



# **Polifenolok és származékaik feltérképezése hármaskvadrupol tömegspektrometriás módszerrel**

**Rak Gábor**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

# 1. BEVEZETÉS

Ahogy a fejlett világ minden részén, hazánkban is egyre komolyabb veszélyt jelentenek az ún. civilizációs betegségek. 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 polifenolok is) révén.

A polifenolok 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, enzimaktivitások regulációja, jeltovábbítás a nitrogénmegkötő baktériumok számára. 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. 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. Mindezek tanulmányozása azonban nem lehetséges a megfelelő analitikai módszerek nélkül.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Mint a bevezetőből kiderült a polifenollokkal kapcsolatos mérésekben rejlő lehetőségek tárháza szinte kimeríthetetlen. 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

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

A borok eredet-meghatározásához a galluszsav, a ferulasav, a kávésav, a trans-parakumársav, a miricetin, a kempferol, a trans-resveratrol, a (+)-katehin, az (-)-epikatehin és a kvercetin tartalmát mértük. Belső standardnak naringenint használtunk. A mérőrendszernek HPLC-QQQ-MS csatolt analitikai rendszert alkalmaztunk. 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. A mérés egy osztrák-magyar közös projekt keretében valósult meg, ebből kifolyólag osztrák, autentikus borokat vizsgáltunk.

A dolgozatomban másik két fejezetében flavonoid mérőmódszereket dolgoztam ki, melyekhez szintén HPLC-QQQ-MS csatolt analitikai rendszert alkalmaztunk. A kromatográfia során gradiens programot alkalmaztunk és az egyes vegyületek detektálását a különböző MS/MS pásztázási technikák kombinálásával oldottuk meg. A háromlépéses módszert a következő flavonoid standardok segítségével dolgoztuk ki: apigenin, apigenin-7-O-glükozid, luteolin, miricetin, naringenin, naringin, kvercetin, rutin. Amit aztán egy helyi boltban vett gyümölcsleven próbáltam ki. A kétlépéses módszer kidolgozásához a luteolit, a miricetint, a naringenint, a naringint, a kvercetin, a rutint, a isokvercitrin, a hiperozidot, a daidzeint, a genisteint, a heszperitint, a heszperidint és a fizetint a robinint, a luteolin-7-O-glükozidot és a kempferol-3-O-glükozidot használtuk standard formájában. A kidolgozott módszert Magyarországon termesztett meggy mintákon próbáltuk ki.

## **4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK**

### **4.1. Autentikus borok eredetének meghatározása polifenol készletük alapján**

Borok eredetének meghatározására számos módszer ismert. Mi ebben a dolgozatban polifenolok mérésével próbáltunk következtetni a vizsgált borok eredetére.

A vörösborokban legnagyobb mennyiségben előforduló polifenolok az antocianinok és antocianidinek. Ezen vegyületek - borok eredetére vonatkozó - információ-tartalma már ismert. 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 borokba alapvetően két helyről kerülhetnek polifenolok. Az első maga a szőlő növény, a másik a fermentáció során használt közeg, elsősorban tölgyfahordók. A kiválasztott komponensek a következők lettek: galluszsav, ferulasav, kávésav, trans-para-kumársav, miricetin, kempferol, trans-resveratrol, (+)-katehin, (-)-epikatehin, kvercetin és a naringenin. Ez utóbbi nem tartozik a borokban széles körben előforduló polifenolok közé, ezért belső standardként alkalmaztuk.

A kromatográfiás elválasztás során nagy felbontású kromatográfiás oszlopot használtunk. Ezáltal sikerült 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. Az előkisérletek során bebizonyosodott, hogy az izomerek hordoznak többletinformációt a borok eredetére vonatkozóan. Az összes komponens elválasztása megvalósul 10 perc alatt, és a 15 perces kromatográfia magába foglalja az oszlopkondicionálást is.

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.

#### **4.1.1. Autentikus borok eredetének meghatározásával kapcsolatos megállapítások**

##### *1. A 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, szolgáltatva a legfontosabb eredményt. A Zweigelt a következő borvidékekről származott: Südsteiermark, Kamptal, Donauland és Thermenregionból, a Kékfrankos pedig: Carnuntum, Neusiedlersee Hügelland és Mittelburgenlandból. A borvidékek voltak a csoportos változók, a borokban mért polifenol koncentrációk pedig a független változók. Az eredmények helyessége úgynevezett leave one out (LOO) teszttel vizsgáltuk, mely a besorolás helyességét 100%-ra sorolta.

A második analízis a Carnuntum, Neusiedlersee Hügelland és Mittelburgenlandból származó Kékfrankosok elkülönítésén alapult. 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).

A kiválasztott szőlőfajták földrajzi eredetének meghatározását túlnyomórészt gazdasági körülmények indokolják. A különböző régiókból származó borok minősége és ára nagymértékben eltérő lehet. A kapott eredmények alapján ki lehet jelenteni, hogy a kidolgozott módszer segíthet az olyan irányú csalások kimutatásában, melyek a földrajzi eredet meghamisítására irányulnak.



## 2. 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. Mind a kettő csoportot ellenőriztük az LOO teszttel. Az első esetben 100 %, míg a második esetben 65 % lett a besorolás megbízhatósága.

Az első csoport eredményei kielégítőek, a csoportok jól elkülönülnek egymástól és a diszkrimináló értékek 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%).

## 3. Évjárat szerinti besorolás.

Ehhez a besoroláshoz 3 különböző adatsort vizsgáltunk. Az első az összes elérhető bor adatai, a második a Kék Zweigelt adatai, a harmadik 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 Zweigeltet azért választottuk külön, mert jól reprezentálják a kiválasztott autentikus bormintákat, de emellett jól reprezentálják az Ausztriában általánosan hozzáférhető vörösborokat is.

Az LOO teszt 95 %-os megbízhatóságot adott az első csoport esetében és 100 %-ot a második és harmadik csoport esetében. 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.

## 4.2. 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. Például 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 belefoglalható. Ezért előre meghatároztuk azon származékok körét, melyet vizsgálni kívánunk. Jelen esetben ezek öt, általánosan előforduló aglikonnak (apigenin, miricetin, luteolin, naringenin, kvercetin) a származékai voltak

#### 4.2.1. A lépések bemutatása

##### *1. Az első lépés bemutatása*

Az alapvázak azonosításához MRM módszert használtunk. Vegyületenként két jellegzetes fragmensét választottunk az azonosításhoz. Az MRM módszer beállításait standardok segítségével optimalizáltuk.

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), ennek az értéknek extrém magasra állításával érhető el, hogy az aglikon leszakadjon az anyamolekuláról az ionforrásban. 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-glükozid, a naringin (naringenin-7-O-rutinozid) és a rutin (kvercetin-3-O-rutinozid) ionforrásban történő fragmentációját vizsgáltuk meg. 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. A származékokból keletkező aglikonok intenzitása folyamatosan növekszik egy bizonyos maximum eléréséig. 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.

Mindegyik aglikon több retenciós időnél is megjelent. Az apigenin esetében csak az aglikont sikerült kimutatni, azt is csak nyomokban. 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.

## *2. A második lépés bemutatása*

Az első lépés után meg lehet állapítani, mely aglikonok származékai találhatóak 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.

Ha az előző lépéssel kapott csúcsoknak ilyen módon felvesszük a tömegspektrumát, következtetni tudunk az anyamolekulára. Az intenzív tömegcsúcsok közti különbségek alapján következtetni tudunk a kapcsolódó molekulákra. Például, ha a feltételezett anyaiion és az aglikon tömege közti különbség 162 Da az egy hexóz vesztésre utal. 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 megjelölt 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.

## *3. A 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 'enhance product ion' kifejezés rövidítése alapján: EPI) spektrumának felvételén alapul. 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.

Ennek a pártázás típusnak a segítségével megállapítható a feltételezett anyaiion és az aglikon közti összefüggés. A módszer lényegéből adódóan megjelenik az aglikon, valamint az aglikon néhány jellegzetes fragmensének tömegcsúcsa a spektrumban.

### **4.2.2. 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 csúcst. 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.

### **4.3. Kétlépéses flavonoidszarmazék azonosítási módszer**

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

#### **4.3.1. A módszer elvének bemutatása**

A mérés elve ebben az esetben is az, hogy az ionforrásban történő fragmentációt használjuk ki. A különbség abban rejlik, hogy az előző módszertől eltérően itt a kompromisszumos DP értéket vegyületsoportonként határoztuk meg. 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. 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. 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), de eltérő szerkezetük miatt másképpen fragmentálódnak, ezért az egyes vegyületek fragmentációs képe más és más lesz. Ezt kihasználva tudjuk őket szimultán meghatározni.

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. 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. Ezt az ionforrás esetében bemutatott analógiát felhasználva oldottuk meg. Itt is csoportokat alakítottunk ki. Az első tartomány  $m/z = 385-500$ , ahol az egyszerűbb származékokat vártuk, mint például a monoglikozidok. Második tartomány  $m/z = 500-700$ -ig terjed ez az a tartomány, ahol a diglikozidok várhatóak. A harmadik tartomány a maradék tömegszámokat öleli fel ( $m/z = 700-1000$ ), itt találhatóak a legösszetettebb molekulák. Minden egyes tartományban más-más paramétereket alkalmaztunk az ütközési cellában.

#### **4.3.2. Talált komponensek**

A kidolgozott módszert meggyminutákon próbáltuk ki. Sikerült 12 fajta flavonoid származékot kimutatni a kidolgozott logika szerint. Ezek a következők voltak: egy kempferol hexóz-dezoxihexóz, négy fajta luteolin hexozid (különböző retencióknál), négy fajta naringenin hexozid (szintén más-más retencióknál), egy kvercetin hexoz-dezoxihexozidot és két kvercetin triglikozidot. Ezeken kívül az általunk használt logika szerint sikerült három genistein származékot is kimutatni. Az irodalomban ugyan található utalás meggyminuták genistein tartalmára vonatkozóan, de ezt minden kétséget kizáróan bizonyítani nem sikerült. Mi is csak az aglikont találtuk meg minden kétséget kizáróan, ezért a származékokra vonatkozó megállapítások feltételesek.

## **5. 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, elektropray 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 kromatográfias futtatásban vontam össze. A kidolgozott módszert alkalmazva azonosítottam egy fekteribiszke 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.

## 6. PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉG

### Impakt faktoros folyóirat közlemények

**Rak, G.;** Fodor, P.; Abrankó, L., Three-step HPLC-ESI-MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry* 2010, 290, (1), 32-38  
**IF: 2,117**

Jaitz, L.; Siegl, K.; Eder, R.; **Rak, G.;** Abranko, L.; Koellensperger, G.; Hann, S., LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry* 2010, 122, 366-372. **IF: 3,146**

### Publikáció konferencia kiadványban

#### Magyar nyelvű (összefoglalók):

**Rak, G.;** Béres, I.; Bognár, Á.; Abranko, L.; Fodor, P., Borok Pb-izotóp arányainak mérése ICP-TOFMS technikával. In *Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak*, Budapest, 2005.

Abranko, L.; Brunner, M.; Katona, R.; Jaitz, L.; **Rak, G.;** Fodor, P.; Hann, S.; Prohaska, T.; Stefánka, Z., Élelmiszerek eredet-meghatározása tömegspektrometriás módszerekkel. In *Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés*, Nyíregyháza, 2008.

#### Nemzetközi (teljes):

Balogh, E.; **Rak, G.;** Stefanovits-Bányai, É.; Hegedűs, A.; Abranko, L. In Profiling flavonoid derivatives in Hungarian berry fruits, *International Mass Spectrometry Conference Bremen, Germany, 30 Aug-4 Sept, 2009; Bremen, Germany, 2009.*

**Rak, G.;** Fodor, P.; Abrankó, L., Three-step HPLC-ESI-MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. *International Mass Spectrometry Conference Bremen, Germany, 30 Aug-4 Sept, 2009; Bremen, Germany, 2009.*

#### Nemzetközi (összefoglaló):

**Rak, G.;** Abranko, L.; Fodor, P., MULTI-ELEMENT ANALYSIS OF HUNGARIAN WINES BY COLLISION CELL ICP-MS AND THEIR CLASSIFICATION ACCORDING TO GEOGRAPHICAL ORIGIN, . In *European Winter Conference on Plasmaspectrochemistry Taormina, 2007*

**Rak, G.;** Abranko, L.; Fodor, P., Application of elemental fingerprinting for Hungarian wines Pumpaya Conference, Nagymaros, 2007

**Rak, G.;** Abranko, L.; Fodor, P., Development of multicomponents flavonoid detection by HPLC-MS/MS, Pumpaya Conference, Drösendorf, 2008

Balogh, E.; Szilvássy, B.; **Rak, G.;** Engel, R.; Stefanovits-Bányai, É.; Hegedűs, A.; Abranko, L., Characterisation of selected compounds contributing to the antioxidant status of red and black currants grown in Hungary. In *Young Scientists Meeting - Future trends in phytochemistry in the global era of agri-food and health*, Los Alcázares, Murcia, Spain, 2009.

Nagy, Á.; **Rak, G.;** Szilvássy, B.; Hegedűs, A.; Abranko, L., Characterization of compounds providing the total antioxidant capacity in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids grown in Hungary. In *The 4th International Conference on Polyphenols and Health*, Harrogate, England, 2009.