



Szent István Egyetem

**HPLC ÉS GC-MS MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE A
PARADICSOMBAN ÉS A FŰSZERPAPRIKÁBAN
ELŐFORDULÓ KAROTINOIDOK ÉS AROMAANYAGOK
MEGHATÁROZÁSÁRA**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Bori Zsuzsanna

Gödöllő
2016

BEVEZETÉS

A paradicsom és fűszerpaprika a bennük található bioaktív vegyületeknek köszönhetően – mint például az antioxidáns hatású vitaminok (E-vitamin, C-vitamin), karotinoidok, polifenolok – a táplálkozás során számos, a szervezet számára jótékony, egészségmegőrző tulajdonsággal rendelkeznek. Több tanulmányt is készítettek, ahol a zöldségekkel, gyümölcsökkel a szervezetbe bevitt antioxidánsok mennyiségét és bizonyos betegségek kialakulásának gyakoriságát vizsgálták. Kimutatták, hogy azokban az esetekben, ahol a vizsgált személyek több antioxidánst fogyasztottak, kisebb valószínűséggel alakult ki szív- és érrendszeri, szemészeti, emésztőszervi, neurodegeneratív rendellenesség, illetve rákos megbetegedés. Azokban az esetekben, ahol már jelen voltak ezek a betegségek, az antioxidánsok fogyasztása javított a beteg állapotán. A legtöbb antioxidáns hatású karotinoidot a paradicsomban és a paprikában azonosították. Az ilyen alapú termékek fogyasztása után a humán plazmában megnőtt a karotinoidok koncentrációja, ezáltal aktívabban tudták kifejteni kedvező hatásukat a szervezetben. A paprika és a paradicsom vonzó színét a bennük található sárga és piros karotinoidok szabad illetve zsírsavakkal észterezett mono- és diészter formája alakítja ki. Technológiai szempontból a paradicsom és fűszerpaprika, valamint a belőlük készített termékek stabilitására hatással van a szín intenzitása. A szín mellett a paradicsom és fűszerpaprika esetében is fontos az aromaösszetétel, ami változik az érés folyamán, valamint a feldolgozás során.

KUTATÁSAIM SORÁN A KÖVETKEZŐKET TŰZTEM KI CÉLUL:

1. Hatékony GC-MS módszer fejlesztése aromakomponensek elválasztására fűszerpaprika, paradicsom és paradicsomkészítmények esetében.
2. Magyar, külföldi, valamint füstölt fűszerpaprikák egyedi, megkülönböztetést szolgáló komponenseinek meghatározása.
3. HPLC módszer fejlesztése és megfelelő elúció kidolgozása a szappanosított fűszerpaprikában található karotinoidok elválasztására keresztkötésű C18 oszlop alkalmazásával.

4. Hatékony elúciós rendszer kidolgozása a paradicsomban található karotinoidok és geometriai izomerjeik elválasztására az új típusú tömör magvú (core) C30 oszlop alkalmazásával.
5. A tömör magvú C30 oszloppal elválasztott azonosítatlan karotinoidok meghatározása LC-MS technikával.
6. A kifejlesztett módszerek alkalmazása különböző hazai és külföldi paradicsomkészítmények és fűszerpaprikák karotinoidösszetételének meghatározására.

ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:

Az aromavizsgálatokhoz különböző eredetű: magyar, spanyol, dél-afrikai, kínai, argentin, valamint füstölt fűszerpaprikákat használtam fel. Az aromaösszetétel mellett a karotinoidösszetételt is vizsgáltam a fűszerpaprikák, valamint különböző színű Heirloom típusú paradicsomok és kereskedelmi forgalomból beszerezhető paradicsomkészítmények esetében.

Az aromakomponenseket vízgőzdesztillációval vontam ki. Az extraktumokban található aromakomponensek vizsgálata Thermo Trace 1300 Series Single Quadrupole GC-MS segítségével történt. Az elválasztáshoz SLBTM-5MS fused silica 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm kapilláris oszlopot alkalmaztam. A mérések során az injektor hőmérséklete 200°C volt, split módban. A vizsgálatokhoz 1 µl-t injektáltam, a vivőgáz 1 ml/min áramlási sebességű hélium (4.6) volt. A kemence felfűtése 50°C-on indult, és több lépéssel 230°C-ra fűtött fel 30 perc alatt. A vizsgálat során a detektor a 35-350 Da közötti tömegtartományt vizsgálta. A detektor hőmérséklete 260°C, az ionforrás hőmérséklete 240°C volt.

A fűszerpaprika karotinoidjainak elválasztást keresztkötésű UHPLC oszlopon (5 cm, 1,8 µm) végeztem. Az elválasztás gradiens elúcióval történt (A) aceton - (B) víz segítségével. Az elúció kezdetben 20% B A-ban, majd 25 perc alatt 100% A-ra, végül 5 perc alatt visszatért a kezdeti 20% B A-ban. Az áramlási sebesség 0,4 ml/perc volt.

A paradicsom és a szappanosított fűszerpaprika színanyagainak elválasztására szilárd magvú (core) C30 (15 cm, 2,6 µm) oszlopot alkalmaztam. A gradiens elúció (A) metanol - (B) *terc*-butil-metil-éterben történt. A gradiens 100% A-val kezdődik, és 30 perc alatt 30% B A-ban, végül 5 perc alatt visszatér 100% A-ra. Az áramlási sebesség 0,7 ml/perc volt.

A kvantitatív meghatározás mindkét elválasztás esetében diódasoros detektorral (DAD, 190-600 nm) történt, minden komponens esetében a maximális abszorbanciához tartozó hullámhosszon.

AZ ELÉRT EREDMÉNYEIMET AZ ALÁBBI PONTOKBAN FOGLALOM ÖSSZE:

- A fűszerpaprikában és a paradicsomban található aromakomponensek meghatározásához GC-MS módszert fejlesztettem és validáltam. A pontosság 0,22%, a visszanyerés 95,2%, a LOD értéke 2,9-6,4 ng/ml, míg az LOQ 10,1-14,5 ng/ml. A standardok csúcs alatti terület és koncentráció közötti regressziós faktora 0,9499-1,000 volt.
- A magyar fűszerpaprika mintákban 143 komponenst azonosítottam. Az aromakomponensek közül három csak a magyar fűszerpaprikákban volt jelen: a 2-metil-tetradekán, α -normetadol és a hexilfahéjsav-aldehid.
- A spanyol fűszerpaprikákban 108 komponenst azonosítottam, melyekből öt csak a spanyol eredetű fűszerpaprikákban volt jelen: a *p*-metil-anizol, 1-metilcikloheptanol, D-kámfor, *p*-acetiltoluol és a verbenon.
- Két Argentínából származó: egy édes és egy extra édes, kereskedelmi forgalomban lévő őrölt fűszerpaprikát vizsgáltam, összesen 96 komponenst azonosítottam. A mintákban 12, csak az argentin eredetű fűszerpaprikában megjelenő komponenst detektáltam: a fenilpropán típusú miriszticin, β -izoszafról, elemicin és izoelemicin, kumaldehid; bizabolán vázas ar-turmeron és curlone; a szeszkviterpén D-germakrén és α -kubeba; ciklikus monoterpén; szeszkviterpén α -fellandrén; monoterpén alkohol α -terpinolén; és a biciklikus monoterpén β -pinén.
- A Dél-Afrikából származó fűszerpaprika őrlemény esetében 121 komponenst azonosítottam, amiből három csak a Dél-Afrikában termesztett fűszerpaprikákban jelent meg: 2-bornén, elemol, γ -eudeszmol.

- A Kínából származó fűszerpaprika őrleményekben 124 aromakomponenst detektáltam. A kínai eredetet igazoló komponensek a 2,4-heptadién-1-al, 5-etil-3-heptén-2-on, izopropil-ciklohexán, 2-*transz*-4-*transz*-dekadiénal.
- A magyar és spanyol füstölt fűszerpaprika vizsgálata alapján megállapítottam, hogy a spanyol fűszerpaprika jellemzően sok naftalinvázis molekulát tartalmazott.
- A vizsgált friss paradicsomokról és termékekről elmondható, hogy nagy mennyiségben hexanalt tartalmaznak. A hexanal mellett a *transz*-2-hexén-1-al koncentrációja sem elhanyagolható. Ez a komponens az érettparadicsom-illat kialakulásáért felelős. A többi, kisebb mennyiségben jelen lévő terpének, karotinoid bomlástermékek, gyűrűs molekulák, alkoholok, aldehidek, ketonok, savak, szénhidrogének, észterek komplex jelenléte okozza a paradicsomok jellemző illatát, zamatát.
- A fűszerpaprika karotinoidjainak elválasztására a keresztkötésű C18 UHPLC oszlop kitűnően alkalmasnak bizonyult. A pontosság lutein esetében 2,36%, míg β -karotin esetében 6,27% volt. A visszanyerési vizsgálat eredménye lutein esetében 93%, míg β -karotin esetében 92% volt. Lutein esetében a detektálási határ 19,44 ng/ml a kimutatási határ 64,79 ng/ml, β -karotin esetében a detektálási határ 8,28 ng/ml, míg a kimutatási határ 27,61 ng/ml volt. A lutein esetében a lineáris tartomány 0-6 μ g/ml-es koncentráció közé esett, míg β -karotin standard esetében 0-15 μ g/ml közé. A kapacitási faktor 0,4 és 13 közötti értéket mutat, az elméleti tányérszám 920 ill. 270000.
- A C30 oszlopon történő elválasztás esetében a pontosság 1,91-2,38%, a visszanyerés 94-99,9%, a detektálási határ 0,008-0,17 ng/ml, míg a kimutatási határ 0,029-0,059 ng/ml közötti értékeket vett fel. A standardok korrelációs faktora 0,9974-0,9999 közötti értékeket mutatott.
- C18 keresztkötésű oszlop alkalmazásával fűszerpaprika őrleményekből 26 komponenst, a C30 tömör magvú oszlop alkalmazásával pedig 43 komponenst detektáltam, azonosítottam, és mennyiségileg meghatároztam.

- Friss paradicsomok illetve paradicsomtermékek karotinoidösszetételét meghatároztam C30 oszloppal, amely nagy hatásfokkal és felbontással választotta el mind a nagy mennyiségben, mind a kis mennyiségben jelenlévő komponenseket és izomerjeiket, különös tekintettel a likopinra és a β -karotinra, melyek ipari és táplálkozási szempontból kiemelkedő jelentőségűek.
- A spektrumfelvételek alapján nem egyértelműen azonosítható komponensek meghatározása érdekében LC-MS/MS technikával azonosítottam a paradicsomban és paradicsom termékekben található likopin és β -karotin diepoxidjait.
- A Heirloom típusú sárga illetve narancssárga színű paradicsomok karotinoidösszetételét meghatározva megállapítottam, hogy a fő komponenseik a proneurosporin, prolikopin és zéta-karotin.
- Kereskedelmi forgalomban kapható külföldi illetve magyar paradicsomtermékeket vizsgáltam, és kimutattam a valódi karotinoidösszetételt, melynek alapján a különböző termékeket értékeltem. A legnagyobb likopinkoncentrációt (343 $\mu\text{g/g}$) az LS Pomil termékben detektáltam. A legmagasabb β -karotin koncentráció (20,3 $\mu\text{g/g}$) a magyar Kecskeméti termékben volt detektálható. A paradicsompürék között a legmagasabb likopinkoncentráció a Tesco-ból származó pürében volt (728,9 $\mu\text{g/g}$). Ketchupok között a Globus termékben 1099,1 $\mu\text{g/g}$ likopint, míg az Univer ketchupban a legmagasabb β -karotin koncentrációt (31,7 $\mu\text{g/g}$) mértem. A sűrített paradicsomok közül a Carloni S5 termékben volt a legmagasabb likopin (1507,2 $\mu\text{g/g}$) és β -karotin (95,1 $\mu\text{g/g}$) koncentráció.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEIM

1. Hatékony GC-MS módszert fejlesztettem és validáltam aromakomponensek elválasztására fűszerpaprika, paradicsom és készítményei esetében. Fűszerpaprika esetében több mint 140 komponenst azonosítottam, míg paradicsom esetében közel 100 komponenst. Olyan aromavegyületeket mutattam ki, amelyek egyes mintákban előfordulnak, de a többi mintában nem. Megállapítottam, hogy a fűszerpaprika füstölése során legalább 35 új komponens azonosítható. Ezen komponensek detektálása igazolja a füstölést, valamint koncentrációjuk a füstölés mértékét.
2. Megállapítottam, hogy a friss paradicsomok aromaprofilja számottevően nem különbözik egymástól, viszont az íz és szín között jelentős különbség van. Ráadásul a feldolgozott paradicsomkészítményekben jelentősen csökkent a friss paradicsomokra jellemző hexanal és a *transz*-2-hexén-1-al koncentrációja.
3. Két HPLC módszert fejlesztettem és validáltam a szappanosított fűszerpaprikában található karotinoidok elválasztására és meghatározására. Az egyik módszerben keresztkötésű, kevésbé poláros C18 oszlopot és víz-aceton gradiens elúciót alkalmaztam a karotinoidok elválasztására. A másik módszerben szilárd magvú (core) C30 15 cm, 2,6 µm-es oszlopot alkalmaztam metanol-*terc*-butil-metil-éter (TBME) alapú gradiens elúcióval. A keresztkötésű oszloppal 26 komponenst, míg a C30 oszloppal 43 komponenst sikerült kimutatnom fűszerpaprika mintákból.
4. Az LC-MS/MS technika alkalmazásával azonosítottam a likopin és β-karotin diepoxidjait, amelyek a DAD felvétel és a kromatográfiás tulajdonságok alapján nem voltak egyértelműen azonosíthatók. A fejlesztett módszerrel egyidőben meghatároztam a fő komponensek és egyéb kisebb koncentrációban jelenlévő karotinoidok *all-transz* és *cisz* izomerjeit, amelyeknek nagy biológiai, táplálkozástudományi és technológiai jelentőségük van. Ezzel a módszerrel új adatokat biztosítottam a friss paradicsomokban illetve a paradicsomtermékekben lévő karotinoidok valódi összetételéről és tartalmáról.

MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóirat közlemények:

Koncsek, A., Kruppai, L., Helyes, L., Bori, Z. and Daood, H. G. (2015), Storage Stability of Carotenoids in Paprika from Conventional, Organic and Frost-Damaged Spice Red Peppers as Influenced by Illumination and Antioxidant Supplementation. Journal of Food Processing and Preservation. doi: 10.1111/jfpp.12623 (IF:1,16)

Zsuzsanna Bori, Gábor Csiffáry, Diána Virág, Marianna Tóth-Markus, Attila Kiss, Nóra Adányi: Determination of L-Lactic Acid Content in Foods by Enzyme-Based Amperometric Bioreactor. Electroanalysis (2012): 24, No. 1, 158–164. (I.F. 2,721)

Nóra Adányi, Zsuzsanna Bori, István Szendrő, Katalin Erdélyi, Xiaohong Wang, Heinz C. Schröder, Werner E.G. Müller: Bacterial sensors based on biosilica immobilization for label-free OWLS detection. New Biotechnology (2013): 30, Issue 5, 493-499.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2013.01.006> (I.F. 2,756)

Nóra Adányi, Zsuzsanna Bori, István Szendrő, Katalin Erdélyi, Xiaohong Wang, Heinz C. Schröder, Werner E.G. Müller: Biosilica-based immobilization strategy for label-free OWLS sensors. Sensors and Actuators B: Chemical (2013): 177 1-7 (I.F. 3,898)

Nem impakt faktoros folyóirat közlemények:

Nagy Zs., Burjan Sz. Sz., Ambrozy Zs., Bori Zs. (2014), Mycorrhiza inoculation and reduction of some nutritional value of tomato by irrigation. Növényterm. 63:103-106. DOI: 10.12666/Növényterm.63.2014.

Konferencia kiadványok:

Bori Zsuzsanna, Szendrő István, Adányiné Kisbocskói Nóra: Tejsavbaktériumok vizsgálatára alkalmas valós idejű, jelölésmentes szenzor fejlesztése. MKE 1. Nemzeti Konferencia (2011. május 22-25. Sopron) Program és előadás összefoglalók p. 235. (Poszter díj)

Adányiné Kisbocskói Nóra, Bori Zsuzsanna, Szendrő István: OWLS alapú mikrobiális szenzorok fejlesztése. MKE 1. Nemzeti Konferencia (2011. május 22-25. Sopron) Program és előadás összefoglalók p. 299.

Nemzetközi konferencia összefoglaló:

N. Adányi, Zs. Bori, I. Szendrő, K. Erdélyi, X. Wang, H.C. Schröder, W.E.G. Müller:
Bacterial sensors for food safety based on biosilica immobilization for label-free OWLS sensors. EUROanalysis 2011 16th European Conference on Analytical Chemistry (Belgrad, Serbia, 11-15 Sept. 2011) SE01.