba. Ezek közül az $m/z = 107$ és 175 , ha nem is nagy mértékben, de szintén zavart a kempferol által. Az $m/z = 151$ és 199 viszont tisztának mondható, hiszen ezek egyáltalán nem vagy csak alig keletkeznek a kempferolból. Az $m/z = 151$ relatív intenzitása magasabb az $m/z = 199$ -hez képest, és a zavarás is kisebb rajta, ezért ezt választottuk a meghatározáshoz a továbbiakban.





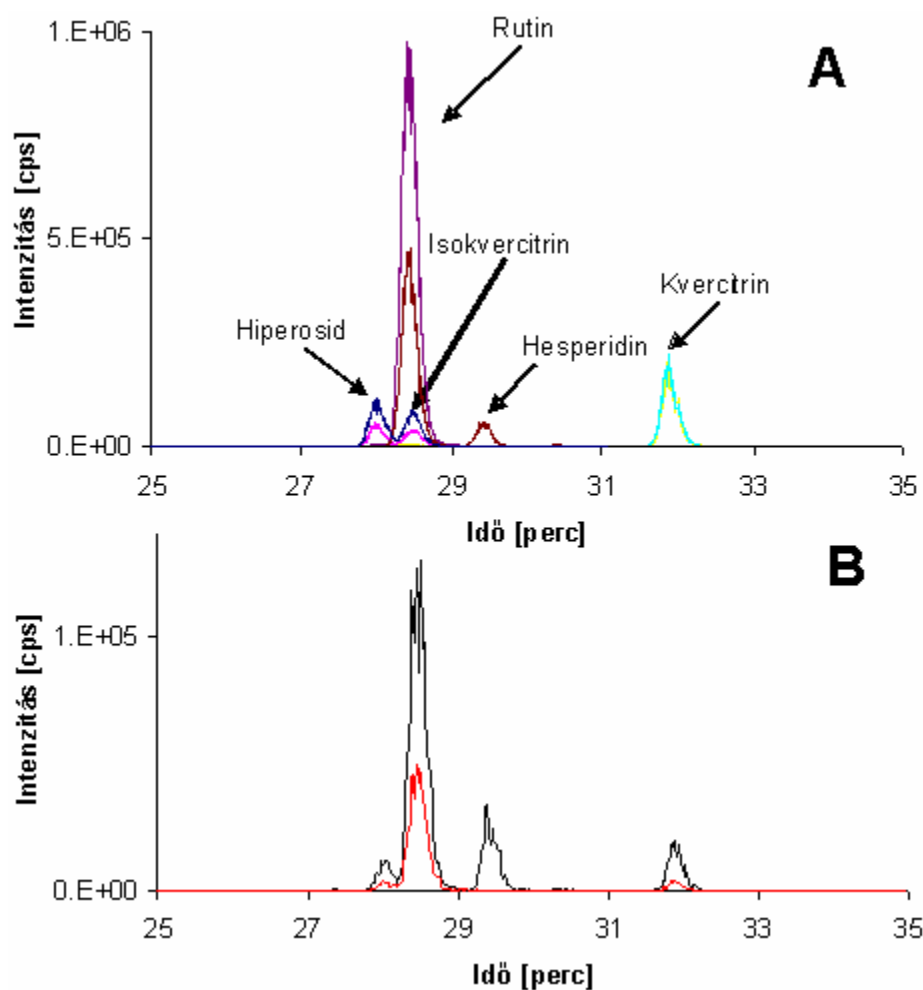
27. ábra A luteolin (A) és a kampferol (B) fragmentálása során felvett tömegspektrum.

Vannak azonban olyan esetek is, amikor nem tudunk ennyire jól elkülönülő átmeneteket találni. Ezt jól példázza a kvercetin-heszperetin esete (**28. ábra**). A 28,4 percnél eluálódó vegyület a rutin (ez kvercetin származék) míg a 29,4 percnél eluálódó a heszperidin (ez heszperitin származék). Mint látható, mind a két kromatogramon mind a két csúcs megjelent, de a heszperetinnek csak az egy - kvercetinnek közös - átmenete jelenik meg a kvercetin kromatogramon. Ezért egyértelműen megállapítható róla, hogy az adott retenciónál (29,4 perc) megjelenő csúcs nem kvercetin származék. Fordítva ez nem teljesen igaz, mert a kvercetin a heszperetinre jellemző mind a két átmenetet adja, de ha a két ábrán szereplő intenzitásokat összehasonlítjuk, kiderül, hogy az adott retenciónál (28,4 perc) a kvercetin átmenetei kétszeres nagyságrenddel erősebbek a heszperetin átmeneteinél. Tehát ebben az esetben is eldönthető, milyen származékkal van dolgunk.



28. ábra Azonos koncentrációjú glikozid standardokon elvégzett (A) heszperetin (B) kvercetin aglikon MRM monitorozás kromatogramjai.

Ezt követően a két detektálás egyidejű alkalmazásával futtattuk le a kidolgozott kromatográfiát. Ennek eredménye a **29. ábrán** látható a kvercetin példáján keresztül bemutatva. Amikor valamelyik vegyület jelet adott az első módszer alkalmazásával, a második módszer esetében is megjelent a vegyületre jellemző aglikon csúcs ugyanabban az időben.



29. ábra A kvercetin származékok (A) MRM és (B) aglikon MRM monitorozás kromatogramja.

A következő probléma, ami megoldásra várt, annak megválaszolása, hogy milyen molekuláról hasadt le az aglikon. A kérdés megválaszolásához úgynevezett prekursor ion keresést végeztünk (továbbiakban prec). Ez annak a megállapítására szolgál, hogy a kérdéses tömegszámú fragmens melyik nagyobb molekulából hasadt le. A módszer elvének sematikus rajza a **11. ábrán** látható. Ennek a fajta pásztázási módnak hátránya a nagy időigény. Ezért, ha ezt a módszert alkalmazzuk, nem lehet szimultán a mérésünk, mert az nagymértékben csökkentené az érzékenységet.

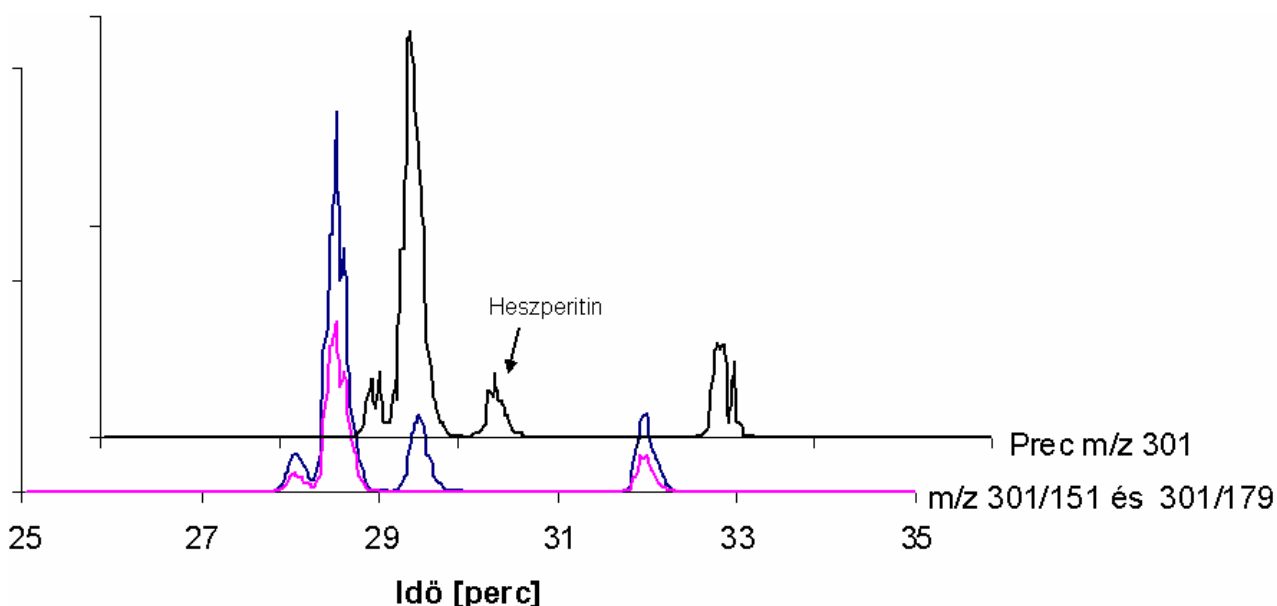
A ciklusidő hossza nagymértékben befolyásolja a mérés érzékenységét. A ciklusidő az egyes mérések (ú.n. experimentek) idejének összegéből adódik. Minél rövidebb egy experimentnek az ideje, annál többször tudja a módszer lefuttatni azt egy mérésen belül és annál kisebb koncentrációjú komponenseket tudunk vele detektálni. De ezzel együtt a szórása és ebből kifolyólag a bizonytalanság is növekszik. Ha az experiment ideje hosszú, akkor csökkenteni tudjuk a mérés bizonytalanságát, de félő, hogy a végén a ciklusidő túl hosszú lesz, akár nagyobb mint a

csúcsszélesség és így nem fogunk érzékelni olyan komponenseket, melyek kismértékben ugyan, de jelen vannak a mintában. Így csökken az érzékenység. Itt is valamilyen kompromisszumos megoldásra kell törekedni. Tapasztalataink szerint ezekkel a kromatográfiás beállításokkal a csúcsszélesség 20 másodperctől másfél percig terjed koncentrációtól függően. Az eddigi méréseket alapul véve úgy igyekeztünk beállítani az experimenteket, hogy egy csúcsból legalább tíz alkalommal tudjunk mintát venni.

Ezért minden flavonoid aglikonra külön módszert kellett kidolgozni. Ez a következőképpen néz ki: az aglikon negatív ion módban jellemző deprotonált tömegét adjuk meg, mint olyan tömeget, aminek az anyaiionját keressük. Általánosságban elmondható, hogy a tömegtartomány, amelyből az anyaiionokat várjuk az $m/z = 350$ -tól $m/z = 1000$ -ig terjedhet. Ez a másik paraméter, amit meg kell adni a leszakadó fragmens tömege mellett. A módszer annál érzékenyebb, minél nagyobb hatásfokkal szakadnak le az aglikonok. Ezért a módszert úgy célszerű beállítani, hogy az ütközési cellában leszakadó fragmensek minél nagyobb hányadát az aglikonok tegyék ki. Mint már utaltunk rá, a **11. táblázatból** látszik, hogy az egyes származékokból az aglikon nagy gyakorisággal szakad le, de az ennek eléréséhez szükséges - az ütközési cellában kicsatolt - energia (továbbiakban CE) vegyületcsoportonként igen eltérő. Azonban kompromisszumos érték itt is található. Ezért a vizsgált tömegtartományt három részre osztottuk és a **11. táblázat** adatait felhasználva állapítottuk meg az egyes tartományokhoz tartozó CE értékeket. Az első tartomány $m/z = 385$ -500, ahol az egyszerűbb származékokat vártuk, mint például a monoglikozidok. Itt a CE értéke -32 V volt. Második tartomány $m/z = 500$ -700-ig terjed ez az a tartomány, ahol a diglikozidok várhatóak. Itt a CE értéke -42 V volt. A harmadik tartomány a maradék tömegszámokat öleli fel ($m/z = 700$ -1000), itt találhatóak a legösszetettebb molekulák. A CE értéke is itt a legmagasabb -60 V. Valószínűleg ezt a tartományt és a hozzá tartozó paramétereket is tovább lehetett volna még finomítani, de nem álltak rendelkezésünkre megfelelő standardok ennek elvégzéséhez.

A következő megoldandó probléma, ami felmerült, a szelektivitás. Ugyanis ez a detektálási módszer minden olyan esetben jelet ad, ahol az aglikonnal megegyező m/z -jú fragmens keletkezik, ami nem minden esetben flavonoid származékból képződik. Ennek a problémának a kiküszöbölésére a Precursor Ion Scan-nel párhuzamosan a keresett aglikon MRM-jeit is mérjük, természetesen ebben az esetben is mind a három fajta DP érték mellett. A ciklusidő így 0,15 másodperccel növekedett, ami végül 2,15 másodperc lett, ami megfelel az elvárásainknak. Abban az esetben jelenthetjük ki, hogy flavonoid származékról van szó, ha mind a két módszerrel egyszerre kapunk jelet. Ez a módszer egyszerre egyfajta flavonoid származékainak detektálására alkalmas, ezért az általunk használt összes aglikon fajtára írtunk egyet-egyet. Ezeket a

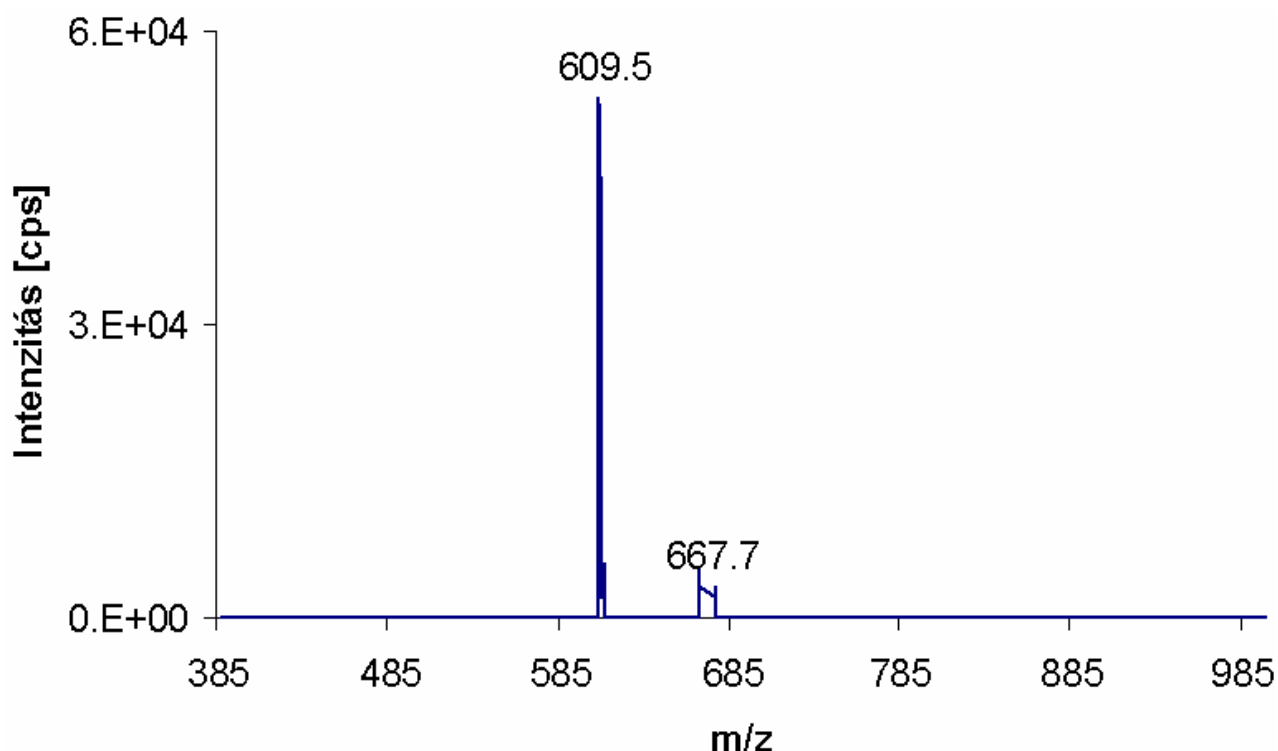
módszereket használtuk a többi futtatás alatt. Az előbb vizsgált standard oldatot ezekkel a módszerekkel is megmértük. A kapott eredmények a kvercetin példáján keresztül mutatjuk be.



30. ábra Az egyszerre futtatott $m/z = 301$ prekursor monitorozás és a kvercetin aglikon MRM monitorozás kromatogramja.

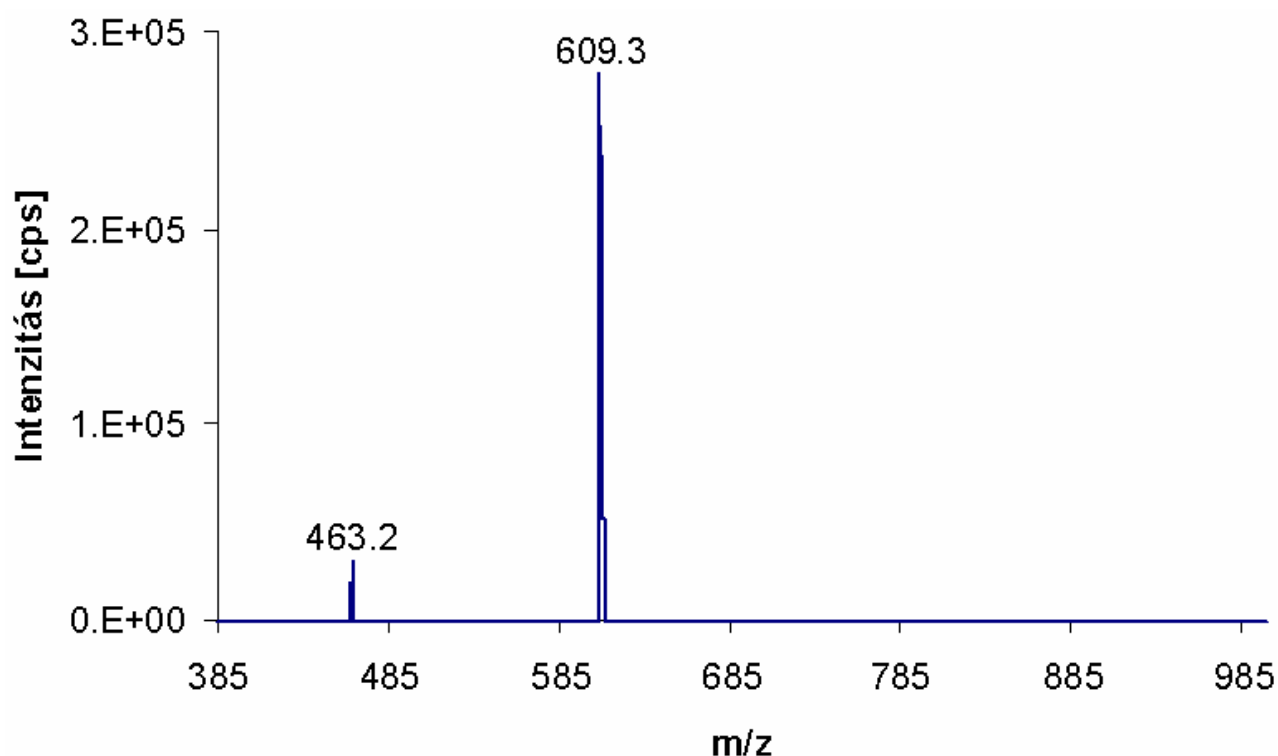
Mint a **30. ábrán** is látható, szükséges a két módszer egyidejű futtatása. Az MRM-ek segítségével tudjuk egyértelműen kijelenteni a heszperitin csúcsról, hogy nem kvercetin származék, mert a prekursor ion keresés erről nem szolgáltat információt. Érdekes egy kicsit megvizsgálni a kapott csúcsok tömegspektrumát, mert ezekből az adott komponens szerkezetére vonatkozóan lehet következtetéseket levonni. Néhány jellegzetes példán keresztül mutatom be a módszer logikáját.

Az első egy egyszerű eset, amikor nincs ko-elúció. Erre jó példa a heszperidin (heszperitin-7-O-rutinozid) esete (**31. ábra**). Egy domináns csúcs van, az $m/z = 609$, ami megfelel a deprotonált heszperidin tömegének. Az MRM kromatogram alapján azonosítható az aglikon, melynek tömege jelen esetben $m/z = 301$. Ez azt jelenti, hogy az anyaion 308 Da-nal nehezebb, ami megegyezik a heszperitin aglikonra kapcsolódó rutinóz (6-O-L-rhamno-D-glükózid) elvesztésével. A spektrumban nem jelent meg az $m/z = 463$ és $m/z = 447$ -es fragmens, ami arra enged következtetni, hogy az alapvázhoz egy diglikozid csatlakozik és nem két monoglikozid (Vukics, Guttman 2010). Ennek ellenkezőjére majd látunk példát a későbbiekben.



31. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 301$ prekursor kereső módszer segítségével felvett heszperidin tömegspektrum.

A következő példa a rutin (kvercetin-3-O-rutinozid) és az isokvercetrin (kvercetin-3-O-glükózid) esete (**32. ábra**). Mint a **29/A. ábrán** is látható, ez a két vegyület ko-eluálódik. Ennek megfelelően két domináns csúcs jelenik meg a spektrumban, az $m/z = 609$ és az $m/z = 463$. Az első a rutinhoz, míg a másik az izokvercitrinhez tartozik. Az $m/z = 609$ esetében, mivel nem jelent meg nagyobb tömegű ion, biztos, hogy anyaiion. Az aglikon tömegét ismerve ez egy hexóz és egy dezoxihexóz. Az előbb leírt okokból kifolyólag valószínűleg diglikozid formában csatlakozik az aglikonhoz. A kisebbik csúcs esete azonban nem ilyen egyszerű, mert származhat egy másik vegyületből, ami szintén itt eluálódik (mint a jelen esetben is), de származhat magából az anyamolekulából is. Ez olyan módon lehetséges, hogy a diglikozid a hexózon keresztül csatlakozik az aglikonhoz és a fragmentáció során csak a dezoxihexóz szakad le róla, mint ahogy az irodalomban ezt már leírták (de Rijke et. al. 2006). Ez azonban a pozitív ionizációs módra jellemző, negatív ionizációs módban ez a jelenség nem tapasztalható.

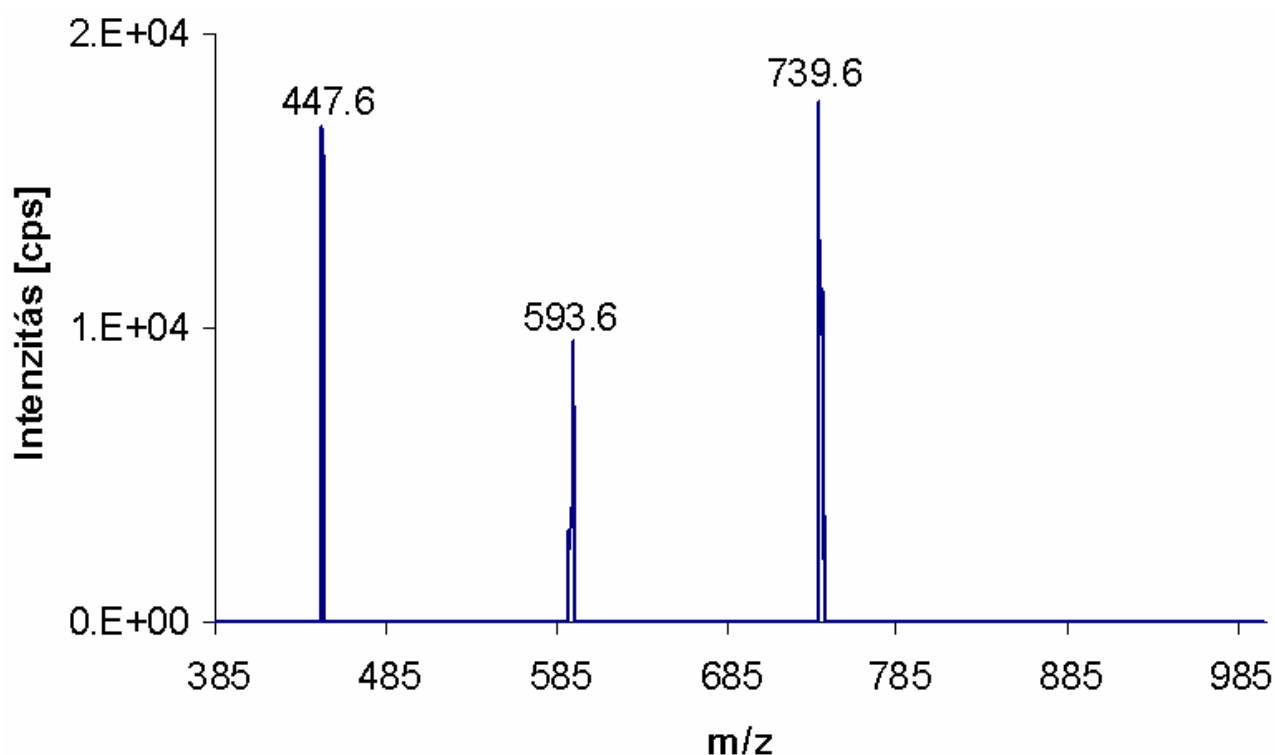


32. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 301$ prekursor kereső módszer segítségével felvett rutin és isokvercitrin tömegspektrum.

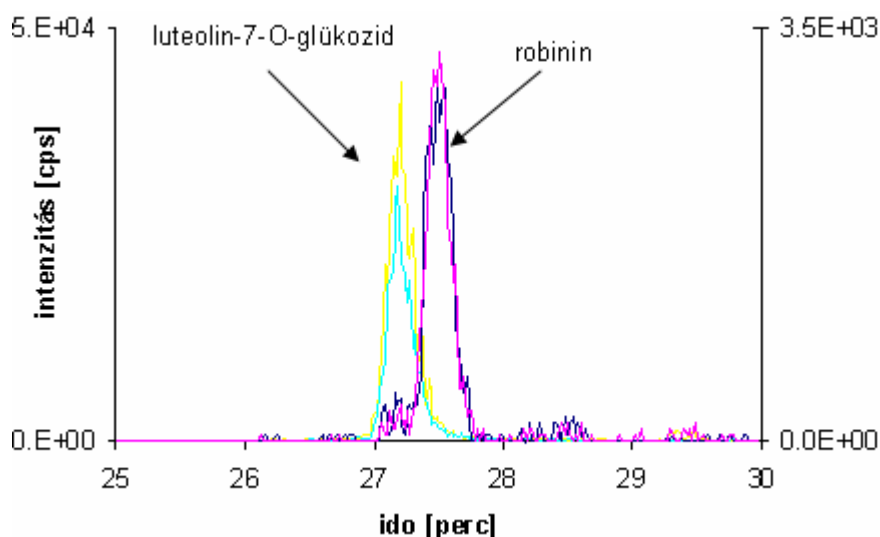
A harmadik spektrum a robininé (**33. ábra**). Ez a vegyület több szempontból is érdekes, amellett, hogy ez egy flavonoid triglikozid, a kempferol alapvázhhoz nem egy három cukorból álló egység csatlakozik, hanem egy mono- és egy diglikozid két különböző helyen (**2. ábra**). Ez következik a tömegspektrumából is. Három domináns csúcs jelenik meg az $m/z = 739$, 593 és 447 . Ebből a legnagyobb csúcs az $m/z = 739$, maga a robinin deprotonált anyaiion tömege, a második $m/z = 593$, 146 Da-nal kisebb tömegű, ez egy dezoxihexóz vesztést jelenthet. Ez két dolgot jelenthet: az egyik, hogy a robinózból (6-O-rhamno-galaktozid) szakadt le a rhamnóz, ez a fent említett okok miatt nem valószínű. A másik lehetőség, hogy a 7-es pozícióra kapcsolódott rhamnóz hasadt le. A harmadik csúcs az $m/z = 447$, ami 2×146 Da-os vesztést jelent. Ez csak úgy lehetséges, hogy mind a két rhamnóz molekula lehasad a molekuláról, de ez nem valószínű a már ismert okok miatt. Ellenben, ha jobban megvizsgáljuk a standardok retencióit, láthatjuk, hogy a robinin mellett egy másik származék is eluálódik, aminek érdekessége, hogy az aglikon a luteolin, és olyan közel eluálódik hozzá, hogy nem válnak el egymástól alapvonalig. Ez a vegyület a luteolin-7-O-glükozid, melynek a deprotonált ion tömege $m/z = 447$. Az aglikonok összegképlete azonos lévén, a prekursor keresés nem tudja őket egymástól megkülönböztetni, de különböző szerkezeti képleteik miatt, az MRM igen (**34. ábra**). Ezért valószínűleg a harmadik csúcs ebből a vegyületből származik. Látható, hogy a két vegyület intenzitása között nagyságrendi különbség

van (a baloldali skála a luteolin-7-O-glükozidhoz tartozik, a jobboldali a robininhoz). Ezért lehetséges, hogy a két csúcs mindössze kis része fedt át egymást, de az ionok intenzitása majdnem azonos. Ami viszont különös, hogy nem jelent meg az $m/z = 431$ -es ion ami a robinóz egység leszakadásával keletkezne. Valószínűleg a robinóz egység leszakadásához olyan mértékű energia kell, hogy addigra a rhamnóz leszakad az alapvázról.

Itt fontos megemlíteni, hogy sok kérdésre csak akkor kapunk egyértelmű és megnyugtató választ, ha egy, az 5.2-es fejezetben már részletesen kifejtett, termékion spektrumot is felvesszünk a problémás csúcsokról, illetve a kérdéses tömegek kivonatolt kromatogramjait is megvizsgáljuk a kromatográfiás retenciók egyezőségek ellenőrzése céljából. Ha nem is minden esetben, de az esetek döntő többségében kiszűrhetjük a kromatográfia hiányosságaiból eredő azonosítási hiányosságokat.



33. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 301$ prekursor kereső módszer segítségével felvett robinin és luteolin-7-O-glükozid tömegspektrum.



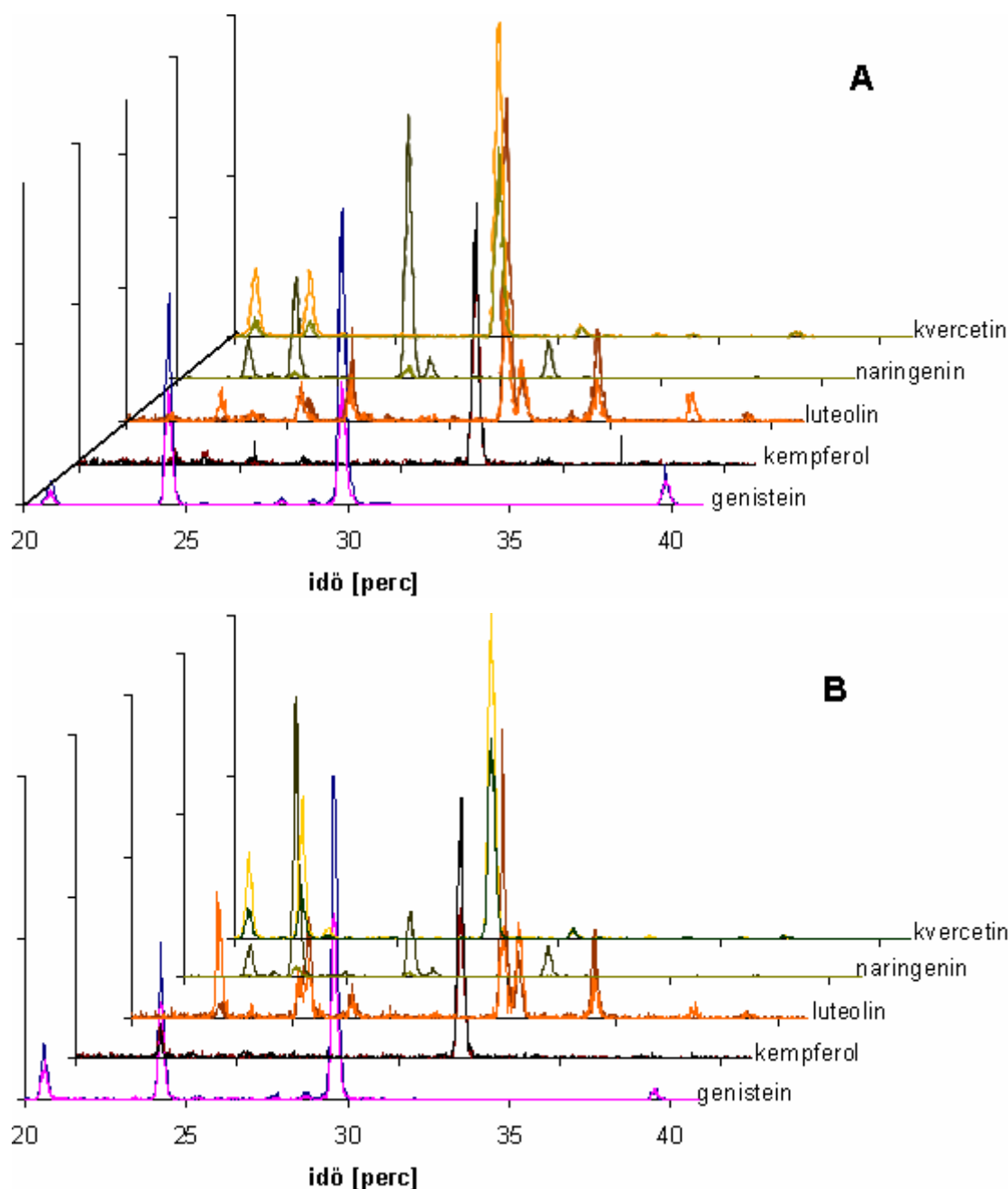
34. ábra A robinin és luteolin-7-O-glükózid standardokon végzett luteolin és kempferol aglikon-MRM monitorozás kromatogramja

Ezen paraméterek ismeretében a következő aglikonokra dolgoztunk ki aglikon monitorozó módszert: luteolin, miricetin, naringenin, kvercetin, daidzein, genistein, heszperitin és fizetin.

5.3.2. Alkalmazás valódi mintára

Az eddigi ábrákból látható, hogy a kidolgozott módszer standard oldatokra működik. A következő lépés ennek a metodikának alkalmazása valódi mintákra. A teszteléshez egy különleges antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező Pipacs1 elnevezésű meggyet használtunk. Emellett kontrollmintaként egy kiemelkedő antioxidáns tulajdonságokkal nem rendelkező Újfehértói meggyfajtát használtunk.

Első lépésként az aglikon pásztázást futtattuk le. Ebből állapítottuk meg, hogy az általunk vizsgált aglikonok származékai közül melyek találhatók a mintában (**35. ábra**). Ezek a következők lettek: luteolin, kvercetin, genisztein, naringenin, kempferol. Ezen vegyületek származékai, ugyan eltérő intenzitással, de mind a két mintában jelen voltak. Fontos megjegyezni, hogy nem csak az intenzitások voltak eltérők a két minta között, hanem az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya az egyes mintákon belül is.

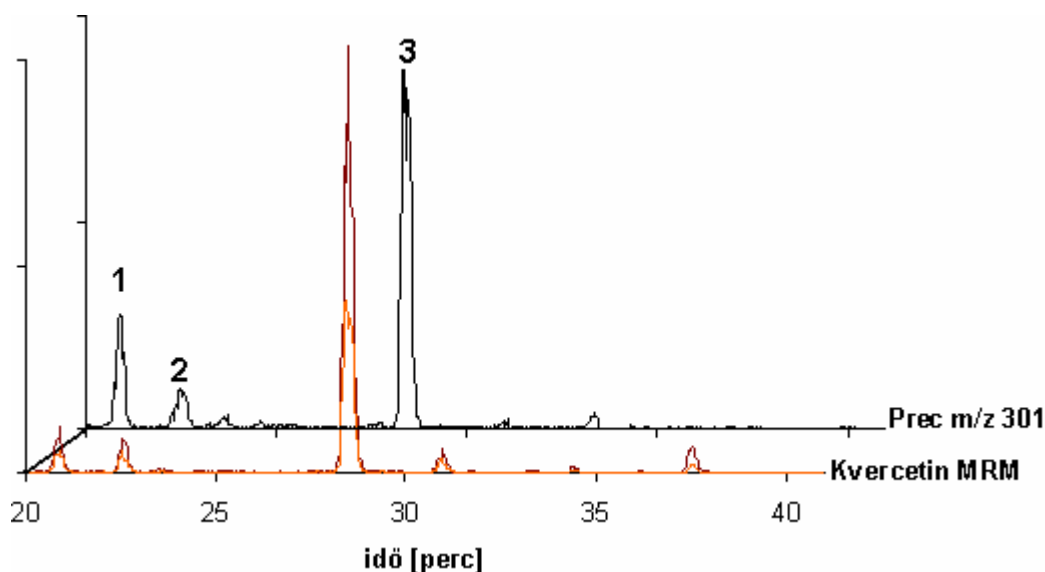


35. ábra Az 5.3-as fejezetben mért (A) különleges antioxidáns tulajdonságú (Pipacs1) meggy és (B) Újfehértói fürtös aglikon screeningje

A következő lépés az egyes csúcsokhoz tartozó anyaiion azonosítása volt. Erre a célra, az 5.3.1-es fejezetben leírtak alapján, a talált aglikonokra kidolgozott prekursor ion keresést használtuk. Ezt minden egyes általunk talált aglikon típusra lefuttattuk, melyből csak néhányat emelünk ki.

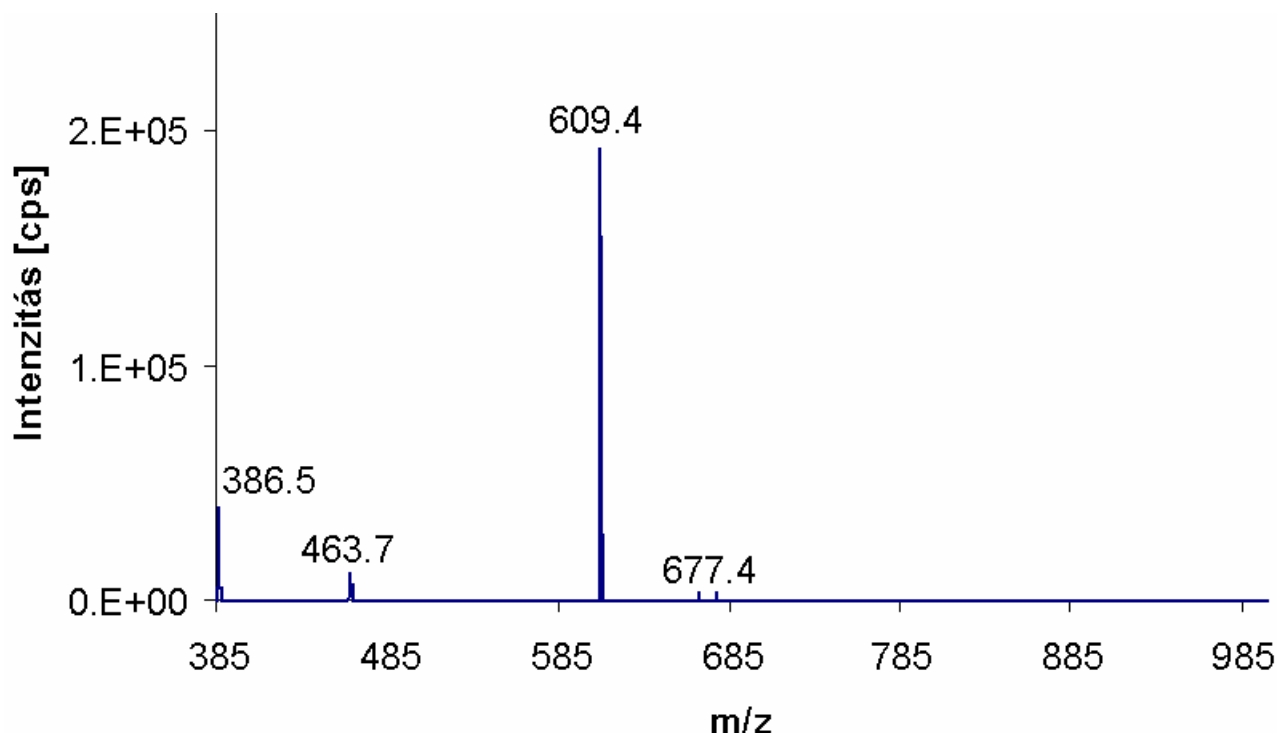
Az első a kvercetin esete. A **36. ábrán** látható a Pipacs1 meggy kvercetin MRM és a vele párhuzamosan mért prekursor $m/z = 301$ (deprotonált kvercetin molekula) kromatogramja. Az

ábrán három olyan csúcs található, melyet mind a két detektálás megerősített (ezek számmal jelölt csúcsok).



36. ábra Az 5.3-as fejezetben kifejlesztett kvercetin származékok azonosítására szolgáló módszerrel mért kromatogramok (Pipacs1 nevű meggymintából)

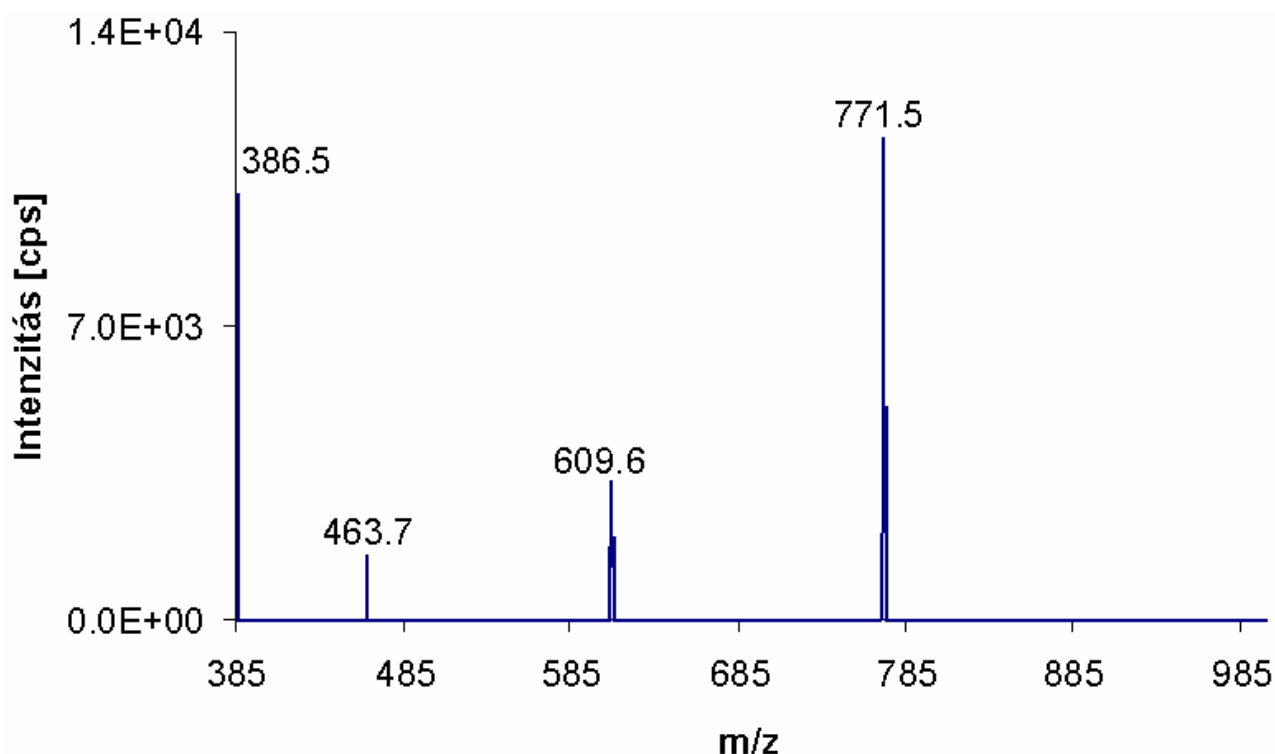
A 3-as számmal jelölt csúcs a rutin. Ennek a vegyületnek az azonosítása nem okozott nehézséget, mert rendelkezésünkre állt standard formájában. De ha megnézzük a 3-as csúcs tömegspektrumát (**37. ábra**), láthatjuk, hogy a legdominánsabb csúcs $m/z = 609$. A módszer lényegéből adódóan valószínűsíthetően ez az anyaiion. Ha ebből keletkezik az $m/z = 301$, az 308 Da-nos veszteséget jelent. Ez megegyezik egy dezoxihexóz (146 Da) és egy hexóz (162 Da) egyidejű elvesztésével, és ennyi a kvercetin alapvázra kapcsolódó rutinóz tömege is. Ez megerősíti azt a tényt, hogy ez egy olyan flavonoid származék, melynek alapja egy kvercetin molekula és ehhez kapcsolódik egy diszacharid, mely egy hexózból és egy dezoxihexózból áll, a rutin egy ilyen vegyület. Ezenkívül látható egy kisebb intenzitású, de a háttértől jól elkülönülő csúcs, az $m/z = 463$. Ez valószínűleg nem a rutinból származik, hanem egy másik kvercetin származékból, isokvercitrinből, mint ahogy az már a standardokból vett tömegspektrumon bemutattuk.



37. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 301$ prekursor kereső módszer segítségével felvett tömegspektrum Pipacs1 meggy mintából 28,5 percnél.

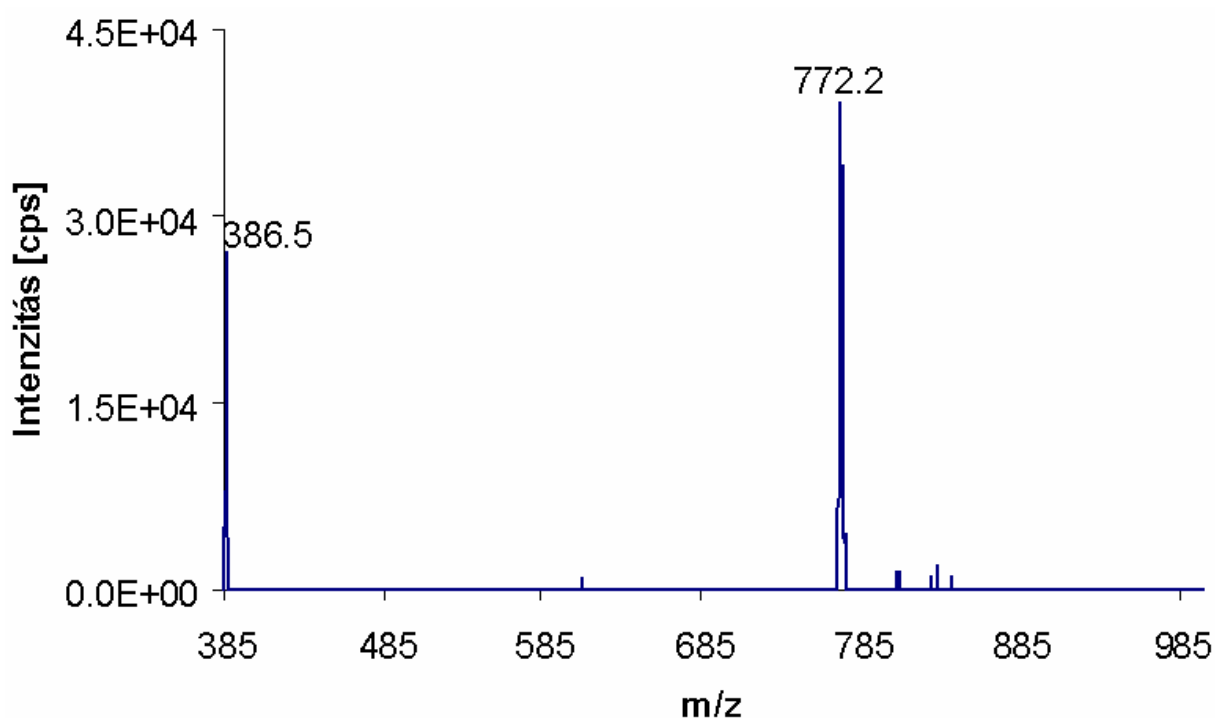
Ellenben sokkal érdekesebb a másik két csúcsnak a tömegspektruma. Vegyük először a 2-es számmal jelöltet (**38. ábra**). Itt a legintenzívebb ion az $m/z = 771$, ha nincs koelúció, ez az anyaiion. Ez 470 Da-nal több a kvercetin aglikonénál, és kettő hexóz és egy dezoxihexózra utal ($2 \cdot 162 + 146$). A többi fragmensből következtetni lehet az esetleges kapcsolódási pontokra. A második csúcs az $m/z = 609$, ez 162 Da-nal kevesebb az anyaiion tömegénél, ami azt feltételezi, hogy a cukrok különböző helyeken csatlakoznak az aglikonhoz. A harmadik csúcs az $m/z = 463$, tömege 308 Da-nal kevesebb az anyaiionnál. Ugyanakkor nem jelenik meg az $m/z = 447$ tömegű csúcs. Ezekből az a következtetés vonható le, hogy ez egy olyan molekula, melyhez két helyen csatlakoznak cukorkomponensek, mégpedig egy hexózból álló monoglikozid egység és egy hexóz-dezoxihexózból álló diglikozid egység formájában. A robinin példáján kiindulva azonban még egy lehetőséggel kell számolni, hogy itt is koelúció van és az $m/z = 463$ -as csúcs egy másik flavonoid származékból származik, ami egy monoglikozidot jelentene. Ez lehetséges, de valószínűtlen, ugyanis fordított fázisú oszlopról lévén szó a komponensek polaritás szerint csökkenő sorrendben eluálódnak rajta (Harnly et al. 2007, Cuyckens, Claeys 2004). Ezért ebben a retenciós tartományban valószínűtlen monoglikozidok előfordulása. Egy másik lehetőség, hogy koelúció történik, de két triglikozidról van szó, csak az egyikhez egy triszacharid, a másikhoz egy mono- és egy diszacharid egység kapcsolódik. Itt kell megjegyezni, hogy a módszert két olyan

aglikonra dolgoztuk ki melyek deprotonált tömege m/z 301, de a mintában létezhetnek egyéb olyan flavonoidok melynek tömege szintén ennyi. Ezek között a prekursor keresés nem tud különbséget tenni, és az MRM keresés sem fogja jelezni a különbséget. Egyik lehetséges módszer ennek eldöntésére, hogy „cukor oldalról” próbáljuk meg szétválasztani a komponenseket, ahol az elválasztást nem a flavonoid aglikonok határozzák meg, hanem a kapcsolódott cukorkomponensek.



38. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 301$ prekursor kereső módszer segítségével felvett tömegspektrum Pipacs1 meggymintából 22,5 percnél.

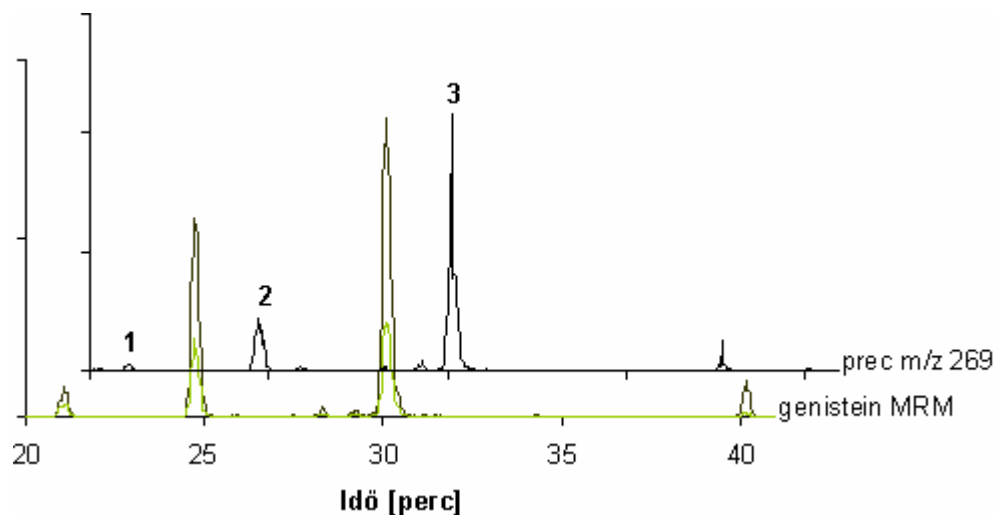
Az 1-es számmal jelölt csúcs tömegspektruma a **39. ábrán** látható. Itt egyetlenegy csúcs jelent meg, az $m/z = 772$. Ez valószínűleg nem egy tisztán kvercetin glikozid, mert a tömegszám nem egyezik, hanem a cukrok mellett tartalmaz valamilyen más vegyületet is. Sajnos ezzel a módszerrel erről többet nem tudunk megállapítani.



39. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 301$ prekursor kereső módszer segítségével felvett tömegspektrum Pipacs1 meggymintából 20,9 percnél.

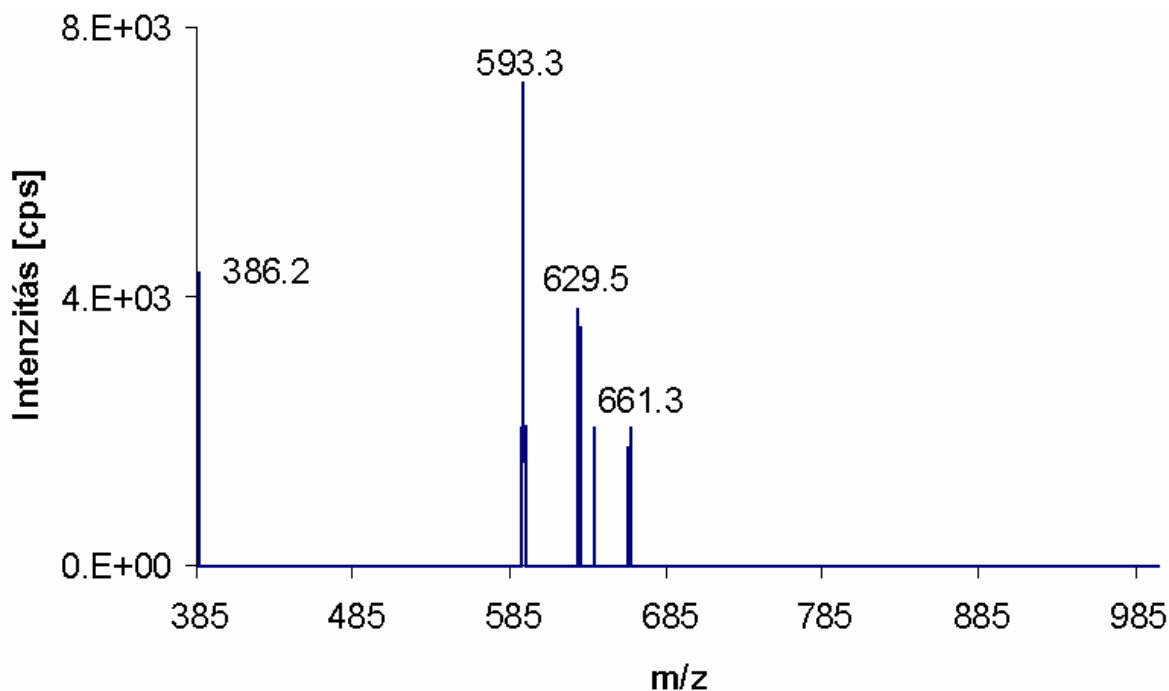
Az általunk alkalmazott logika szerint sikerült három genistein származékot kimutatni. Az irodalomban ugyan található utalás a különféle meggyminták genistein tartalmára (Wang et al. 1999, Usenik, Stampar 2000), de ezt minden kétséget kizáróan bizonyítani nem sikerült. Standard alapján mi is csak az aglikont találtuk meg (retenciós idő, két MRM átmenet azonosításával), ezért ennek megfelelően a származék azonosítására tett megállapításaink is csak feltételesek.

A **40. ábrán** látható a Pipacs1 meggy genistein MRM és a vele párhuzamosan mért prekursor $m/z = 269$ (deprotonált genistein molekula) kromatogramja. Az ábrán három olyan csúcs található, melyet mind a két detektálás megerősített (ezek számmal jelölt csúcsok).



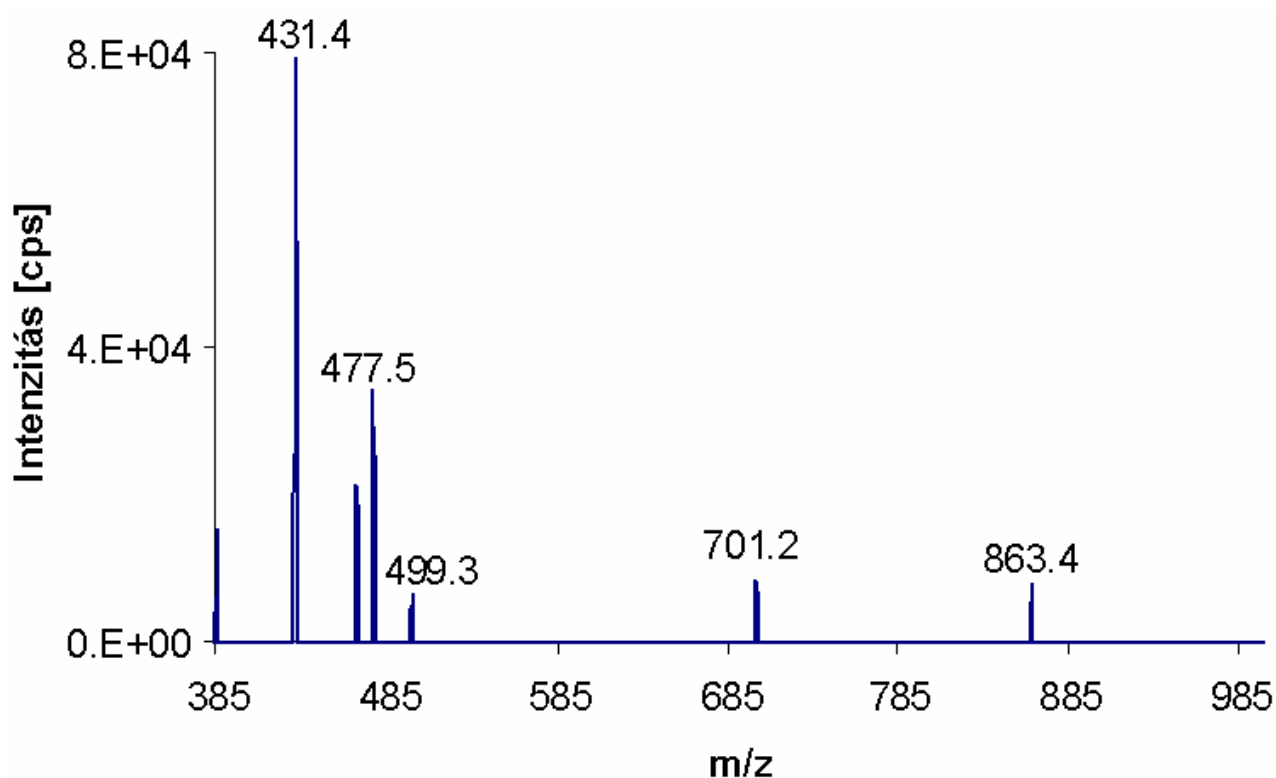
40. ábra Az 5.3-as fejezetben kifejlesztett genistein származékok azonosítására szolgáló módszerrel mért kromatogram (Pipacs1 nevű meggy mintából).

Az **1-es** csúcs spektrumából (**41. ábra**) valószínűsíthető, hogy az $m/z = 593$ -as ion az anyamolekula deprotonált alakja lévén a legintenzívebb, és tömegre is egyezik egy genistein dihexozid tömegével. Ami viszont ez ellen szól, hogy az $m/z = 629$ és 661 szintén nagy intenzitással van jelen, de tömeg alapján nem tudjuk őket semmilyen származéknak besorolni. Igaz, hogy az $m/z = 629$ 36 Da-nal nagyobb tömegű, mint az $m/z = 593$ és ez két molekula víz elvesztésére utalhat, de ebben az esetben az $m/z = 593$ -as ion nem magyarázható.



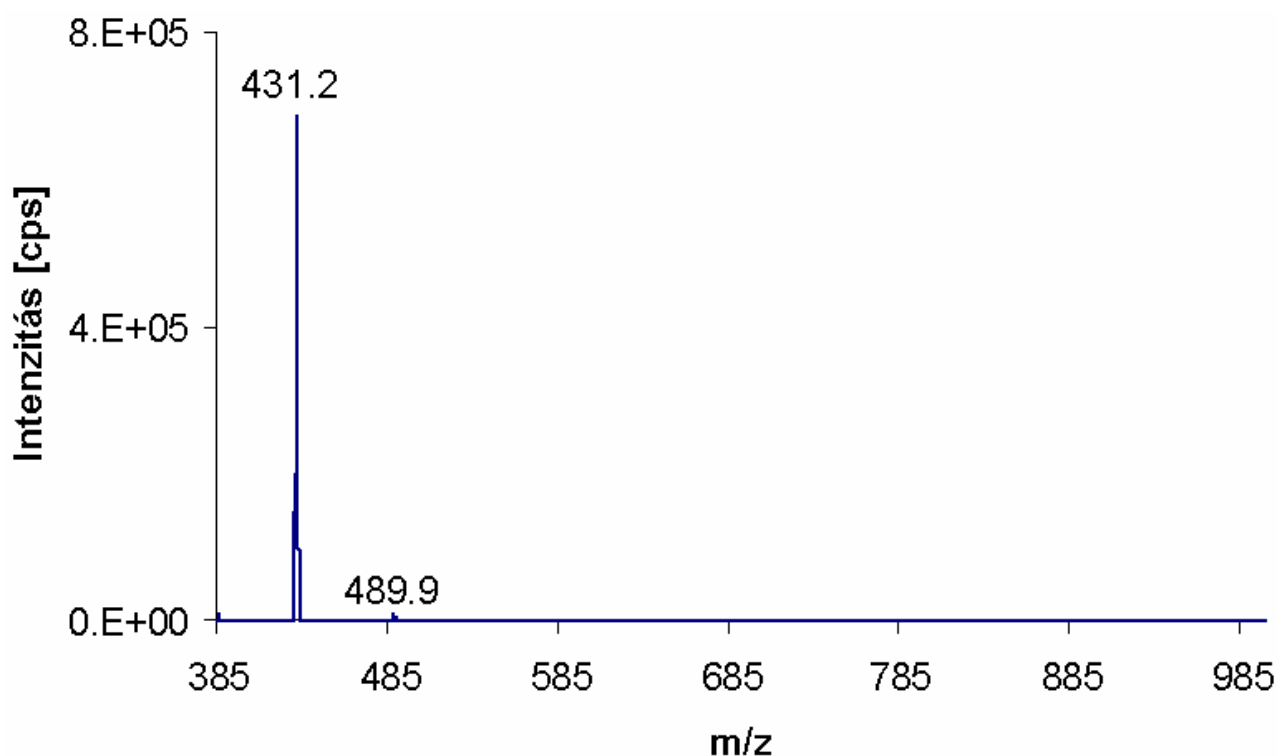
41. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 269$ prekursor kereső módszer segítségével felvett tömegspektrum Pipacs1 meggy mintából 21,1 percnél (**1-es** számú csúcs).

A 2-es csúcs esetében (**42. ábra**) hasonló a helyzet, mint az 1-es csúcsnál. Az $m/z = 431$ -es ion szintén lehet egy hexozid, és az $m/z = 477$ és lehet egy acilezett hexozid. Ámbár az acil-rész nem igazán szokott külön lehasadni a cukor-résztől, ezért ez inkább valamilyen ko-elúciót feltételez. Viszont a többi csúcs nem igazán illik bele a képbe jelenlegi ismereteink szerint. Az $m/z = 701$ és 863 közti különbség ugyan egy hexozid veszteségre utal, de ez esetben az aglikon kiléte nem tisztázott. Mind az 1-es és 2-es csúcs esetében elmondható, hogy a tömegspektrumukban olyan ionok találhatóak, melyek azonosítása további vizsgálatokat igényel. Ezek származhatnak ko-elúcióból, mint amire láthattunk már példát a kvercetin esetében, de elképzelhető, hogy a mérés során lejátszódó valamilyen mellékreakció termékei. Ezt indokolja, a nagy relatív intenzitásuk mellett az a tény is, hogy a módszer lényegéből adódóan ezekből $m/z = 269$ -es fragmensek keletkeznek.



42. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 269$ prekursor kereső módszer segítségével felvett tömegspektrum Pipacs1 meggy mintából 24,7 percnél (2-es számú csúcs).

A harmadik csúcs esetében (**43. ábra**) a helyzet elég egyértelmű. Itt az $m/z = 269$ egyetlen ionból keletkezik, az $m/z = 431$ -ből. Ez 162 Da-nal több az aglikon tömegénél, ezért ez valószínűleg egy genistein-hexozid. Sajnos a kapcsolódás helyéről, és a cukor fajtájáról többet nem tudunk megállapítani ezen spektrum alapján.



43. ábra Az 5.3 fejezetben kifejlesztett $m/z = 269$ prekursor kereső módszer segítségével felvett tömegspektrum Pipacs1 meggymintából 30,1 percnél.

Az összes többi olyan esetben, ahol az MRM és a prekursor monitorozás egyszerre valószínűsítette egy flavonoid jelenlétét, a **43. ábrához** hasonlóan egyértelműen lehetett azonosítani az anyaiont. Az előbb ismertetett logika alapján a következő vegyületeket azonosítottuk: kempferol-hexóz-dezoxihexóz (32,5 percnél), luteolin-hexozidok (25,5, 27,1, 31,8 és 34,7 percnél), naringenin-hexozidokat (22,5, 24,0, 27,4 és 31,8 percnél). Mint már említettük a kontrollmintaként használt „Újfehértói fürtös”-ből is ugyanezeket a vegyületeket azonosítottuk.

6. Új tudományos eredmények

1. Statisztikai módszerek segítségével bebizonyítottam a vörösborokban kis koncentrációban található ún. minor polifenolok és azok izomerjei hordoznak információt az eredetre vonatkozóan. Igazoltam, hogy az egyes izomerek aránya különböző termőhelyekről származó borok esetében igen jelentős eltérést mutathat.

2. Egy olyan, elektrospray ionizációt és tandem-tömegspektrometriás detektálást alkalmazó háromlépéses módszert dolgoztam ki, melynek segítségével fel lehet térképezni az egy mintában található kiválasztott flavonoidok mono-O- és di-O-glikozidjait. A módszer első lépésében, az ionforrásban történő fragmentálódás jelenségét kihasználva, az alapvázat lehet azonosítani. Tehát az azonosítási eljárás az általános gyakorlattól eltérően visszafelé kezdődik. A második lépés azoknak a tömegeknek a kiválasztása, melyek potenciális anyaiionok lehetnek. A harmadik lépés annak az igazolása, hogy a lehetséges tömegek közül melyik tartozik ténylegesen az anyamolekulához. A gyakorlati kivitelezésben az első két lépést egy kromatográfiás futtatásban vontam össze. A kidolgozott módszert alkalmazva azonosítottam egy feketebíszke léből 12 flavonoidot (aglikonokat és származékokat egyaránt).

3. Elektrospray ionizációt és tandem-tömegspektrometriás detektálást alkalmazva olyan kísérleti protokollt dolgoztam ki, mely képes a luteolin, kempferol és a fizetin szerkezeti izomereket egymás mellett, negatív ion módban szelektíven meghatározni. Kísérleteim alapján az alábbi átmeneteket javaslom e komponensek negatív ion módban történő azonosítására:

- kempferol: mennyiségi átmenet 285/117, minősítő átmenet 285/93
- luteolin: mennyiségi átmenet 285/133, minősítő átmenet 285/151
- fizetin: mennyiségi átmenet 285/135, minősítő átmenet 285/121

4. Kidolgoztam egy elektrospray ionizációt és tandem-tömegspektrometriás detektálást alkalmazó flavonoidszármazék azonosítási módszert, mely két lépésből áll és ki tudja küszöbölni a többszöri futtatásból eredő, retenciós idők elcsúszásából eredő hibákat.

a. A módszer első lépése a forrásban történő fragmentációval létrehozott aglikon alapvázak meghatározása MRM módszerrel. A következő lépés egy prekursor monitorozás, melynek segítségével meg tudjuk állapítani, hogy egy előre meghatározott aglikon fragmens milyen nagyobb molekulából keletkezett. A második lépésnél a prekursor monitorozás mellett, csak a „keresett aglikonra vonatkozóan”, egy MRM monitorozás is folyik. Így két lépésben meg tudtam határozni a mintában található kiválasztott flavonoid aglikonok származékait.

b. Bebizonyítottam, hogy a különböző összetettségű flavonoid-származékok forrásban történő fragmentációs tulajdonságai igen eltérőek lehetnek. Ezért negatív ion módban nem található a forrásban történő fragmentációra egy általánosságban alkalmazható feszültségérték. A mérések alapján bizonyítottam, hogy vegyületcsoportonként azonban található. Ezért a megfelelő értékek megválasztásával sikerült a módszert olyan összetettebb vegyületek irányába kiterjesztenem, mint a flavonoid-triglikozidok.

7. Összefoglalás

A polifenolok egyre jobban a figyelem középpontjába kerülnek, minél több kutatás és információ lát róluk napvilágot. Egyre inkább előtérbe kerülnek, mint olyan vegyületek, melyeknek kiemelkedő szerepe lehet az egészségmegőrzésben. Egyre bővülő ismereteink ellenére, vagy talán éppen amiatt, nagy szükségünk van olyan analitikai módszerekre, eljárásokra, melyek segítségével képet kaphatunk egy élelmiszer vagy gyógynövény polifenol készletéről. Munkám során ezen területhez igyekeztem hozzájárulni különböző analitikai módszerek kidolgozásával.

Sikerült kifejlesztenem egy célkomponens módszert, melynek segítségével a vizsgált autentikus borokat, statisztikai módszerek segítségével, sikerült bizonyos mértékig elkülöníteni egymástól évjáratuk, termőhelyük és fajtájuk szerint. Ebben nagy szerepe volt a nagy felbontású oszlopnak, melynek segítségével sikerült egyes vegyületek izomerjeit is elválasztani egymástól. Ez az elválasztás azonban nem minden esetben volt teljesnek mondható. Ennek oka lehetett a nem megfelelő, vagy kelleténél kevesebb komponens kiválasztása, esetleg a nem megfelelő statisztika alkalmazása. Újabb polifenolok és/vagy más statisztikai módszerek alkalmazásával ezen hiányosságok kiküszöbölhetőek lehetnek.

Sikerült kifejleszteni egy kereső módszert, melynek segítségével nagy valószínűséggel lehet azonosítani a vizsgált aglikonok mono- és diglikozidjait standardok használata nélkül. Ezt az tette lehetővé, hogy az ionforrásban, a flavonoid mono- és diglikozidból keletkező aglikonok azonosítására az MRM módszert alkalmaztunk, mégpedig oly módon, hogy mint monitorozást használtuk. Nem specifikáltam az ionforrás beállításait minden vegyület típusra külön-külön, hanem egy kompromisszumos átlagértéket használtam. Ennek segítségével egy olyan módszert fejlesztettem ki, mely - az irodalomban eddig publikáltak nagy részétől eltérően - a flavonoidszármazékok feltérképezését azok alapvázától „kifelé” haladva végzi, tehát először az alapvázat majd a rákapcsolódó szubsztituenseket azonosítja. Sajnos a módszerben használt pásztázástípusok jellegéből adódóan minden esetben szükség van a harmadik EPI pásztázás alkalmazására. Csak így tudunk meggyőződni arról, hogy az aglikon és a feltételezett származék csúcs összetartozik. A másik hiányosság, hogy csak egyszerűbb származékok azonosítására alkalmas.

Mintegy az előző módszer továbbfejlesztéseként kidolgoztam egy olyan módszert, mely alkalmas összetettebb flavonoid származékok azonosítására standardok használata nélkül. Ez a módszer két lépésben végzi az azonosítást, koelúció esetén három lépésben. Az első lépés ebben az esetben is az ionforrásban történő fragmentáció jelenségét kihasználó MRM monitorozás. Ebben az esetben minden vegyületcsoportra külön optimáltam az ionforrást, így az első lépésben egy

aglikon származékainak azonosításához egyszerre több MRM-t kell futtatni azonos időben. Ezért van lehetőség összetettebb származékok azonosítására. A második lépésben alkalmazott prekursor ionkeresés alkalmazásával az anyai ion tömegét meg tudjuk határozni. A ciklusidő adta korlátozások miatt ezt a lépést már nem lehet szimultán alkalmazni, egyszerre csak egyfajta aglikonnak a származékaira.

8. Summary

The more information accumulates on polyphenols the more they get into the center of the interest due to their assumed role in health prevention. For this reason analytical methods are needed in order to obtain information about the polyphenol profile of either a foodstuff or a herb. The aim of my research work was to develop such analytical methods and therefore to contribute to this issue.

A method especially focusing on selected target components was developed and was used successfully to separate authentic wines according to vintage, production site and cultivars. The high resolution chromatographic column played an important role in separation of isomers of certain compounds. However, this technique was not in all cases satisfying. The reasons can be on the one hand the inappropriate types and number of selected analytes on the other hand the chosen statistical analysis. These shortcomings can be eliminated in case of newer/other polyphenols and/or using other statistical analysis.

A screening method was also successfully developed, which was used to identify the mono- and diglycosides of the investigated aglycones without using reference standards. The so-called MRM mode was used for identifying the aglycones, which were obtained from the in-source fragmentation of flavonoid mono- and diglycosides. This mode was used as a monitoring mode. The parameters were not optimized for each compounds but a compromised average value was used.

Applying this mode a new method was developed, that is different from the most methods that had already been published. Namely tentative identification of flavonoid starts from the core of the molecule thus firstly the aglycones and after the linking substituents are mapped. Unfortunately because of the feature of the scanning type a third product ion scan is needed. Applying this third step, it can be confirmed that the aglycone and the assumed peak cohere. The other shortcoming is that only simple derivatives can be identified.

The previous method was kept on developing and such a method was elaborated that is already suitable for identifying more complex flavonoid derivatives without using standards. This

method consists of two steps, if there is co-elution three steps are needed. In this case the first step is also the MRM monitoring, that is use out the phenomena of the fragmentation in the ion source. In this case the optimization of the ion-source was adjusted for each compounds, thus in the first step simultaneously more MRM can be run for the identification of the derivatives of the aglycone. The second step is the precursor ion screening which was used to determine the molecule weight of the parent ion. This step can not be applied simultaneously due to the limit of the cyclic time of the MS. Therefore, only one aglycone and its derivatives can be screened simultaneously in one chromatographic run.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani két konzulensemnek, Dr. Fodor Péternek, az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének, hogy munkámat lehetővé tette és biztosította a szükséges tárgyi és anyagi feltételeket és dr. Abrankó Lászlónak, aki útmutatásával és szakmai segítségnyújtásával segítette munkámat.

Dr. Stephan Haannak valamint Leonard Jaitznak, a Bécsi Agrártudományi Egyetem (BOKU) Analitikai Kémia tanszékéről.

Továbbá szeretném megköszönni doktorandusztársaimnak, elsősorban Balogh Emőkének és az Alkalmazott Kémia Tanszék összes dolgozójának, valamint mindazoknak, akik közreműködtek abban, hogy ez a dolgozat megszülethessen.

Továbbá köszönettel tartozom családomnak, akik mindig támogattak és mellettem álltak a PhD éveim alatt.

9. Irodalomjegyzék

- Abad-Garcia, B., Berrueta, L. A. et al. 2009. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216(28):5398-5415.
- Abad-Garcia, B., Berrueta, L. A. et al. 2007. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*. 1154(1-2):87-96.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18(1):75-81.
- Androutsopoulos, V. P., Papakyriakou, A. et al. 2010. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics*. 126(1):9-20.
- Apak, R., Guclu, K. et al. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*. 12(7):1496-1547.
- Beecher, G. R. "Antioxidant food supplements in human health." 1999.
- Benzie, I. F. F. 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*. 39(2):53-61.
- Bilbao, M. D. M., Andres-Lacueva, C. et al. 2007. Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food Chemistry*. 101(4):1742-1747.
- Bolling, B. W., Court, M. H. et al. 2010. The kinetic basis for age-associated changes in quercetin and genistein glucuronidation by rat liver microsomes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21(6):498-503.
- Boots, A. W., Haenen, G. et al. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 585(2-3):325-337.
- Bothe, H., Gotz, C. et al. 2010. Luteolin enhances the bioavailability of benzo(a)pyrene in human colon carcinoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 498(2):111-118.
- Bredsdorff, L., Nielsen, I. L. F. et al. 2010. Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from alpha-rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 103(11):1602-1609.
- Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. 58(79-110).
- Chen, C., Zhang, H. et al. 2007. High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *Journal of Chromatography A*. 1154(1-2):250-259.
- Chen, H., Zuo, Y. G. 2007. Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit. *Food Chemistry*. 101(4):1357-1364.
- Cuyckens, H., Claeys, M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids (vol 39, pg 1, 2004). *Journal of Mass Spectrometry*. 39(4):461-461.
- de Brito, E. S., de Araujo, M. C. P. et al. 2007. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*. 105(3):1112-1118.
- de Rijke, E., Out, P. et al. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1112(1-2):31-63.
- Ding, S., Dudley, E. et al. 2008. Fingerprint profile of Ginkgo biloba nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. *Phytochemistry*. 69(7):1555-1564.
- Dopico-Garcia, M. S., Figue, A. et al. 2008. Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds? *Talanta*. 75(5):1190-1202.

- Dragovic-Uzelac, V., Pospisil, J. et al. 2005. The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity. *Food Chemistry*. 91(2):373-383.
- Dubber, M., Sewram, V. et al. 2005. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in Ginkgo biloba oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37(4):723-731.
- Fereidoon Shahidi, M. N. "Phenolics in Food and Nutraceuticals." 575. Boca Raton, 2004.
- Ferreres, F., Gomes, D. et al. 2009. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chemistry*: 114 (3) 1019-1027. 114(3):1019-1027.
- Ferreres, F., Valentao, P. et al. 2008. HPLC-DAD-MS/MS-ESI screening of phenolic compounds in *Pieris brassicae* L. reared on *Brassica rapa* var. *rapa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(3):844-853.
- Fugel, R., Carle, R. et al. 2005. Quality and authenticity control of fruit purees, fruit preparations and jams - a review. *Trends in Food Science & Technology*. 16(10):433-441.
- Galati, G., 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(3):287-303.
- Gonzalez-Neves, G., Gil, G. et al. 2010. Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23(5):447-454.
- Hakkinen, S., Auriola, S. 1998. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *Journal of Chromatography A*. 829(1-2):91-100.
- Hakkinen, S., Heinonen, M. et al. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*. 32(5):345-353.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 18(1):125-126.
- Harbaum, B., Hubbermann, E. M. et al. 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(8):8251-8260.
- Harnly, J. M., Bhagwat, S. et al. 2007. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389(1):47-61.
- Herrera, M. C., de Castro, M. D. L. 2005. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 1100(1):1-7.
- Hollecker, L., Pinna, M. et al. 2009. Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216(15):3402-3408.
- Jan, A. T., Kamli, M. R. et al. 2010. Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits An Overview. *Food Reviews International*. 26(3):302-317.
- Jin, Y., Xiao, Y. S. et al. 2008. Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius* L. by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46(3):418-430.

- Jin, Z. M., He, J. J. et al. 2009. Phenolic Compound Profiles in Berry Skins from Nine Red Wine Grape Cultivars in Northwest China. *Molecules*. 14(12):4922-4935.
- Klejdus, B., Vacek, J. et al. 2007. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389(7-8):2277-2285.
- Kumar, N., Bhandari, P. et al. 2009. Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food And Chemical Toxicology*. 47(2):361-367.
- Lees, M. "Food authenticity and traceability." 2003.
- Li, W., Deng, Y. L. et al. 2007. Chromatographic fingerprint analysis of *Cephalotaxus sinensis* from various sources by high-performance liquid chromatography-diodearray detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45(1):38-46.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M. 2007. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(4):1084-1096.
- Luximon-Ramma, A., Baborun, T. et al. 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*. 38(4):357-367.
- Ma, Y. L., Li, Q. M. et al. 1997. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 11(12):1357-1364.
- March, R. E., Lewars, E. G. et al. 2006. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 248(1-2):61-85.
- Maul, R., Schebb, N. H. et al. 2008. Application of LC and GC hyphenated with mass spectrometry as tool for characterization of unknown derivatives of isoflavonoids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391(1):239-250.
- Naczek, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054(1-2):95-111.
- Pyrzyska, K., Biesaga, M. 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 28(7):893-902.
- RiceEvans, C. A., Miller, J. et al. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2(4):152-159.
- Robards, K., Antolovich, M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review. *Analyst*. 122(2):R11-R34.
- Robbins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(10):2866-2887.
- Ryan, L., Petit, S. 2010. Addition of whole, semiskimmed, and skimmed bovine milk reduces the total antioxidant capacity of black tea. *Nutrition Research*. 30(1):14-20.
- Saurina, J. 2010. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 29(3):234-245.
- Semalty, A., Semalty, M. et al. 2010. Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: The PHYTOSOME (R) strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia*. 81(5):306-314.
- Shi, S. Y., Zhao, Y. et al. 2008. Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-radical-scavenging detection-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments. *Journal of Chromatography A*. 1209(1-2):145-152.
- Stavric, B. 1994. Quercetin in our diet - from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clinical Biochemistry*. 27(4):245-248.

- Suarez, M., Macia, A. et al. 2008. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*. 1214(1-2):90-99.
- Tian, Q. G., Giusti, M. M. et al. 2005. Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography A*. 1091(1-2):72-82.
- Toporcov, T. N., Antunes, J. L. F. et al. 2004. Fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncology*. 40(9):925-931.
- Tripoli, E., La Guardia, M. et al. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 104(2):466-479.
- Truchado, P., Ferreres, F. et al. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. *Journal of Chromatography A*. 1216(43):7241-7248.
- Tura, D., Robards, K. 2002. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*. 975(1):PII S0021-9673(0002)00879-00878.
- Usenik, V., Stampar, F. 2000. Influence of various rootstocks for cherries on p-coumaric acid, genistein and prunin content and their involvement in the incompatibility process. *Gartenbauwissenschaft*. 65(6):245-250.
- Valls, J., Millan, S. et al. 2009. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*. 1216(43):7143-7172.
- Volpi, N., Bergonzini, G. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 42(3):354-361.
- Vukics, V., Guttman, A. 2010. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi -stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 29(1):1-16.
- Vukics, V., Kery, A. et al. 2008. Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 390(7):1917-1925.
- Wang, H. B., Nair, M. G. et al. 1999. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(3):840-844.
- Wang, S. Y., Chen, C. T. et al. 2009. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*. 112(3):676-684.
- Yoshida, T., Majors, R. E. 2006. High-speed analyses using rapid resolution liquid chromatography on 1.8- μ m porous particles. *Journal of Separation Science*. 29(16):2421-2432.
- Zhang, J., Yang, J. et al. 2005. Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*. 532(1):97-104.
- Zhang, L., Zhang, R. W. et al. 2007. Development of the fingerprints for the quality evaluation of *scutellariae radix* by HPLC-DAD and LC-MS-MS. *Chromatographia*. 66(1-2):13-20.
- Zimmermann, B. F., Galensa, R. 2007. One for all- all for one: proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids - Analysis of proanthocyanidins in barley and malt. *European Food Research and Technology*. 224(3):385-393.