



# **BIOAKTÍV PEPTIDEK ANALITIKAI MEGHATÁROZÁSA**

**Rapi Sándor**

Doktori értekezés

**Témavezető:**

Dr. Fodor Péter

Készült:

Szent István Egyetem  
Élelmiszertudományi Kar

**2017**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Vatai Gyula  
Egyetemi tanár, DSc  
Szent István Egyetem  
Élelmiszertudományi Kar  
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek  
Tanszék

**Témavezető:** Dr. Fodor Péter  
Professor emeritus, DSc  
Szent István Egyetem  
Élelmiszertudományi Kar  
Alkalmazott Kémia Tanszék

## **A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Szent István 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 Szent István Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács ÉDI-PhD-18/2017-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi Bíráló Bizottságot jelölte ki:

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

Elnöke:

Dr. Biacs Péter Ákos, DSc, SZIE

Tagjai:

Stefanovitsné Dr. Bányai Éva, DSc, SZIE

Dr. Jedlovszky Pál, DSc, EKE

Dr. Marschall Marianna, PhD, EKE

Dr. Prokisch József, PhD, DE

Opponensek:

Dr. Posta József, DSc, DE

Dr. Dombi György, CSc, SZTE

Titkár:

Dr. Csimá György PhD, BCE

# Tartalom

Rövidítések jegyzéke .....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	9
2.1. A kutatás során tanulmányozott peptidok élelmiszeripari felhasználása .....	12
2.2. A kutatózott peptidok antioxidáns tulajdonságai .....	14
2.3. A kutatózott peptidok stabilitási viszonyai .....	16
2.4. A kutatózott peptidok kromatográfiás meghatározásának lehetőségei.....	19
3. CÉLKITŰZÉS .....	21
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	22
4.1. Spektrofotometria, a peptidok maximális abszorbancia hullámhosszának meghatározása .....	22
4.2. Diódasoros (DAD) detektálási módszerek kis molekulatömegű peptidok kromatográfiás meghatározásánál.....	23
4.3. Fényszóráson alapuló (ELS) detektálási módszerek kis molekulatömegű peptidok közvetlen kromatográfiás meghatározására .....	24
4.4. Komplexképző fémek alkalmazása a peptid stabilitás növelése érdekében .....	25
4.5. A peptidok folyadék-kromatográfiás meghatározása danzil-kloriddal történt származékképzést követően .....	26
4.6. Peptid vegyületek kromatográfiás meghatározása OPA származékképzést követően UV/VIS és fluoreszcens detektálás (RF) mellett .....	28
4.7. Természetes peptidok stabilitásának meghatározása különböző környezeti hatások függvényében.....	29
4.8. Természetes peptidok stabilitásának vizsgálata komplexképző fémek alkalmazásával .....	31
4.9. A vizsgált peptid származékok antioxidáns aktivitásának meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) módszer alapján .....	32
4.10. Élelmiszerminták peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszerek alapján .....	33
4.11. A kutatás során alkalmazott kiértékelési módszerek .....	34
5. EREDMÉNYEK, ÉRTÉKELÉS.....	35
5.1. Maximális elnyelési hullámhosszok meghatározása a vizsgált peptidok esetén .....	35
5.2. Kromatográfiás vizsgálatok értékelése diódasoros (DAD) detektálás alapján.....	36
5.3. Fényszóráson alapuló (ELS) detektálási vizsgálatok értékelése kis molekulatömegű peptidok kromatográfiás meghatározása során .....	37
5.4. Komplexképző fémek alkalmazása a peptid stabilitás fokozása érdekében .....	38
5.5. Danzil-kolliddal végrehajtott származékképzési módszer eredményei .....	43
5.6. OPA származékképzést követő meghatározás eredményei .....	51
5.6.1. UV/VIS (DAD) detektálás OPA származékképzést követően.....	51

5.6.2. Fluoreszcens detektálás (RF) eredményei OPA származékképzést követően.....	57
5.7. Peptidek stabilitásának vizsgálata környezeti paraméterek függvényében.....	62
5.7.1. Tiol csoportot nem tartalmazó peptidek stabilitási viszonyai a környezeti hatások függvényében.....	62
5.7.2. Tiol csoportot tartalmazó peptidek stabilitási viszonyai a környezeti hatások függvényében .	64
5.8. Komplexképző fémek stabilizáló hatásának vizsgálati eredményei és értékelésük .....	66
5.9. A vizsgált peptid vegyületek antioxidáns aktivitásának meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) módszer alapján .....	75
5.10. Élelmiszerminták peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszerek alapján .....	77
6. KÖVETKEZTETÉSEK .....	83
JAVASLATOK .....	85
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	86
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	88
9. SUMMARY .....	91
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	93
11. ÁBRAJEGYZÉK.....	102
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	106

## Rövidítések jegyzéke

AAE	Ascorbic Acid Equivalent, aszkorbinsav egyenérték
ACN	Acetonitril, metil-cianid
Ala-Gln	Alanil-Glutamin, L-Alanil- $\gamma$ -L-glutamin
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization, Légtörési nyomáson történő kémiai ionizáció
Apm	Aspartame, Aszpartám, <i>N</i> -(L-alfa-aszpartil)-L-Fenilalanin-1-metilészter
DAD	Diode Array Detector, Diódasoros detektor
DCL	Danzilchloride, danzil-klorid
D <sub>L</sub>	Detection Limit, Kimutatási határ
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector, Fényszóráson alapuló detektor
ESI	Electrospray ionization, Elektrospray ionizáció
FDA	United States of America Food and Drug Administration, Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal
FMOZ	9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride, 9-Fluorenil-metoxikarbonil- klorid
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma, vasredukálóképesség
GLD	Gluconodelta-lacton, glukonodelta-lakton
Gln	Glutamine, Glutamin
Gly-Gln	Glycine-Glutamine, Glicin-L-Glutamin
Gsh	Glutathione, Glation, (2 <i>S</i> )-2-Amino-5-[[ <i>(2R)</i> -1-(carboximetilamino)-1-oxo-3-szulfanilpropán-2-yl]-amino]-5-oxopentánsav
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Nagy Teljesítményű Folyadékkromatográfia
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry, Tömegdetektorral kapcsolt Nagy Teljesítményű Folyadékkromatográfia
Ile-Gln	Isoleucine-Glutamine, Izoleucin-Glutamin
L-Kar, $\beta$ -Ala-His	L-Carnosine, L-Karnozin, (2 <i>S</i> )-2-[(3-Amino-1-oxopropil) amino]-3-(3 <i>H</i> -imidazol-4-yl) propánsav
Leu-Gln	Leucine-Glutamine, Leucin-L-Glutamin
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization , Mátrix segített lézer ionizáció
MeOH	Methanol, metanol
MS/MS	Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry, Többszörös tömeganalízis, tandem tömegspektrometria
OPA	Ortho-phthalaldehyde, Ortodiftálaldehid
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity, Oxigén szabadgyök elnyelő kapacitás
ppb	Parts per Billion, milliárdrészes, $\mu$ g/kg mennyiség
ppm	Parts per Million, milliomodrészes, mg/kg mennyiség
RF	Fluorescence Detector, Fluoreszcens detektor

R <sub>t</sub>	Retention time, retenciósi idő
TFA	Trifluoroacetic acid, Trifluor ecetsav
TOF	Time-of-flight Mass Spectrometry, Repülési idő analizátor
TPTZ	tripirydyltriazine, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin
TRAP	Total Reactive Antioxidant Potential, Teljes aktív antioxidáns képesség
UV/VIS	Ultraviolet–visible spectroscopy, Látható és Ultra Ibolya (spektroszkópia)
Val-Gln	Valine-Glutamine, Valin-L-Glutamin
γ-Glu-Cis	γ-L-Glutamyl-L-cysteine , γ-Glutamil-Cisztein, γ-L-Glutamil-L-Cisztein

## 1. BEVEZETÉS

A kis molekulatömegű peptidek egy fontos vegyületcsalád tagjai, melyek gyakran kulcsszerepet játszanak különböző fiziológiás folyamatokban (HARTMANN és MEISEL, 2007). Humán klinikai és élelmiszertudományi területeken egyre jelentősebb alkalmazásuk és ebből adódó kutatásuk, szerepük pontos meghatározása és tisztázása. Számos klinikai és élelmiszertudományi kutatás helyezi központba a kis molekulatömegű peptidek vizsgálatát, így elősegítik a hatásmechanizmusukkal és pontos detektálásukkal kapcsolatos ismeretek bővítését. A kis molekula tömegű peptid vegyületek fiziológiai tulajdonságai között fontos megemlíteni, hogy ásványi anyagok komplexképzőiként szerepelhetnek (WALKER *et al.* 2006), opioid tulajdonsággal rendelkezhetnek (ZENK, 1996), agonista- és antagonistá hatásokat fejthetnek ki a szervezetben (TAKAHASSHI *et al.* 2000, FUKUDOME és YOSHIKAWA 1993, SILVA és MALCATA 2005, CLARE és SWAISGOOD, 2000), néhány esetben vérnyomáscsökkentő hatásuk is igazolt (KODERA és NIO 2006, NAGAI *et al.* 2006, VERCRUYSSSE *et al.* 2005, MIGUEL és ALEIXANDRE 2006).

A természetes peptidekhez rendelhető funkcionális tulajdonságok közül fontos kiemelni a lehetséges antioxidáns (ERDMANN *et al.* 2006, ZHU *et al.* 2006, HERNANDEZ-LEDESMA *et al.* 2005) és antimikrobiális (MINE és KOVACS-NOLAN 2006, McCANN *et al.* 2006, HAYES *et al.* 2006) tulajdonságokat. Érdeemes megemlíteni a di- és tripeptidek trombólízisellenes (CHABANCE *et al.* 1995), koleszterinszint- és trigliceridszint-, ezáltal az elhízás rizikófaktorát csökkentő tulajdonságát is (WANG és de MEJIA 2005, NAGAOKA *et al.* 2001.). Sok esetben kimutatható az ízfokozó és ízmódosító hatásuk, továbbá ismert néhányuk édesítő vagy savanyú ízt fokozó tulajdonsága.

A széles spektrumú biológiai hatás ígéretessé teszi a kis molekula tömegű peptid molekulákat funkcionális élelmiszerekben való alkalmazásra, az élelmiszeripari alkalmazás- és biztonság azonban megköveteli a célvegyületek pontos, megbízható és reprodukálható analitikai meghatározását. Sok esetben az élelmiszeripari alkalmazást a peptid származékok kis stabilitása hátráltatja, ebben az esetben a stabilitási problémák kiküszöbölésével funkcionális élelmiszerek adalékaiként is felhasználhatóvá válhatnak.

A kis molekulatömegű peptidek kimutatási módszerei közé sorolhatók kromatográfiás (folyadékkromatográfia, gélkromatográfia, méretkizárásos kromatográfia) meghatározási módszerek, tömegspektrometriás módszerek és ezek kombinációi. A modern eljárásokban és meghatározási módszerekben közös, hogy jelentős anyagi beruházást igénylő műszerpark szükséges a kutatott komponensek analitikai meghatározásához. A főként az élelmiszeriparhoz köthető fejlesztő laboratóriumok jelentős része azonban nem mindig



rendelkezik a legmodernebb eszközökkel, ebből adódóan szükséges egy olyan meghatározási metodika, mely megbízhatóan és reprodukálható módon biztosítja vizsgálatukat és meghatározásukat.

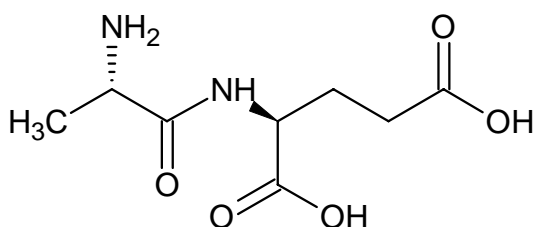
A pontos és precíz analitikai módszerek lehetőséget biztosítanak a peptidek koncentrációjának különböző élelmiszerekben történő megbízható meghatározására. A kutatás során a kis molekula tömegű peptidek humánbiológiai területen és az élelmiszerparban betöltött, vagy betölthető szerepük és tulajdonságaik figyelembe vételével tartottam fontosnak folyadékkromatográfiás meghatározásukat és stabilitási tulajdonságaik meghatározását célzó kutatásokat.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A peptidek az élő szervezet fontos építőelemei, melyek aminosavakból épülnek fel amid kötés kialakulásán keresztül (egy aminosav-molekula karboxil csoportjával és egy másik aminosav molekula amino- csoportjával történő kondenzációját jelenti vízkilépés mellett). A kötésben részt vevő aminosav monomerek száma alapján történik a peptidek elnevezése. A 2-10 aminosavat tartalmazó peptideket oligopeptideknek nevezzük, közülük a két aminosavat tartalmazók a di-, a három aminosavat tartalmazó molekulák a tripeptidek. Annak függvényében, hogy a peptid kötésben részt nem vevő funkciócsoportok milyen más vegyületekhez (lipidek, szacharidok) kapcsolódnak, gliko- és foszfopeptid elnevezést kapnak. A peptidekről megállapítható, hogy méretük az aminosavak és a fehérjék közé tehető, általános tulajdonságaik is ezen két vegyületcsoport közé sorolható. Szilárd halmazállapotúak, relatíve magas olvadási és bomlásponttal rendelkeznek. Vízen általában jól oldódnak, azonban oldékonyságuk csökkenhet a hidrofób oldalláncok számának növekedésével. A peptidek az élő szervezetben igen elterjedtek, azonban mennyiségük csekély, kimutatásuk és mennyiségi meghatározásuk nehézkes.

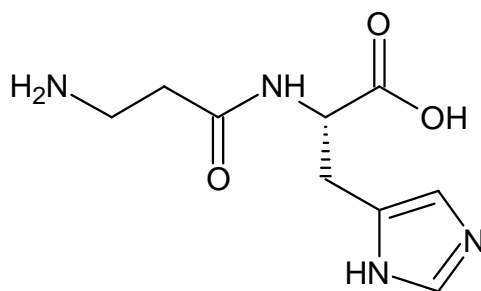
A kutatott peptidek élelmiszeripari felhasználása, stabilitási tulajdonságai, antioxidáns hatásuk és kromatográfiai meghatározásuk lehetőségei külön alfejezetekben kerülnek ismertetésre az irodalmi áttekintés fejezetében, mivel ezen tulajdonságok részletes ismerete alapvető fontosságú az eredmények kiértékelése és a konklúziók meghatározása során.

A kutatómunka során a következő ábrákon bemutatott öt vegyületet tanulmányoztam, melyek rendelkeznek a fentebb felsorolt hatásokkal, némelyikük egyszerre akár többel is, egyes fiziológiai folyamatokban.

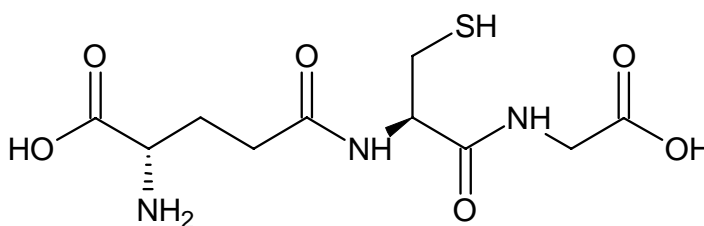


1. ábra Alanil-glutamin, L-alanil- $\gamma$ -L-glutamin szerkezeti képlete

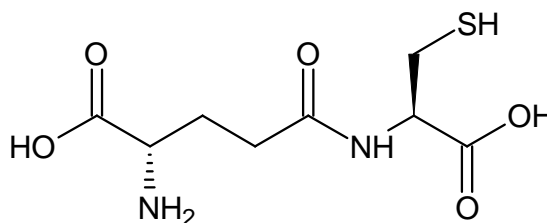
(forrás: saját szerkesztés)



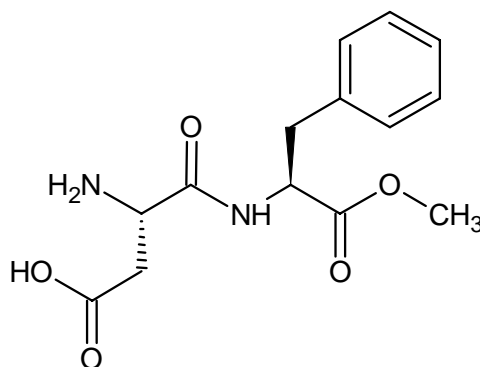
**2. ábra** L-karnozin, (2*S*)-2-[(3-Amino-1-oxopropil) amino]-3-(3*H*-imidazol-4-yl) propánsav szerkezeti képlete (forrás: saját szerkesztés)



**3. ábra** Glutation, (2*S*)-2-Amino-5-[[((2*R*)-1-(karboximetilamino)-1-oxo-3-szulfanilpropán-2-yl)-amino]-5-oxopentánsav szerkezeti képlete (forrás: saját szerkesztés)



**4. ábra**  $\gamma$ -Glutamil-cisztein,  $\gamma$ -L-Glutamil- L-cisztein szerkezeti képlete (forrás: saját szerkesztés)



**5. ábra** aszpartám, *N*-(L-alfa-aszpartil)-L-fenilalanin-1-metilészter szerkezeti képlete (forrás: saját szerkesztés)

A glutation fontos szerepet játszik az állati sejtekben lezajló redox folyamatokban, emellett korábban igazolták tumorelles és parazitaellenes tulajdonságát is (PASTORE *et al.* 2003).

Az aszpartám széles körben alkalmazott, alacsony kalóriatartalmú, szintetikus édesítőszer (SARDESAI és WALDSHAN 1991, SCHIFFMAN és GATLIN 1993, GIBBS *et al.* 1996). Széles körben alkalmazzák az élelmiszeriparban, mivel szobahőmérsékleten és kis nedvességtartalom mellett jelentős stabilitást mutat. Stabilitása azonban nagymértékben csökken magas hőmérsékleten.

Az L-karnozin különböző oxidációs folyamatok résztvevőjeként az enzimaktivitást gátolhatja, másrészt jelentős pH-szabályozó szerepet is betölt a szövetekben (CRUSH, 1970, ZALOGA *et al.* 1996). Ezen túlmenően a szabadgyökök semlegesítésével és megkötésével jelentős szerepet tölt be különböző antioxidáns folyamatokban is és tanulmányok rámutattak, hogy növeli a sejten belüli kalcium szintjét (ZALOGA *et al.* 1997, LAMONT és MILLER 1992, ZAPATA-SUDO *et al.* 1997). Odashima és munkatársai (2006) kimutatták, hogy a karnozin-cink komplex jótékony hatású az emésztőrendszeri megbetegedések terápiás kezelésében, melyet karnozin-tartalmú élelmiszerek cinkkel történő adagolásával a keleti gyógyászatban régóta alkalmaznak. A közleményben kutatott élelmiszerek pozitív szerepet játszanak a fibroblasztok működésében és jelentős hatást fejtenek ki a sejtek öregedési folyamatainak megakadályozásában is.

A  $\gamma$ -glutamil-cisztein fontos szerepet játszik a növényi sejtek fémtartalmának szabályozásában, kelátképző tulajdonsága által (CHEKMENEVA *et al.* 2008). A dipeptid egységek magasabb rendű oligomerekből képződnek a növényekben, melyek segítségével a növény képes hatékonyan védekezni a nehézfémek okozta mérgezések- és a mérgezés kiváltotta stresszel szemben.

Az alanil-glutamin dipeptid stabil, vízoldható formája az alanil és glutamin aminosavakból felépülő peptid molekulának, melyet az egészségügyben gyakran alkalmazott táplálék-kiegészítőként tartanak számon (BURKE *et al.* 1989, STEHLE *et al.* 1989, FÜRST *et al.* 1997, MORLION *et al.* 1998). A vérben hidrolízis által emelkedett glutamin szintet eredményez, mely az emberi szervezetben a vér és sejtanyagokban az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló szabad aminosav. Az emelkedett szint által fontos szerepet tölt be a humán szervezet lebontási folyamataiban. Ezen túlmenően, égési sérülések esetén jelentős glutamin transzport figyelhető meg a véráramban is.

## 2.1. A kutatás során tanulmányozott peptidok élelmiszeripari felhasználása

A peptidok élelmiszeripari alkalmazásait tekintve megállapítható, hogy a jelenlegi ismeretek korlátozottak a fellelhető szakirodalomban. A fejezetben ismertetésre kerülő tanulmányok a fehérjék és peptidok eltérő analitikai módszerek szerint történő mennyiségi meghatározását közlik élelmiszeripari nyersanyagokban, azonban a közlemények általában egyetlen peptid, vagy az azt felépítő aminosavak, vagy biogén aminok meghatározására fókuszálnak (JÁMBOR és MOLNÁR-PERL 2009). Élelmiszeripari adalékanyagként, táplálék kiegészítőként történő alkalmazásukat tekintve a kutatások az általam választott peptidok tekintetében nem jelentősek, vagy csak egy-egy peptid közvetlen táplálékként történő bevitelét taglalják, az élelmiszeripari technológiákat és azok lehetséges hatásait figyelmen kívül hagyva.

Az aszpartám használata széles körben elterjedt az élelmiszeriparban, mint mesterséges édesítőszer. Számos élelmiszerben megtalálható, például gabonapelyhek, szénsavas üdítőitalok és gyümölcslevek, tejtermékek és fagyasztott desszertek, legáltalánosabban azonban kalóriacsökkentett, diétás élelmiszerekben használják az alacsony kalória tartalma miatt (HOUTMAN 2010, BLACK *et al.* 1991). Meg kell említeni, hogy az aszpartám élettani hatásaival kapcsolatban számos tanulmány került közlésre, azonban közel azonos számban születtek tanulmányok az aszpartám semleges, vagy pozitív hatásait előtérbe helyezve (CHOUDHARY *et al.* 2016), mint az egészségre káros hatásokat taglalva (MARINOVICH *et al.* 2013).

A glutamin étrend-kiegészítőként történő használata elterjedt a klinikum és az élsportolók számára készített táplálék-kiegészítő készítményekben (MOREIRA *et al.* 2007). A szervezet glutamin koncentrációjának növelésére egy megfelelő alternatíva az L-alanin-L-glutamin formában történő bevitel, mely stabilabb formát eredményez az aminosavhoz képest. A glutamin koncentráció növelését L-alanin-L-glutamin dipeptid non-invazív módon történő bejuttatásával vizsgálták patkánykísérletek során, melyben megállapították, hogy a plazma és a kötőszövetek glutamin tartalma jelentősen változott erőteljes testmozgást követően (ROGERO *et al.* 2006.). Az Ala-gln dipeptid a parenterális táplálkozás területén ígéretes és hatékonynak tűnő formája a glutamin aminosav bevitelének. Mac Burney és munkatársai (1994) közleményében a glutamin bevitel módszereit és hatékonyságát elemezte, melyben az FDA engedélyezés lehetőségeit és kereskedelmi gyakorlat bevezetését is vizsgálta csontvelő-transzplantáción átesett betegek kezelése során.

Az L-karnozin a biokémiai folyamatok egyik fontos résztvevője az élő szervezetben. A szervezetbe élelmiszerek elfogyasztásával jut, vagy belsőleg szintézis útján képződik alanin és hisztidin aminosavak kapcsolódásával a karnozináz enzim hatására. Cornet és Bousset (1999)

tanulmányukban meghatározták, hogy a karnozin a fehér típusú izomrostokban van jelen nagyobb mennyiségben, mégpedig azon területeken, ahol a tejsavtermelődés és felhalmozódás jelentősebb mértékű. A karnozin izomszövetekben lévő mennyiségét több tanulmányban is közölték (CARNEGIE *et al.* 1983, DUNNETT *et al.* 1997), melyekben megállapították, hogy a karnozin legnagyobb mennyiségben a szövetek sejt közötti állományában van jelen, mennyisége azonban eltérő az izomszövet állapotának és terheltségének függvényében. Kantha és munkatársai (2000) konzerv levesekben vizsgálták a karnozin ( $\beta$ -Ala-His) mennyiségét és megállapították, hogy a vizsgált minták csak kis részében mutatható ki a karnozin kioldódása a húsból a leves vizes fázisába, azonban a marhahús konzervek nagyobb mennyiségben tartalmaznak karnozint a halkonzervekhez képest.

Wierzbicka és munkatársai (1989) kutatásokat folytattak a glutation mennyiségére vonatkozóan különböző élelmiszerekben. Megállapításaik szerint a friss gyümölcs- és zöldségfélék 40-150 mg/kg és nyers húsok 50-200 mg/kg koncentrációban tartalmaznak glutationt, míg tejtermékek és cereáliák esetén alacsonyabb szintet állapítottak meg. A vizsgálatok során az is megállapítást nyert, hogy a hőkezelés csökkenti a glutation mennyiségét az élelmiszerekben. A glutation felszívódásának mértéke nem ismert, így különösen fontos a változatos étrend biztosítása a kellő mértékű glutation bevitelére. A glutation mennyiségének meghatározását végezték más tanulmányokban is (SAETRE és RABENSTEIN 1978, MARTENSSON és MEISTER 1989), melyekben azonos eredményre jutottak Wierzbicka közleményében megállapítottakkal, miszerint az emlősök izomszövetei, a friss zöldségek és gyümölcsök tartalmaznak glutationt a legnagyobb mennyiségben, így ezen élelmiszerek fogyasztása hozzájárulhat a glutation mennyiségének növekedéséhez az emberi szervezetben.

A  $\gamma$ -glutamil dipeptidek - köztük a  $\gamma$ -glutamil-cisztein - diétás ízfokozó vegyületek közé sorolhatók, melyeket különböző forrásokból izoláltak. Általában növényekben található jelentős mennyiségben (főként hagymafélék) a tiol csoportot tartalmazó peptidek. Emellett Dunkel és munkatársai (2007) étkezési babban (*Phaseolus vulgaris L.*) mutatták ki a célvegyületet, míg Nishiuchi és munkatársai (2013) háztartási élesztőben vizsgálták a  $\gamma$ -glutamil-cisztein mennyiségét. A kutatómunka során a mennyiségi meghatározás mellett megállapították, hogy a  $\gamma$ -glutamil-dipeptidek az úgynevezett „kokumi” ízérzet kialakításáért is felelősek főként sós élelmiszerek esetén. A  $\gamma$ -glutamil-S-vinil-cisztein (GEC) vegyület jelenlétét fogaslevelű bükköny (*Vicia narbonensis L.*) növény magjaiban HPLC módszerrel határozták meg és megállapították, hogy a magok jelentős mennyiségben tartalmaznak  $\gamma$ -glutamil-S-vinil-ciszteint egyéb növényi részek, vagy más növényfajok mennyiségéhez képest (SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.* 2011).

## 2.2. A kutatott peptidek antioxidáns tulajdonságai

A kutatómunka során tanulmányozott peptidek antioxidáns tulajdonságaival kapcsolatban több publikáció is megjelent. Az aszpartám antioxidáns hatású tulajdonságait tekintve megállapítható, hogy a szervezet antioxidáns folyamatait befolyásolja. A tanulmányok legtöbbször a hosszú időn át tartó bevitt tartja hátrányosnak, ezáltal ugyanis a szervezet méregtelenítési folyamatait jelentősen megterheli, az antioxidáns folyamatokra negatív hatással van. Abhilash és munkatársai (2011) állatkísérletekkel igazolták, hogy a rendszeres aszpartám bevétel hepatocelluláris károsodást és a májsejtek elváltozását okozza, mely a méregtelenítési folyamatokat hátrányosan érinti. Bár egyre több információ jelenik meg az aszpartám okozta toxikus folyamatok és a negatív antioxidáns hatás tekintetében (CHRISTIAN *et al.* 2004, SIMINTZI *et al.* 2007), mindegyikben a hosszú távú szájon történő bekerülést veszi alapul a károsító hatások kiváltása szempontjából, a bevitt időtartama és a bevitt dózis azonban egyértelműen nem meghatározott.

A glutamin a jelentős antioxidáns tulajdonsággal bíró glutation legfőbb prekursora, melynek szintézise a májban történik. Magyar kutatók célzott állatkísérleteket folytattak az alanil-glutamin antioxidáns és véráramlási tulajdonságokat befolyásoló hatásának igazolására. A kutatás során megállapították, hogy a glutamin önmagában nem rendelkezik antioxidáns tulajdonságokkal, ugyanakkor a preoperatív időszakban kezelt májbetegség esetén az adagolás hatásos lehet, főként a glutamin alaninnal alkotott dipeptid formájában történő bevitel során. A pontos hatásmechanizmus még nem ismert, azonban a sejtek antioxidáns kapacitásának növekedése megállapítható az oxigén szabadgyökök képződésének csökkentésével (SZIJARTO *et al.* 2007).

A glutation a kis molekulatömegű intracelluláris tiol vegyületek egyik legjelentősebb képviselője. Köszönhetően a redukáló és nukleofil tulajdonságainak, a Gsh redox pufferként működik, megakadályozva az oxidatív károsodásokat. Jelentős mediátor szerepet tölt be a gazdaszervezetben az antioxidáns folyamatok során, mivel kiemelkedő gyökfogó képességgel bír (HEYLAND *et al.* 2005). A glutation endogén szintézis folyamata jelenleg nem egyértelmű, több tanulmány is külső bejuttatási formát javasol, főként műtéteken átesett betegek táplálása során. Jonas és munkatársai (2000) a vérplazma antioxidáns állapotának változásait figyelték meg csontvelő átültetésen átesett betegek esetén parenterális táplálkozás által bejuttatott antioxidáns tulajdonságú vegyületek (glutation, C-vitamin, E-vitamin) hatására. A kutatás alapján megállapítást nyert, hogy a transzplantációt követően az antioxidáns típusú vegyületek (pl. glutation) szintje csökken, azonban parenterális táplálás során bejuttatott anyagok

hasznosulása hatékonyabb, mint normál táplálási forma esetén. Goeters és munkatársai (2002) is azonos megállapításra jutottak, miszerint az intenzív osztályokon kezelt betegek számára emelt mennyiségű intravénás glutation bejuttatás igazolhatóan csökkenti a halálozás mértékét az antioxidáns tulajdonságú vegyületek kellő mennyiségének biztosításának hatására.

A lentebb ismertetésre kerülő tanulmányok kimutatták, hogy a karnozin és egyéb, hisztidin tartalmú molekulák antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek az emberi szervezetben. Ezek a hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidek különösen hatékonyak az idegsejtek károsodásának megelőzésében és a neuronok oxidatív stressz által okozott károsodásokkal szembeni védelmében. A karnozin ezen védelmi funkciója megerősíti azt a tényt, hogy a karnozin és homokarnozin a központi idegrendszerben és az izomszövetekben található meg magas koncentrációban a humán szervezetben. A karnozin antioxidáns tulajdonságait vizsgálva igazolták, hogy nyers hús és főtt hústermékek gamma-sugárzással történő csírámentesítése során, karnozin hozzáadás hatására a hús- és hústermékek oxidatív stabilitása emelkedett (BADR 2007). A karnozin lipid-oxidációt gátló hatását igazolta Decker és Crum (1993), mely eredményeként megállapítható, hogy a tartósításra használt só általi lipid oxidáció csökkenése volt tapasztalható főtt húsok és húspogácsák esetén. Hisztidin tartalmú vegyületek (karnozin, anzerin, homokarnozin, pentozidin és thiobarbitursav) mennyiségi meghatározását végezte Peiretti és munkatársai (2011), mely alapján megállapítható, hogy a vizsgált vegyületek minden állatfajban jelen voltak a vizsgált mintákban, azonban mennyiségük fajoként eltérő. A hisztidin tartalmú vegyületek általános antioxidáns hatása is beigazolódott, miszerint a lipid oxidáció csökkent, azonban a csökkenés mértéke eltérő állatfajonként. A karnozin antioxidáns tulajdonságait Boissonneault és munkatársai (1998) szintén igazolták, akik rávilágítottak arra, hogy a szervezet szabadgyök fogó képességének emelésében a karnozin, mint kelátképző vegyület jelenik meg, mely által jelentős mértékben csökkenthető a rákos megbetegedések kialakulásának kockázata emlősök esetén.



### 2.3. A kutatott peptidek stabilitási viszonyai

A kutatás során meghatározott peptidek stabilitását illetően tanulmányok igazolták, hogy stabilitásuk és bomlási viszonyaik jelentős mértékben eltérnek egymástól.

Az aszpartám a humán emésztőrendszerbe kerülve három fő komponensre és azok metabolitjaira bomlik. Legfőbb bomlástermék a fenilalanin (kb. 50%), mely a szervezetben káros folyamatokat indukálhat fenilketonúria betegségben szenvedőknél. A másik fő bomlástermék az aszparaginsav (kb. 40%), mely gerincesek központi idegrendszerében neurotranszmitterként funkcionál. Az aszpartám szervezeten belüli bomlásának harmadik terméke a metanol (kb. 10%), mely a szervezetben az alkohol dehidrogenáz enzim hatására formaldehiddé alakul, mely erős sejtméreg. Az aszpartám degradációs tulajdonságait vizsgálva Boehm és Bada (1984), valamint Sun és munkatársai (2014) megállapították, hogy az aszpartám a fent említett három főbb alkotóra és az azokból származtatható egyéb bomlástermékekre bomlik. A bomlás fokozódik a hőmérséklet emelésével (hőkezelt ételek és italok) és a szállítás során környezeti hatásoknak (főként napfény) kitett élelmiszerekben.

Az aszpartám stabilitási viszonyait tanulmányozva megállapították, hogy átlagos környezeti kondíciók mellett kis stabilitással rendelkezik. Vizes közegben a kémhatást pH=4,3 értékre állítva elérhető, hogy az aszpartám molekula degradációja csekély mértékűre csökkenjen néhány napon át történő tárolás alatt. Az aszpartám használata főként a hőkezelésmentes élelmiszeripari eljárásokra korlátozódik, mivel emelt hőmérsékleten a stabilitása csökken és a keletkező bomlástermékei már nem rendelkeznek édesítő hatással. A kutatás során felhívták a figyelmet, hogy az aszpartám- mint széles körben alkalmazott élelmiszeradalék- bomlástermékeinek (főként fenilalanin) rendszeres vizsgálata indokolt élelmiszeripari szennyvizekben, ugyanis a bomlástermékek stabilitása jóval meghaladja a kiindulási vegyület stabilitását (BERSSET és OCHSENBEIN, 2012). Az aszpartám környezeti paraméterek hatására bekövetkező stabilitási viszonyait kutatta Prankerd és munkatársai (1992). A stabilitást befolyásoló tényezőket széles spektrumban alkalmazták (pH=2,0-4,0; ionerősség=0,05-0,50 M koncentrációjú sóoldatok; hőmérséklet=4-50 °C) és megállapították, hogy az aszpartám stabilitása nem számottevő, bomlástermékei és főként azok aránya változik a hőmérséklet és a koncentráció függvényében. Bár a hőmérséklet emelkedése jelentős mértékben hozzájárul az aszpartám bomlásához, a pH és a reaktív oldott anyagok is befolyásolják a stabilitást. Az aszpartám stabilitásának biztosítása pH=3-5 között az optimális, túlzottan savas vagy bázikus körülmények között a stabilitás csökken. A tartósítás során gyakran alkalmazott puffer-sók katalizálják az aszpartám lebomlását, a bomlás mértéke nagyobb magasabb puffer koncentráció alkalmazásakor (TSOUBELI és

LABUZA, 1991, BELL és WETZEL, 1995). Hasonlóképpen, emelt hőmérsékleten végzett vizsgálatok során megállapították, hogy az aszpartám redukáló cukrokkal is reakcióba lép, mely során a Maillard-reakció játszódik le. Ebben az alacsony, vagy közepes nedvességtartalmú élelmiszerek (lisztek) érintettek főként, ugyanis az aszpartám lebomlása intenzívebbé válik a vízaktivitás növekedése (tésztakészítés) során. Összességében megállapítható, hogy az aszpartám bomlás legintenzívebben a huzamosabb ideig történő hevítés, a vízaktivitás jelentős növekedése és  $\text{pH} > 6$  értékek esetén figyelhető meg, mely paraméterek a sütőipar gyártástechnológiája során gyakran együtt fordulnak elő. Mindezek tudatában ahhoz, hogy az aszpartámot édesítő szerként a sütőiparban is alkalmazni lehessen és hatását kifejthesse, meg kell védeni a károsító hatású tényezőktől (például savas kémhatású víz, puffer sók) és környezeti stressztől (magas hőmérséklet), amelyek fokozzák bomlását (PECK 1994). Mivel az aszpartám alkalmazása jelenleg is széleskörű alacsony energia tartalma és az alacsony előállítási költségek miatt, a kutatások során célul tűzték ki a molekula stabilitásának növelését. NutraSweet Custom névvel kerül forgalomba kapszulázott aszpartám (NutraSweet Corporation, Mt. Prospect, IL.), melyet az Amerikai Egyesült Államokban engedélyeztek sütőipari alkalmazásra, hogy javítsák a vegyület termikus stabilitását. A kapszulázott aszpartám sütés közbeni bomlási mechanizmusát kutatta Wetzsel és Bell (1998), mely során megállapították, hogy a védőbevonattal ellátott vegyület mennyisége a sütést követően a kontroll termékben megtalálható 22%-ról 33%-ra emelkedett. Ugyancsak emelni tudták a stabilitást (58%), amennyiben savképző készítményt (gluconodelta lacton-GDL) adagoltak tésztahoz sütést megelőzően.

Az alanil-glutamin stabilitását illetően megállapítható, hogy a glutamin stabilitása eltérő különböző élelmiszerekben, főként az élelmiszer-mátrixokra általában jellemző savas kémhatású közegben, ráadásul a glutamin vízben gyengén oldódik (FÜRST és KUHN, 2000; HOLEČEK *et al.* 2000). Az oldékonysági problémák kiküszöbölése és a kismértékű stabilitás erősítése érdekében a glutamin alaninnal alkotott dipeptid (L-alanil-L-glutamin) előállítását végezték rekombináns *E. coli K12* fermentációjával. A szintetizált dipeptid kristályos, fehér por, mely vízben jól oldódik (568 g/l), hőközlés és savas körülmények hatására a bomlás mértéke nem jelentős (YAGASAKI *et al.* 2005). Az L-alanil-glutamin és másik négy glutamin tartalmú dipeptid (glicin-L-glutamin (Gly-Gln), L-valin-L-glutamin (Val-Gln), L-leucin-L-glutamin (Leu-Gln) és L-izoleucin-L-glutamin (Ile-Gln)) stabilitási viszonyait és a lebomlás kinetikáját Arii és munkatársai (1998) folyadékkromatográfiás módszerrel határozták meg. A kutatás során megállapították, hogy az Ala-gln bomlásának két útját lehet meghatározni, az egyik útvonal a peptid kötés hasadása, a másik lehetséges mód az amid csoport deaminálódása. A molekula stabilitásának biztosítására a közeg kémhatásának optimumát  $\text{pH} = 6$  értéknél állapították meg.

Természetes vizekben a glutation stabilitását és fotokémiai hatásokat előtérbe helyezve megállapítható, hogy az édesvizekben hosszabb a lebomlási folyamat, mint sós vizekben, ugyanis a magas klorid-ion tartalom katalizálja a glutation fotooxidációs folyamatait. A glutation fémekkel történő stabilizálása során megállapítást nyert, hogy a Cu(II) és Hg(II) hozzáadása komplex képződés által stabilizálja a glutation molekulát, azonban az UV-sugárzás hatásának gátlására a réz-komplex kevésbé hatékony, a legstabilabb forma a higannyal alkotott komplex (MOINGT *et al.* 2010). Garcia-Fuentes és munkatársai (2006) a glutation stabilitási viszonyainak feltárását  $\alpha$ -ciklodextrin hozzáadásával történő komplexképzéssel végezték. A kutatás célja a glutation táplálékként történő beviteli lehetőségeinek feltárása volt. A vizsgálatok során egy olyan glutation komplex formula kialakítását végezték el, mely ellenáll a tápcsatornában található emésztőnedveknek, a glutation felszívódása a tápcsatorna megfelelő szakaszában mehet végbe és a peptid nagyobb mennyiségű felszívódásából adódó hatékonysága megnövekedik a tápcsatornában meglévő bomlási folyamatok kiküszöbölésével. A glutation védőhatásának vizsgálatát Dziurla és munkatársai (2004) végezték, melyben szennyvíz mennyiségének csökkentésére alkalmazott termikus, elektronikus, mechanikai vagy oxidatív stressz hatású kezelések által okozott mikróbák pusztulásának csökkentését tűzték ki célul. A glutationt, mint védő hatású vegyület alkalmazták és megállapították, hogy különböző stressz tényezők (termikus, mechanikai és oxidatív stressz) esetén is csökkenteni tudták a keletkező szennyvíziszap mennyiségét, mely jelentős eredmény a keletkező veszélyes hulladék mennyiségének csökkentése szempontjából.

A  $\gamma$ -glutamil peptidekkel kapcsolatos kutatások és fiziológiai hatásának feltárása számos tanulmányban megtalálható, azonban a célzottan a  $\gamma$ -glutamil dipeptidek stabilitására vonatkozó vizsgálatok kis számban kerültek közlésre. A kisszámú közlemény valószínűen a  $\gamma$ -glutamil vegyületek alapvetően gyenge stabilitási tulajdonságának köszönhető, mely külső forrásként történő bejuttatásának lehetőségét jelentősen lecsökkenti orvosbiológiai és élelmiszertudományi területen egyaránt. A  $\gamma$ -glutamil-cisztein mennyiségének tárolás alatt bekövetkező változását és a metabolizmus mértékét tanulmányozta vöröshagyma gumókban Lancaster és Shaw (1991). A kutatás során megállapították, hogy a  $\gamma$ -Glu-Cis mennyisége csak kis mértékben változik a tárolás alatt, azonban a csírázási időszakban a  $\gamma$ -glutamil peptidek mennyisége változik, azaz a tárolás során fontos szerepet töltenek be ezen vegyületek növényi részek nyugvó fázisának megtartásában. Tengeri mikroalgákban található  $\gamma$ -glutamil peptidek kadmium megkötő képességének tanulmányozása során megállapították, hogy a  $\gamma$ -glutamil peptidek alkalmazása fontos tényező a kadmium megkötésében, mellyel csökkenthető a tengervizek kadmium tartalma (MORELLI *et al.* 2002).

## 2.4. A kutatott peptidek kromatográfiás meghatározásának lehetőségei

Kutatómunkám során öt peptid folyadékkromatográfiás meghatározását végeztem egy olyan módszer kidolgozását tűzve ki célul, mellyel a vizsgált kis molekula tömegű peptidek élelmiszer mintákból kellő biztonsággal meghatározhatók. A kis molekulatömegű peptidek meghatározási lehetőségeit tárgyaló tanulmányok meglehetősen sokrétű módszereket említenek, melyek legtöbbször kromatográfiás eljárásokat használnak. A gyakorlatban legelterjedtebb meghatározási módszer elektroforézisen és kromatográfiás elválasztási módszereken alapul (CUI *et al.* 1995), melyek kombinálhatók tömegspektrometriás, többszörösen kapcsolt tömegspektrometriás, vagy méretkizárásos detektálási módszerekkel, bár az 1970-es évektől radioimmunológiai módszerek (HEDING 1975) segítségével  $\mu\text{g/kg}$  mennyiségek meghatározására is lehetőség nyílt. A kétdimenziós gélelektroforetikus meghatározás során alapvetően nem a kis molekulás tömegű peptidek meghatározása történik, hanem a fehérjéket hidrolizálják el alacsony aminosav számmal rendelkező egységekre. A kétdimenziós szeparáció során az első dimenzióban az izoelektromos pont alapján, majd a második dimenzióban molekulatömeg alapján történik az elválasztás. A fehérjék enzimatis úton történő bontása során a fehérjéket felépítő peptideket kapunk, melyek folyadékkromatográfiás módszerrel, vagy kapillár-elektroforetikus módszerrel elválaszthatók, detektálásuk modern tömegspektrometriás módszerekkel történhet.

A folyadékkromatográfiás eljárások között a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) az egyik legelterjedtebb elválasztási módszer, melyben a meghatározni kívánt komponens tartalmú mozgó fázist nagy nyomás alatt áramoltatják át az álló fázis kis szemcseméretű részecskéin, ahol megtörténik az elválasztás. Az alkalmazott mozgó- és álló fázis minősége alapvetően meghatározza a kromatográfiás körülményeket, ezáltal az elválasztás hatékonyságát. A HPLC készülékek alkalmazása esetén néhány 100 bar megengedett maximális nyomásérték, az UPLC berendezésekben a nyomás elérheti a 1500 bar körüli szintet is. A kromatográfiás elválasztás során a peptidek detektálása tömegspektrometriás módszerekkel történhet, a tömegspektrometriás detektálási módszerek több változata is használatos. A leggyakrabban alkalmazott fehérje detektálási mód, szekvencia meghatározás alapján a nagy érzékenységű elektropray (ESI) (WANG *et al.* 2016.) és mátrixhoz kötött lézer ionizáció repülési idő tömegspektrométer (MALDI-TOF) (WANG *et al.* 2014), melyeket „peptide mass mapping” és tandem rendszerben kötött tömegdetektorok (MS/MS) (HIRAYAMA *et al.* 2014.) szekvenálási módszerekkel kombinálnak.

A peptidek detektálása és kvantitatív meghatározása jelentős kihívást jelent, ugyanis a szekvenciában az egymáshoz kapcsolódó aminosavak különböző tulajdonságaiból származóan a

létrejövő peptidek tulajdonságaiban is jelentős különbségek jelentkezhetnek. Ennek tudható be, hogy nem létezik olyan egyetlen kromatográfiai módszer, amely általánosan alkalmazható peptidek elválasztására és biztonságos meghatározására. A meghatározást nehezítheti az egyes szekvencia elemek (cisztein) jelenléte esetén kimutatható instabilitás is. Az elválasztás problémáin túl nehézségek jelentkeznek a detektálás során is, mivel sok esetben a peptid lánc nem tartalmaz kromofor csoportokat, így a széleskörűen alkalmazott UV/VIS detektorral történő meghatározási mód nem szolgáltat megbízható és kvantitatív értékelésre alkalmas eredményeket. A biztonságos spektrofotometriás detektáláshoz ezért származékképzésre van szükség, amely a molekulába kromofor csoportot visz be, ezáltal csökkentve a kimutatási határt és növelve a detektálás érzékenységét. A danzil-klorid általánosan alkalmazott származékképző vegyület, mellyel aminosavak kvalitatív és kvantitatív meghatározása végezhető. Analitikai vizsgálatok során származékképzett aminosavak tanulmányozását végezték danzil-kloriddal történt származékképzést követően, vékonyréteg kromatográfiai módszereket alkalmazva. A folyadékkromatográfia terjedésével danzil-klorid származékképzőt, az aminosavak HPLC módszer szerinti meghatározása során is alkalmaztak normál, vagy fordított fázisú kromatográfiai eljárásokat. Tapuhi és munkatársai (1981) közleményükben megállapították, hogy a danzil-klorid az aminosavak származékképző vegyületeként alkalmas kromatográfiai vizsgálatok számára, emellett az aminosavak danzil-származékainak eltérésére is rámutattak, miszerint bizonyos aminosavak nem azonos mennyiségű danzil csoportot kötnek meg a származékképzés során. A danzil-klorid származékképzőként történő alkalmazása napjainkban is elterjedt aminosavak és biogén aminok kromatográfiai meghatározására, melyet Tuberoso és munkatársai (2015) is igazoltak közleményükben. Az általuk elvégzett kutatásban borok aminosav és biogén amin tartalmát HPLC módszer szerint határozták meg danzil-kloriddal történő származékképzés után, fluoreszcens detektálást alkalmazva.

Folyadékkromatográfiai módszerrel történő meghatározást végzett Kőrös és munkatársai (2007), melyben orto-ftálaldehiddel történő származékképzést követően aminosavak és biogén aminok mennyiségi meghatározására fejlesztettek módszert fluoreszcens detektálás mellett.

A felsorolt vizsgálati módszerek és kutatások jelentősége az aminosavak kromatográfiai meghatározásán alapul, azonban a peptidek, főként 2-3 aminosav kapcsolódásával létrejövő kis molekula tömegű peptidek analitikai meghatározása a fentiekben közölt kromatográfiai módszerekkel nem kellően kutatott.

Munkám során az aminosavak és a biogén aminok meghatározására kifejlesztett módszer továbbfejlesztését végeztem el, a kis molekula tömegű peptidek folyadékkromatográfiai meghatározását célul tűzve.

### 3. CÉLKITŰZÉS

A kutatás során öt kis molekula tömegű peptid tulajdonságainak megállapítását, megbízható és érzékeny kromatográfiás meghatározási eljárás körülményeinek kidolgozását, a kiválasztott vegyületek stabilitási problémáinak kiküszöbölését és az élelmiszermátrixban végbemenő hatások és keresztreakciók feltárását szándékoztam elvégezni.

A meghatározások kezdetén néhány jelentős peptid típusú vegyület (aszpartám, L-karnozin, L-glutation, alanil-glutamin és  $\gamma$ -glutamil-cisztein) folyadékkromatográfiás (HPLC) meghatározását, illetve a meghatározáshoz szükséges megbízható HPLC módszer fejlesztését tűztem ki célul. A vegyületek azonosítását és mennyiségi meghatározását követően élelmiszeripari alkalmazhatóságukra vonatkozó kísérletek elvégzését tűztem ki célul.

Fontos célkitűzés a kiválasztott peptidek stabilitásának meghatározása, megbízható, reprodukálható kromatográfiás módszer kifejlesztése, amely tartalmazza a származékképzést és esetleges komplexképzési folyamatok kialakulását és azok hatását a peptid stabilitásra.

A fentieken túl az alábbi kvantitatív módszerek alkalmazását terveztem a vizsgálatok során:

- A vizsgált vegyületek folyadék kromatográfiás módszer szerinti meghatározása.
- A kéntartalmú természetes peptidek stabilitási viszonyainak vizsgálata, esetleges stabilitási problémák kiküszöbölése védőcsoportok alkalmazásával (származékképzéssel), illetve fémkomplexek képzésével.
- Környezeti tényezők hatása a vizsgált komponensek mennyiségére (a környezet hőmérsékletének hatása, adalékanyagok, fermentációs körülmények).
- A kiválasztott peptidek antioxidáns hatásának vizsgálata FRAP módszerrel.
- A lehetséges élelmiszermátrixok és eltérő élelmiszerkomponensek peptid-stabilitásra gyakorolt hatásának feltárása.
- A szükséges védőcsoportokkal ellátott peptidek élelmiszeripari alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Spektrofotometria, a peptidok maximális abszorbancia hullámhosszának meghatározása

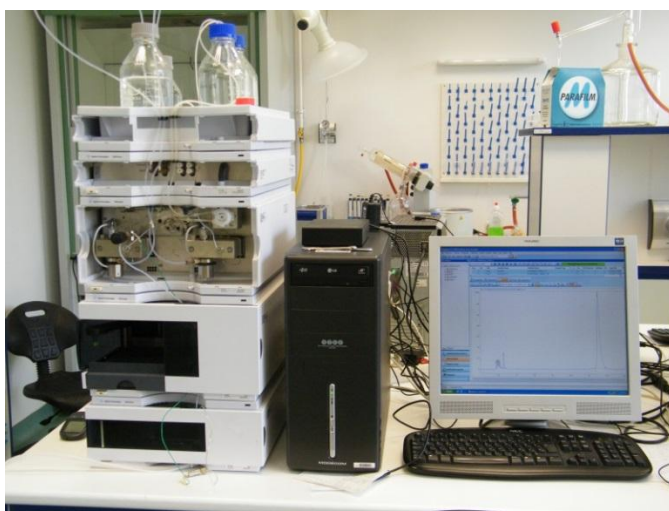
A modell vegyületekből standard oldatot készítettem 200 mg/l (aszpartám, alanil-glutamin) és 210 mg/l (L-karnozin, L-glutation és  $\gamma$ -glutamil-cisztein) koncentrációban. Az oldatokhoz felhasznált standard peptid vegyületek (Sigma-Aldrich) feloldását ultra tiszta desztillált vízben (Elga Purelab Classic) hajtottam végre. A fotometriás meghatározást Jasco V-650 spektrofotométer készüléken végeztem. A vegyületek UV-aktivitását 190-400 nm hullámhossz tartományban vizsgáltam, meghatározva a maximális elnyelési hullámhossz értéket. Az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a vizsgált peptidok UV/VIS hullámhossz tartományban kismértékű elnyeléssel rendelkeznek.



**6. ábra** a peptidok maximális abszorbancia hullámhosszának meghatározására használt Jasco V-650 spektrofotométer  
(forrás: saját készítésű fotó)

## 4.2. Diódasoros (DAD) detektálási módszerek kis molekulatömegű peptidok kromatográfiás meghatározásánál

Az UV/VIS vizsgálatokat követően a szabad peptidok meghatározását folyadék kromatográfiás módszerrel végeztem el. A vizsgálati mintákat peptidok standard vegyületeiből készítettem az UV/VIS vizsgálatok (4.1.) alapján leírtak szerint. A HPLC vizsgálatokat Agilent 1200 plus HPLC készülékkel végeztem inverz fázisú oszlop (Agilent Eclipse plus 250x4,6 RP18, 5  $\mu\text{m}$ ) alkalmazása mellett. A meghatározást gradiens elúció szerint hajtottam végre LIMA *et al.* (2006) közleményében meghatározott paramétereket alkalmazva. A módszer alapja 60 perces gradiens elúció, acetonitril (90%) TFA vizes oldatban=B (Sigma-Aldrich) és trifluor ecetsav vizes oldata (0,01% V/V)=A (Sigma-Aldrich) eluensek alkalmazásával. Áramlási sebesség 1 ml/min, detektálás 200 nm. A vizsgálatok során a meghatározás a közleményben alkalmazott azonos paraméterek alkalmazása mellett nem volt reprodukálható, így a mérési paraméterek módosítására volt szükség. A módszer paramétereit változtatva jelentős javulás érhető el, azonban a 11. ábrán bemutatott kromatogram alapján kvalitatív vizsgálatok számára nem volt megfelelő. A HPLC diódasoros detektálás (DAD) során a 195 nm és 210 nm hullámhosszakot választottam a meghatározáshoz, legmegfelelőbbnek 195 nm bizonyult. A referencia hullámhossz minden esetben 750 nm volt, ezen a hullámhosszon egyetlen spektrumban sem tapasztaltam elnyelést a vizsgált minták esetén. Az elválasztás során alkalmazott eluensek: 0,01 % trifluor ecetsav (TFA) tartalmú víz (A) és acetonitril (B) elegye gradiens elúcióval, 0 min. (5% B), 21 min. (21% B), 50 min. (66% B), 55 min. (88% B), 60 min. (100% B), 65 min. (5% B). A vizsgálatok során alkalmazott áramlási sebesség 0,3 ml/min.



7. ábra a kis molekula tömegű peptidok kromatográfiás meghatározása során alkalmazott Agilent 1200 plus HPLC készülék (forrás: saját készítésű fotó)



### 4.3. Fényszóráson alapuló (ELS) detektálási módszerek kis molekulatömegű peptidek közvetlen kromatográfiás meghatározására

A kutatott kis molekula tömegű peptidek gyenge UV/VIS aktivitás miatt az elvégzett kísérletek során diódasoros detektálással párhuzamosan ELS detektálást is alkalmaztam. A vizsgálatokat PL-ELS 2100 (USA) detektor alkalmazásával hajtottam végre. A vizsgálat során a ködképzés 120 °C hőmérsékleten, a párologtatás 90 °C hőmérsékleten került végrehajtásra, a nitrogéngáz áramlási sebessége 1,6 l/min volt. Az öt dipeptid eltérő kémiai tulajdonságai miatt az egy módszer szerinti elválasztás nehézségekbe ütközött, ezért a külön csoportokban történő meghatározások mellett döntöttem. A tiol csoportot tartalmazó peptidek gyenge stabilitásából adódóan az ELS detektálás során a szabad peptidek meghatározását tiol csoportot nem tartalmazó (alanil-glutamin, aszpartám és L-karnozin) dipeptideken végeztem el. A HPLC vizsgálatokat Shimadzu HPLC készülékkel végeztem inverz fázisú oszlop (Agilent Eclipse plus RP-C18 150\*3 mm, 3,5 µm) alkalmazása mellett. Eluensként 0,01% trifluor ecetsav (TFA) oldat (A) és acetonitril (B) elegyét alkalmaztam gradiens elúcióval, 0 min (100% B), 40 min (95% B) 50 min (100% B), 0,3 ml/min áramlási sebesség mellett.



**8. ábra** a kutatott peptidek kromatográfiás meghatározása során alkalmazott Shimadzu LC-2010 HPLC rendszer és PL-ELS 2100 detektor kapcsolt rendszerben

(forrás: saját készítésű fotó)

#### 4.4. Komplexképző fémek alkalmazása a peptid stabilitás növelése érdekében

A kromatográfiai vizsgálatok során megállapítást nyert, hogy a tiol csoportot tartalmazó szabad peptidek meghatározási eljárása nem vezet reprodukálható eredményre, ezért peptid-fém komplexek alkalmazásával hajtottam végre a kromatográfiai meghatározást. Az L-glutation és  $\gamma$ -glutamil-cisztein folyadékkromatográfiai (HPLC) elválasztásához a mintákat fémionok ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) oldataival komplexáltam.

A vizsgálandó két peptidből 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettem és az elkészített törzsoldatok 1 ml térfogatú mintáját 0,5 ml  $\text{CdSO}_4$  (VWR),  $\text{ZnSO}_4$  (VWR),  $\text{CuSO}_4$  (VWR) és  $\text{AgNO}_3$  (VWR) oldattal (10 mg/0,5 ml; 0,2% TFA oldat) elegyítettem. Az így elkészített minták 10  $\mu\text{l}$  térfogatú mennyiségét injektáltam Agilent Eclipse plus RP-C18 (150\*3 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) oszlopra és 0,2% TFA oldatát használtam izokratikus kísérletben, 0,5 ml/min. áramlási sebesség mellett. A vizsgálatok során Shimadzu SPD-M20A UV/VIS diódasoros detektort alkalmaztam, a kapott kromatogramokat 203 nm hullámhosszon értékeltem. A molekulaszervezeti vizsgálatok elvégzésekor a fém-peptid komplexek azonosításához tömegdetektálást alkalmaztam atmoszférikus nyomáson történő kémiai ionizáció (APCI) pozitív ionizációs módban. A tömegspektrum felvételekor az 50-2000 m/z tartomány került szkennelésre, 1,5 kV detektorfeszültség mellett. Az interfész hőmérsékletét 250 °C, a porlasztógáz áramlási sebességét 0,18 l/min mennyiségre, a fűtőblokk hőmérsékletét 200 °C értékre állítottam.

#### **4.5. A peptidek folyadék-kromatográfias meghatározása danzil-kloriddal történt származékképzést követően**

Az előkísérletek során bebizonyosodott, hogy a peptidek UV/VIS és ELS detektálási érzékenysége nem megfelelő, kvantitatív meghatározásra nem alkalmas, ezért a további meghatározási eljárások elvégzése vált szükségessé. A meghatározni szándékozott vegyületek danzil-kloriddal történő származékképzési eljárását végeztem el, mely által a peptidek UV tartományban való meghatározására nyílik lehetőség. A vízben oldott standard oldatok (alanil-glutamin, L-karnozin, aszpartám) 0,5 ml-ét 0,25 ml telített NaHCO<sub>3</sub> oldattal (VWR) elegyítettem és 0,5 ml danzil-kloriddal (Sigma-Aldrich) reagáltattam (20 mg/ml koncentrációban) 60 °C -on egy órán keresztül. A reakció lejátszódásához fénytől elzárt reakció körülményeket biztosítottam. A reakció végeztével a fölös danzil-kloridot 50 µl 25% ammónia oldattal (VWR) bontottam el és az oldathoz 0,5 ml acetonitrilt (VWR) adtam, majd az elegyet 5 percig 6000 rpm fordulaton centrifugáltam (Hettich EBA 21). Az oldatok felülúszóját 0,22 µm pórusátmérőjű membránszűrőn 1,5 ml térfogatú HPLC fiolába szűrtem és az így elkészített minták 10 µl-ét injektáltam Agilent Eclipse plus RP-C18 (150\*3 mm, 3,5 µm) oszlopra. Eluensként acetonitril (B) és 0,2% TFA (A) elegyét használtam az elúció során. A kromatográfias meghatározást Shimadzu LC-2010 készüléken végeztem diódasoros detektálás mellett. A kromatográfias vizsgálat során gradiens elúciós rendszert alkalmaztam a következők szerint: B= 0% (0 min.), B= 60% (18 min.), B= 60% (25 min.), B= 0% (30 min.) és B= 0% (40 min.). A detektálás 290 nm hullámhosszon történt, a tömegspektrometriás detektálást a 4.4. fejezetben ismertetett eljárás szerint hajtottam végre.

A módszerfejlesztést követően a kutatózott peptidek mennyiségi meghatározását végeztem el a három tiol csoportot nem tartalmazó peptid esetén. A mennyiségi meghatározás első lépéseként a vizsgált vegyületekből 10 mg/l koncentrációjú törzsoldatot készítettem, majd a törzsoldatból kalibrációs oldatokat készítettem a danzil-kloriddal való származékképzés eljárás szerint, a fentiekben ismertetett kromatográfias eljárásnak megfelelően. A standard vegyületekből 0,625 mg/l, 1,25 mg/l, 2,5 mg/l, 5,0 mg/l és 10,0 mg/l koncentrációjú kalibrációs oldatokat készítettem, majd a kromatogramokban jelentkező csúcsok terület alapú integrálját határoztam meg. A mennyiségi meghatározáshoz külső kalibrációt alkalmaztam, melyhez 5 pontból álló kalibrációs egyenest illesztettem a terület-koncentráció függvényben. A kromatogramok jel-zaj viszonyai alapján meghatároztam a módszer kimutatási határát.



**9. ábra** a kutatás során alkalmazott Shimadzu LC-2010 folyadékkromatográf LC/MS  
2010 detektorral kapcsolt rendszerben  
(forrás: saját készítésű fotó)

#### **4.6. Peptid vegyületek kromatográfiás meghatározása OPA származékképzést követően UV/VIS és fluoreszcens detektálás (RF) mellett**

A danzil-kloriddal történt származékképzés során a tiol csoportot nem tartalmazó peptidok kromatográfiás meghatározását megbízható és reprodukálható kromatográfiás módszer kidolgozásával hajtottam végre. A tiol csoportot tartalmazó peptid vegyületek fém-komplexek formában történő meghatározását egy külön módszer szerint ugyancsak sikerült elvégezni, tömegspektrometriás módszerrel a keletkező komplexeket azonosítottam, azonban a fém-komplexek képzésével a módszer érzékenységét nem sikerült az elvárt tartományban meghatározni. Ezek alapján a származékolt peptid vegyületek kromatográfiás meghatározásához Körös és munkatársai (2007) közleményében meghatározott eljárást vettem alapul, mely során DAD detektálást követően, kapcsolt rendszerben fluoreszcens detektálást (RF) is alkalmaztam.

A vizsgálatok során származékképzéssel fluoreszcens aktív komponenseket készítettem bázikus kémhatású OPA (ortoftálaldehid) tioetanolos oldatának (Sigma-Aldrich) felhasználásával. A meghatározni szándékozott vegyületekből 50 mg/l töménységű törzsoldatot készítettem. A peptid standard oldatokból 1,5 ml térfogatot 630 µl OPA (630 µl metanolos OPA-10 mg OPA/1 ml metanol- 2 ml borát puffer – 0,4 M  $\text{BNa}_3\text{O}_3^-$  + 52 µl etántiol és 15 µl Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl klorid; 0,17g/5 ml acetonitril) (Sigma-Aldrich) reagens oldattal reagáltattam, majd 0,22 µl pórusátmérőjű membránszűrőt alkalmazva (ProFill RC) szűrtem a kapott oldatokat. A származékképzett minták 10 µl mennyisége került injektálásra Agilent Eclipse plus RP-C18 (250\*4.6 mm), 5 µm oszlopra. Eluensként 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 5 mM  $\text{NaN}_3$  (A) és ACN/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ = 45/45/10 (B) oldatokat alkalmaztam. A meghatározás során gradiens elúciót alkalmaztam B= 2% (0 min.), B= 50% (30 min.), B= 50% (30 min.), B= 2% (35 min.) és B= 2% (40 min.), az eluens áramlási sebessége 0,1 ml/ min. volt. A kapott származékokat inverz fázisú Agilent Eclipse plus RP-C18 (150\*3 mm), 3 µm oszlopra injektáltam és diódasoros (DAD) (Shimadzu SPD-M20A) detektoron 336 nm hullámhosszon, majd fluoreszcens (Shimadzu RF 20A) detektoron 336 nm gerjesztés mellett 455 nm detektálással határoztam meg. A módszerfejlesztést követően a vizsgált peptidok mennyiségi meghatározását végeztem el, melynek első lépéseként a peptid vegyületekből kalibrációs oldatokat készítettem az OPA származékképzésnek megfelelően, a 4.6. pontban ismertetett minta előkészítési eljárás alapján. A standard vegyületekből vizes oldatokat készítettem 0,625 mg/l, 1,25 mg/l, 2,5 mg/l, 5,0 mg/l és 10,0 mg/l koncentrációban, majd a kromatogramokban jelentkező csúcsok terület alapú integrálját határoztam meg. A mennyiségi meghatározáshoz külső kalibrációt alkalmaztam, melyhez 5 pontból álló kalibrációs egyenest illesztettem a terület-koncentráció függvényben, majd meghatároztam módszer kimutatási határát.

## 4.7. Természetes peptidok stabilitásának meghatározása különböző környezeti hatások függvényében

A természetes peptidok élelmiszer adalékanyagként történő alkalmazását korábbiakban még nem vizsgálták behatóan. A kis molekula tömegű peptidok élelmiszer adalékanyagként történő alkalmazásához elengedhetetlen az érintett hatóanyagok stabilitásának körültekintő tanulmányozása és egyszerre több környezeti paraméter, adott komponens átalakulásra gyakorolt hatásának feltárása.

Kutatómunkám részeként élelmiszer adalékként alkalmazható természetes peptidok stabilitásának, eltarthatóságának, és különböző feldolgozási eljárásokkal szembeni érzékenységének vizsgálatait végeztem el különböző környezeti- és élelmiszer gyártástechnológiai paraméterek hatásának függvényében. Vizsgálataim során a korábban kromatográfias módszerfejlesztésnél kutatott peptidokat tanulmányoztam. A meghatározás során négy paraméter változásának a hatását mértem fel (pH, oxidatív hatás, fény hatása, hőmérséklet hatása) a peptid alapvegyületek mennyiségét vizsgálva. Az elvégzett vizsgálatok alapján kapott eredmények jelentősen befolyásolhatják a peptidok élelmiszer komponensként való alkalmazhatóságát és az alkalmazott technológiai körülmények optimalizálásának szükségességét egyes gyártási folyamatokban. Mivel a korábbiakban bebizonyosodott, hogy az eltérő szerkezettel és kémiai tulajdonságokkal bíró peptidok egy módszer szerinti kromatográfias meghatározása nem valósítható meg, ebből adódóan a két vegyületcsoport (tiol csoportot nem tartalmazó és tiol- tartalmú peptidok) bomlási folyamatait követően kvantitatív meghatározását egymástól független kísérletsorozatban kromatográfias eljárásokkal hajtottam végre. A kromatográfias mennyiségi vizsgálatok a kénmentes peptidok (aszpartám, alanil-glutamin, L-karnozin) esetében a danzil-kloriddal történő származékképzésen alapuló módszer szerint (4.4. fejezet), míg a tiol csoportot tartalmazó peptidok esetén (L-glutation és  $\gamma$ -glutamil-cisztein) az OPA származékképzést követő fluoreszcens detektálási módszerrel végeztem a 4.6. fejezetben közöltek szerint. A stabilitási vizsgálatokhoz a minta előkészítés és a választott környezeti paraméterek ellenben azonosak voltak, ebből következően a kísérlet körülményeit egy fejezetben ismertetem.

A munka ezen részében a peptidok standard oldatait vizsgáltam eltérő körülmények között, a fentebb említett négy paraméter változtatásával. A kvantitatív vizsgálatok során a mintákban megtalálható peptidok mennyiségének meghatározása háromszori ismétlésben történt. A mintákból 1000 mg/l koncentrációjú oldatokat készítettem a vizsgálatok elvégzéséhez. (25 mg/25 ml).

A vizsgálatokat az alábbi lehetséges környezeti és gyártástechnológia hatások szerint végeztem:

A közeg kémhatásának befolyásolását a peptid vegyületek foszfát pufferben történő oldásával modelleztem. Három eltérő kémhatású oldatsorozatot készítettem, melyből a savas tartományban beállított érték a jelentősebb savtartalommal bíró élelmiszerekre jellemző hatásokat, semleges tartományban a vizes oldatokban fellépő körülményeket, míg lúgos tartományban a lúgos kémhatású élelmiszerek, vagy romlási folyamatok során kialakuló körülményeket modelleztem (foszfát pufferek pH=4, pH=7, pH=10).

Az élelmiszerek, vagy alapanyagok jellemző kémhatása mellett fontos szempont az oxigén jelenléte, vagy hiánya. Az oxigén okozta hatások modellezése céljából a peptidek oldatait nyitott edényben tárolva (levegőn hagyva) és a levegőtől paraffin olajjal lezárt módon tárolva vizsgáltam a peptid vegyületek stabilitási tulajdonságait.

Az élelmiszerek tárolása során fontos környezeti tényező a sugárzások hatása, ennek leggyakoribb károsító tényezője a napsugárzásból eredő fény. A vizsgálatok során a peptid vegyületeket természetes fénynek kitéve és fénytől elzárt körülmények között tároltam.

A tárolás során fontos paraméterként tarjuk számon a tárolási hőmérsékletet. A hőmérséklet hatásának vizsgálataihoz három hőmérsékleti értéket (-18 °C; +4 °C; +30 °C) állítottam be, melyek közül két esetben a hőelvonásos folyamatokat modellezése történt, mely által a fagyasztva tárolás és a hűtve tárolás körülményeinek leképezését hajtottam végre. Egy hőmérsékleti paramétert extrém tárolási körülmények (hőelvonást nélkülöző paraméterek) modellezésére választottam, vizsgálva a degradációs folyamatokat.

A peptidek stabilitási vizsgálatai során összességében 450 minta peptid koncentrációjának meghatározása és feldolgozása történt meg. A tiol csoportot nem tartalmazó peptidek vizsgálata során három peptid (alanil-glutamin, L-karnozin, aszpartám), 10 környezeti paraméter háromszori ismétlésben meghatározva, három mintavételi időpontban (270 minta), míg a cisztein tartalmú peptidek vizsgálata során két peptid (L-glutation,  $\gamma$ -glutamil-cisztein), 10 környezeti paraméter, háromszori ismétlésben meghatározva, három mintavételi időpontban (180 minta). A vizsgálatok kiértékelése és az azokból levonható következtetések az 5.7.1. és 5.7.2. fejezetben kerülnek ismertetésre.

#### **4.8. Természetes peptidok stabilitásának vizsgálata komplexképző fémek alkalmazásával**

A természetes peptidok funkcionális élelmiszerekben történő alkalmazását jelentősen befolyásolhatja a környezet paramétereinek változása. Korábbi vizsgálataim (5.8. fejezet) igazolták, hogy a peptidok különböző környezeti behatások eredményeként eltérő stabilitást mutatnak. Általánosan megállapítható, hogy a legtöbb vizsgált környezeti paraméter gyorsítja a bomlási folyamatokat. A természetes peptidok stabilitási tulajdonságai fémkomplexek képzésével növelhető, mely által elérhető, hogy megfelelő tulajdonságokkal bíró, stabil peptidokat tartalmazó funkcionális élelmiszerek előállítására nyíljon lehetőség. A komplexképző fémek stabilitási hatásainak vizsgálatához a kutatás során eddig tanulmányozott peptidok közül három vegyület került kiválasztásra.

A három peptid (Apm, Gsh, L-kar) standardból 20 mg/l töménységű törzsoldatot készítettem két különböző pH tartományban (pH= 4,8; 7,0), míg szénhidrát mátrix modellezése céljából 1%-os koncentrációjú keményítő (Sigma-Aldrich) oldatot is alkalmaztam. A peptid oldatokat fémvegyületekkel (vas-szulfát, cink-klorid, kalcium-klorid, magnézium-szulfát) (VWR) stabilizáltam, majd spektrofotometriás módszerrel (Jasco V-650) detektáltam a változásokat. A peptid-fém komplexek stabilitásának növelését az arányok változtatásával valósítottam meg, mivel az 5.5. fejezetben ismertetett eredmények alapján megállapítottam, hogy a peptidok fémekkel történő komplex vegyületek kialakulása közben 1 peptid molekula nem kizárólag 1 komplexképző fémmel kötődik, hanem 1 peptid 2 fémmel és 2 peptid molekula 2 fémmel alkotott komplexének kialakulását is meghatározta peptid-fém kapcsolódás során. A kísérletekben a komplexképző fém és peptid arányokat úgy állítottam be, hogy az adott fém stabilizáló hatását a maximális értékre lehessen növelni. Az alkalmazott arányok adott fémmre vonatkozóan: fém:ligandum= 4:1; 2:1; 1:2; 1:4; 1:12 volt.

A peptid standardokból 20 mg/l koncentrációjú törzsoldatokat készítettem eltérő kémhatással és keményítő oldatban. A törzsoldatokhoz 12,49 g/l koncentrációjú kalcium-klorid, 10,23 g/l koncentrációjú magnézium-szulfát, 11,58 g/l koncentrációjú cink-klorid és 23,62 g/l koncentrációjú vas-szulfát oldat került hozzáadásra a peptid oldat térfogatának megfelelően (25 ml peptid oldat +80 µl, 40 µl, 80 µl, 10 µl, 5 µl, 1,67 µl). A másik két peptid esetében (L-kar és Gsh) a hozzáadott fémek koncentrációja a peptid móltömegének változásával egyenes arányban került meghatározásra. A stabilitási vizsgálatokat mindhárom peptid esetében 15 napos maximális időintervallumban végeztem, mivel korábbi stabilitási-tárolási vizsgálataim eredményei (5.8. fejezet) azt mutatták, hogy 10 nap elteltével nagymértékben csökken a peptidok stabilitása. A mintavételezések és a mérések 3 nap, 5 nap, 10 nap és 15 nap elteltével történtek.



#### 4.9. A vizsgált peptid származékok antioxidáns aktivitásának meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) módszer alapján

A FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) eljárás alapuló antioxidáns aktivitás meghatározás a vizsgált komponens redukáló képességét adja meg. A meghatározás a vas(III)-tripiridiltriazin  $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$  vas(II)-tripiridiltriazinná  $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$  redukációján alapul, melyet egy antioxidáns hatású vegyület reakcióba történő belépése szükséges 3,6 körüli pH értéken. A vas (II)-tripiridiltriazin egy ibolyaszínű komplex vegyület, melynek színintenzitása összefüggésben van az adott antioxidáns redukáló képességének erősségével. A színintenzitás változása spektrofotometriás módszerrel, 593 nm hullámhosszon detektálható.

A FRAP vizsgálatokat peptid standard oldatokon végeztem el. A peptid standard vegyületekből (Sigma-Aldrich) 100 mg/l töménységű törzsoldatokat készítettem, majd MAGALHAES és munkatársai (2008) közleménye alapján elkészítettem az antioxidáns aktivitás meghatározásához szükséges reagenseket. A FRAP reagens az alábbi oldószerekből készült: 25 ml acetát-ecetsav puffer (VWR), 2,5 ml  $\text{FeCl}_3$ -oldat (VWR), valamint 2,5 ml TPTZ [2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin] (Sigma-Aldrich) oldat. A puffer oldat kémhatását pH=3,6 értékre állítottam be, elkészítése 46,3 ml,  $2 \times 10^{-1} \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú (0,2 M) ecetsavból (VWR), valamint 3,7 ml, 0,2 (M) nátrium-acetát (VWR) oldat keverésével történt.  $\text{FeCl}_3$ -ből 20 mM töménységű oldatot készítettem, 230 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  50 ml desztillált vízben történő feloldásával. A tripiridil-triazinból 10 mM koncentrációjú oldatra volt szükség, melyet 78,05 mg TPTZ 25 ml desztillált vízben történő feloldásával állítottam elő, majd az oldatot 84  $\mu\text{l}$  cc. HCl (VWR) oldattal savanyítottam. A reakció lejátszódása szobahőmérsékleten történik. A mérendő komponens összetételét 2900  $\mu\text{l}$  FRAP reagens és 100  $\mu\text{l}$  minta keverésével állítottam be. A színintenzitás változását az 5 perces reakcióidő elteltével, fix hullámhosszúságon (593 nm) abszorbancia meghatározással detektáltam. Az antioxidáns aktivitás értékek aszkorbinsav egyenértékben (AAE) kerülnek meghatározásra.

#### **4.10. Élelmiszerminták peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszerek alapján**

A kis molekulatömegű peptidek kromatográfiás meghatározásának módszerfejlesztését követően szükség van a módszer ismételtetésének ellenőrzésére. A dolgozat 5.7. pontjában ismertetett módszerfejlesztés és mennyiségi meghatározás során minden esetben standard peptid vegyületek alkalmazásával kerültek meghatározásra. A vizsgált peptidek valós mintákból történő meghatározását az eltérő kromatográfiás módszerek megfelelően (danzil-kloriddal történt származékképzés - 4.5. és 5.5. fejezet és OPA származékképzés- 4.6. és 5.6.2. fejezetek alapján) végeztem. A vizsgált minták a szakirodalmi közleményeknek megfelelően (2.1. fejezet) növényi és állati forrásokból (élelmiszeripari alapanyagok, félkész- és késztermékek) kerültek kiválasztásra. A kromatográfiás vizsgálati módszernek megfelelően a kénmentes peptidek kvantitatív meghatározása danzil-kloriddal történő származékképzést követően, míg a tiol csoportot tartalmazó peptidek mennyiségét orto-ftáaldehiddel történt származékképzést követően határoztam meg. A reális mintákból történő meghatározás során azonban egy fontos tényező figyelembe vétele szükséges. A vizsgálati mintákban a peptidek kis mennyiségben találhatók (általában 1-10 mg/l körüli koncentráció), ezért a pontos és precíz minta előkészítés kulcsfontosságú. A valós minták előkészítése két főbb lépésből áll, melynek első lépése a minták fehérjementesítése, majd az adott módszer szerinti származékképzés (KÖRÖS *et al.* 2007.). A mérést zavaró makromolekulák eltávolítása kulcsfontosságú a peptidek mennyiségi meghatározásának céljából, mely független a kromatográfiás mérési módszertől és detektálási módtól. A fehérjementesítési folyamat első lépései a vizsgálati minta homogenizálása (Ika Ultra Turrax- T25), a homogén minta 3 gramm tömegének analitikai pontossággal történő bemérése, majd tízszeres mennyiségű desztillált vízzel történő hígítása. A minta hígítását követően újabb homogenizálási fázis következik (Elma ELS030), mely során az oldatot ultrahangos fürdőben homogenizáltam 10 perc időtartamban, folyamatos hűtés mellett. A homogenizált mintához 2,5 ml térfogatú, 1 M koncentrációjú perklórsav (VWR) oldat adagolásával a mintában található fehérjemolekulák kicsapása következik be. A minta kémhatásának lúgos tartományba történő beállítását szilárd NaOH-val (VWR) hajtottam végre pH=8,0 értékre. A megfelelő kémhatású és fehérje molekuláktól mentesített mintából 1 ml térfogatot 0,22 µm pórusátmérőjű membránszűrőn (Vialab Kft.) keresztül szűrtem, majd a 4.5 és 4.6. fejezetben ismertetett módszer szerint elvégeztem a származékképzést és ezt követően a mennyiségi meghatározást.

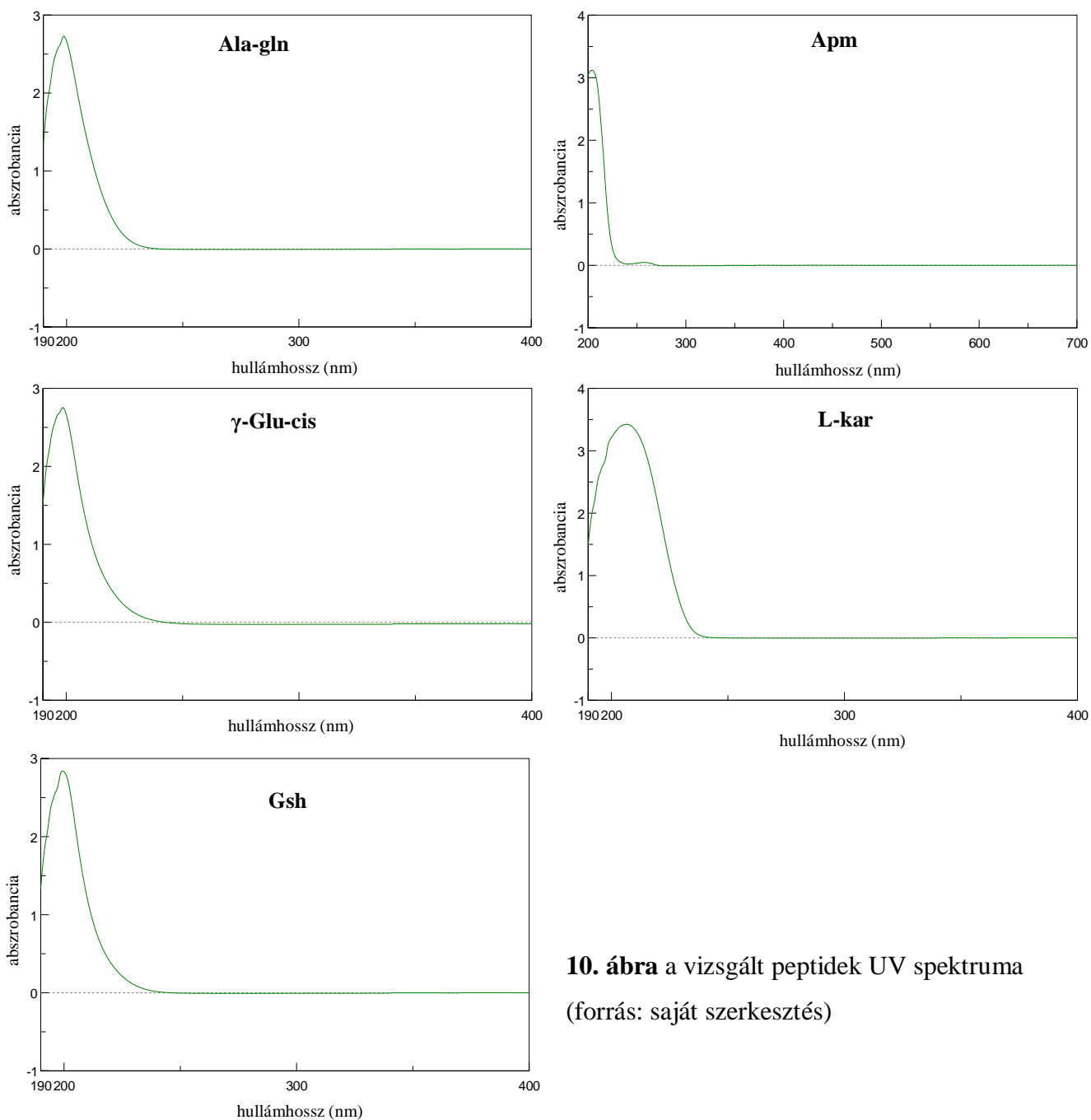
#### **4.11. A kutatás során alkalmazott kiértékelési módszerek**

A folyadék kromatográfias vizsgálatok értékeléséhez Shimadzu Lab Solutions (Shimadzu Corporation, Japan) kiértékelő szoftver került felhasználásra. Az eredmények ábrázolását Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Edition, 2010) program segítségével végeztem. A dolgozatban megtalálható szerkezeti ábrák ACD/ChemSketch (ACD/Labs, Canada) kémiai szerkezetalkotó szoftver felhasználásával készültek. A vizsgálatok során a vizsgálati minták három párhuzamos mérésben kerültek meghatározásra, melyek esetén az átlag és szórás eredmények feltüntetésre kerültek az eredmények, értékelés anyagrészben.

## 5. EREDMÉNYEK, ÉRTÉKELÉS

### 5.1. Maximális elnyelési hullámhosszok meghatározása a vizsgált peptidek esetén

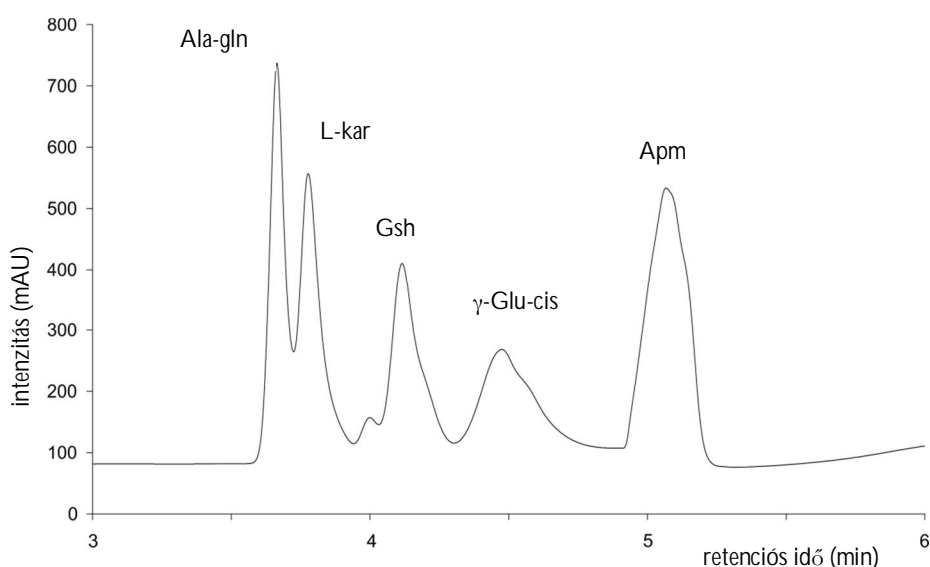
Az oldatok UV/VIS vizsgálata kis intenzitású elnyelési sávokat eredményezett alacsony hullámhosszú tartományban: 204,2 nm (aszpartám), 206,8 nm (L-karnozin), 199,4 nm (L-glutation), 198,8 nm (alanil-glutamin) és 198,6 nm ( $\gamma$ -glutamil-cisztein). A vizsgálatok során a peptidek maximális elnyelési hullámhossza meglehetősen közel esett egymáshoz, ezen túlmenően a vizes közeg is jelentősen befolyásolhatta a detektált elnyelési maximumokat.



10. ábra a vizsgált peptidek UV spektruma  
(forrás: saját szerkesztés)

## 5.2. Kromatográfias vizsgálatok értékelése diódasoros (DAD) detektálás alapján

Az UV/VIS vizsgálatokat követően megállapításra került a peptid vegyületek maximális elnyelési hullámhossz értéke, mely alapján a peptidok kromatográfias meghatározását egy módszer szerint szándékoztam elvégezni. Ennek megfelelően, a peptidekből készített standard oldatok kromatográfias elválasztását követően diódasoros detektálás során (DAD) a 195 nm-es hullámhosszat választottam detektálási hullámhosszként a peptidok mennyiségi meghatározására. Az öt standardot tartalmazó mintán végzett kísérlet eredményeként megállapítható, hogy a kromatográfias csúcsok elválása nem megfelelő, a peptidok mennyiségi meghatározása nem megoldható ezen módszer szerint.

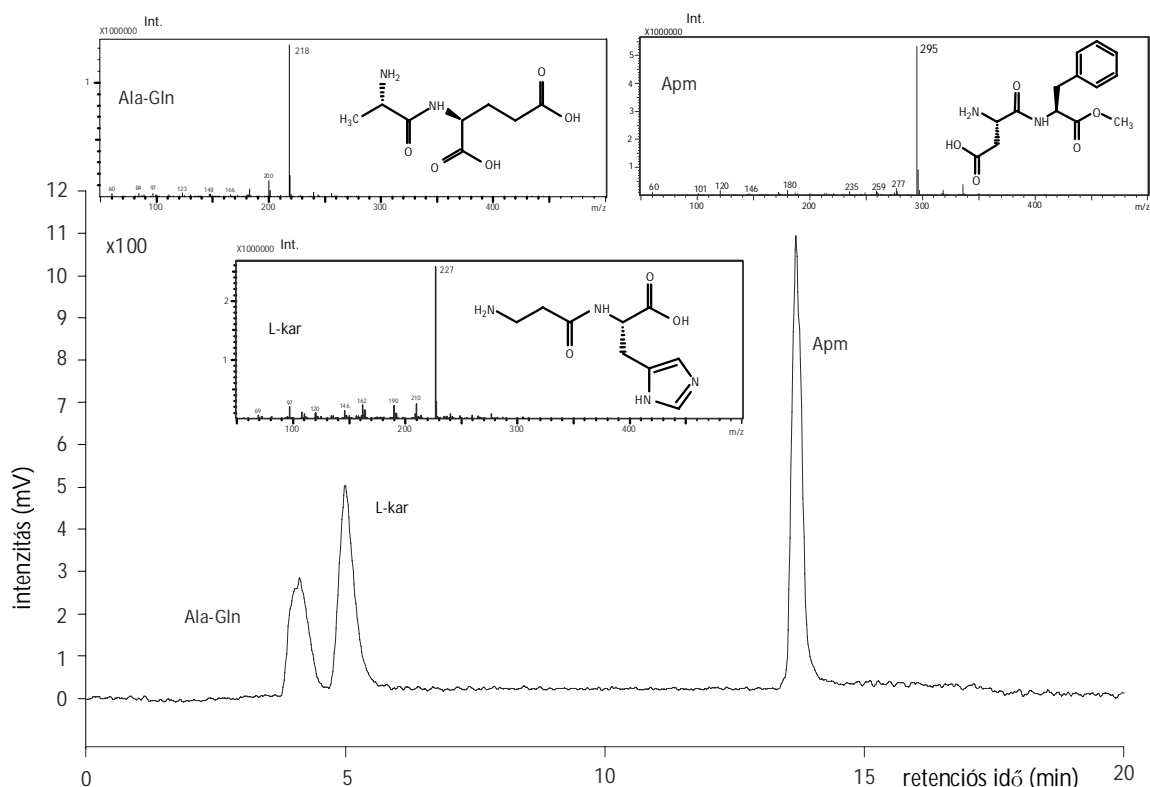


**11. ábra** a vizsgált peptidok 195 nm hullámhosszon, diódasoros detektálás során kapott kromatogramja (Alanil-glutamin (3,66 min.), L-karozin (3,78 min.), L-glutation (4,12 min.),  $\gamma$ -Glutamil-cisztein (4,48 min.), Aszpartám (5,07 min.)) (forrás: saját szerkesztés)

A kromatogramban 3,66 min. (Alanil-glutamin), 3,78 min. (L-karozin), 4,12 min. (L-glutation), 4,48 min. ( $\gamma$ -glutamil-cisztein) és 5,07 min. (aszpartám) retenciós idővel rendelkező csúcsok jelentek meg. A munka jelen fázisában a standardok egyértelmű elválasztása a feladat, mivel a fenti kromatogramból egyértelműen látszik, hogy további vizsgálatok szükségesek, majd ezt követően lehetséges reális mintákból származó extraktumok peptid tartalmának kvalitatív meghatározása.

### 5.3. Fényszóráson alapuló (ELS) detektálási vizsgálatok értékelése kis molekulatömegű peptidok kromatográfiás meghatározása során

A tiol csoportot nem tartalmazó peptidok vizsgálata során az ELS detektálás eredményeit tömegspektrumok alapján szerkezet meghatározással igazoltam. A három standardot tartalmazó minta kromatogramját, szerkezeti képletét és tömegspektrumát a 12. ábra mutatja:



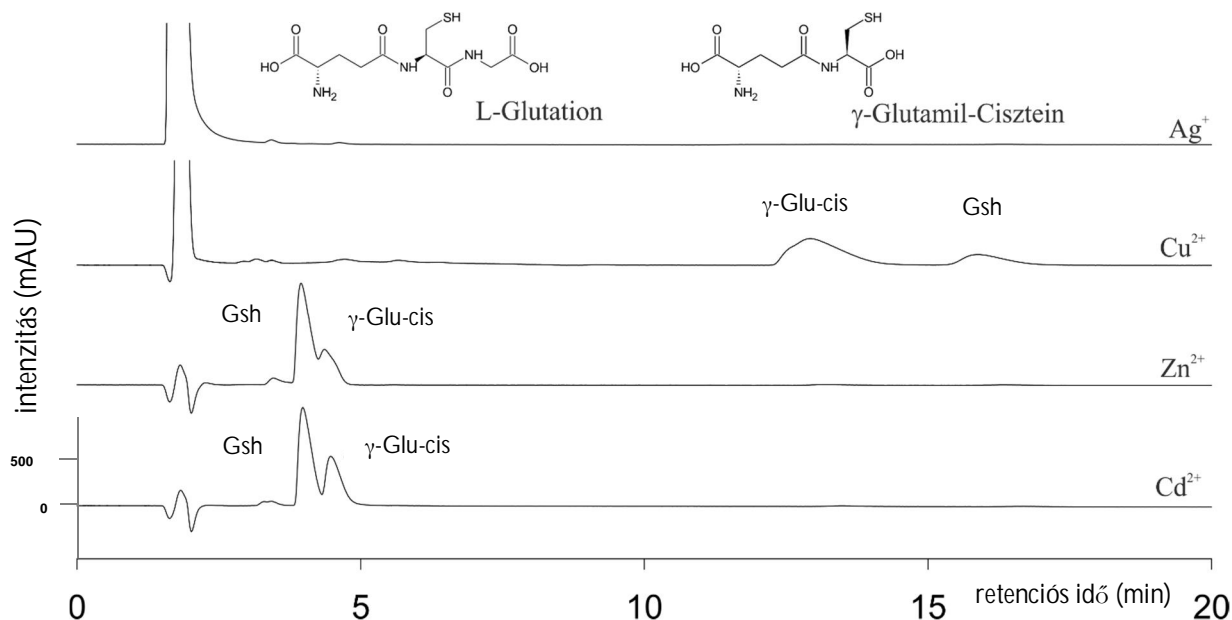
**12. ábra** alanil-glutamin, L-karnozin és aszpartám ELS detektálást követően kapott kromatogramok és a vegyületek tömegspektrumai (forrás: saját szerkesztés)

A kromatogramban 4,11 min (Ala-gln), 5,80 min (L-kar) és 13,68 min (Apm), retenciósi idővel jelentkezett a három vegyület kromatográfiás csúcsa. A kromatogramok kiértékelése alapján megállapítható, hogy a három vizsgált peptid retenciósi ideje megfelelő a minőségi meghatározáshoz, azonban a jelalak és jelintenzitás nem megfelelő, a mennyiségi meghatározás számára nem alkalmazható kellő biztonsággal. A tiol csoportot tartalmazó peptidok meghatározása ELS detektálással nem hajtható végre, mivel a 100 °C körüli hőmérsékleten történő ködképzés és párologtatás a peptidok bomlását okozza.

#### 5.4. Komplexképző fémek alkalmazása a peptid stabilitás fokozása érdekében

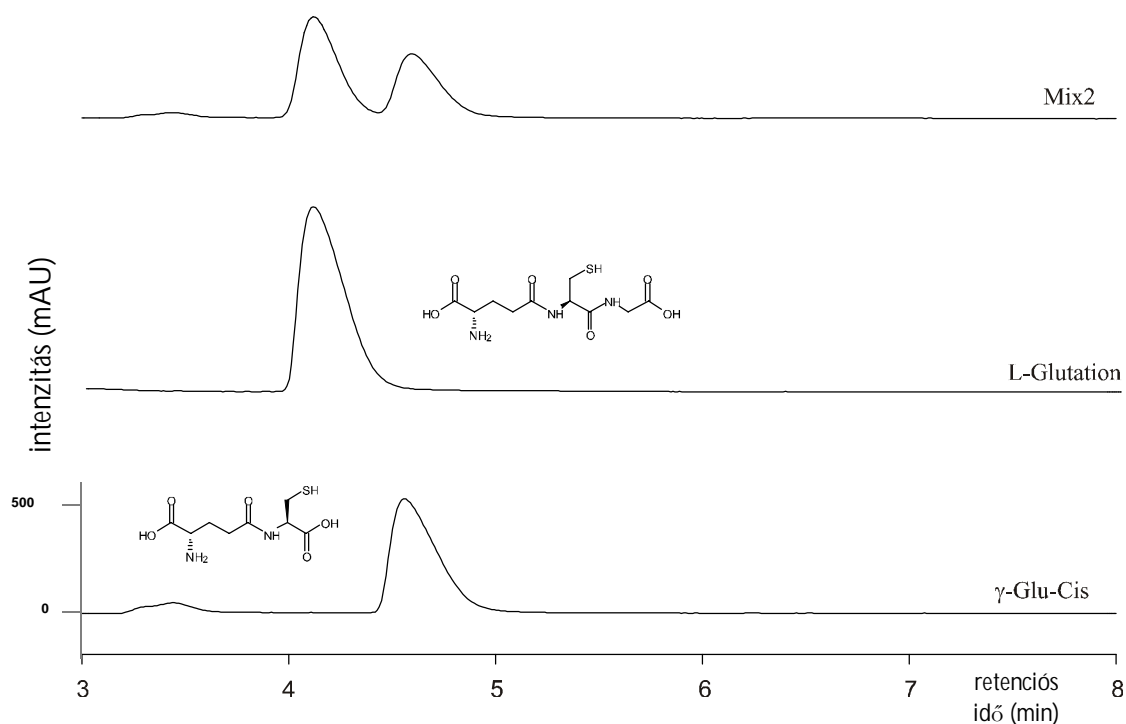
A szabad peptid vegyületek 200 nm körüli hullámhossz tartományban elvégzett detektálása nem mutatott elfogadható jelszeparációt a kromatogramban. Mivel szabad formában a peptidek kromatográfiás meghatározása nem valósítható meg, a vizsgált peptidek kromatográfiás meghatározásához komplexképző fémeket alkalmaztam. A peptid-fém komplex vegyületek detektálása 203 nm hullámhosszon történt diódasoros detektálás mellett. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az ezüst ionokkal alkotott peptid komplexek nem eredményeznek megfelelő jelszeparációt a kromatogramban. A kéntartalmú peptidek rézzel alkotott komplex vegyületek meghatározása során a kromatográfiás csúcsok (12,9 min.  $\gamma$ -Glu-cis; 15,9 min. Gsh) elválása megfelelő (13. ábra), azonban a jelalak és az intenzitás nem teszi lehetővé kromatográfiás mennyiségi meghatározásukat. A cink esetében detektált kromatográfiás jelek a két kén tartalmú peptidnél alacsony retenciós idővel jelentkeztek, azonban a jelszeparáció nem megfelelő, mennyiségi meghatározás nem végezhető ezek alapján.

A  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  ionokkal kezelt oldatok esetén a kromatográfiás tulajdonságok hasonlóak, azonban a kadmium-peptid komplex kialakulásakor jobb hatásfokú jelelválás állapítható meg a többi alkalmazott fémvegyülethez viszonyítva a kromatogramok alapján.



13. ábra a peptid-fém komplexek kromatográfiás értékelése ezüst, réz, cink és kadmium komplexképzők alkalmazása esetén (forrás: saját szerkesztés)

A 14. ábrán látható kromatogram alapján a két tiol tartalmú peptid kadmiummal alkotott komplexének vizsgálatait végeztem el. A kadmium alkalmazása a kénmentes peptidekhez hasonlóan stabilitást növelő céllal, komplexképző fémvegyületként történt. A kadmiummal történő komplex képződés biztosításához a komplexképző fémet a két peptid standard oldatához külön adagolva, majd a kadmiumot a két peptidet egyszerre tartalmazó oldatba is bekevertem, figyelve a peptidek és fémek kapcsolódási lehetőségeire. A tiol tartalmú és tiol csoportot nem tartalmazó peptidek kadmiummal történő komplexképzését meghatározó kromatográfiai módszer azonos. A kromatográfiai vizsgálatok során kapott kromatogramok kiértékelése ez esetben is 203 nm hullámhosszon történt hasonló vizsgálati és detektálási paraméterek alkalmazása mellett.

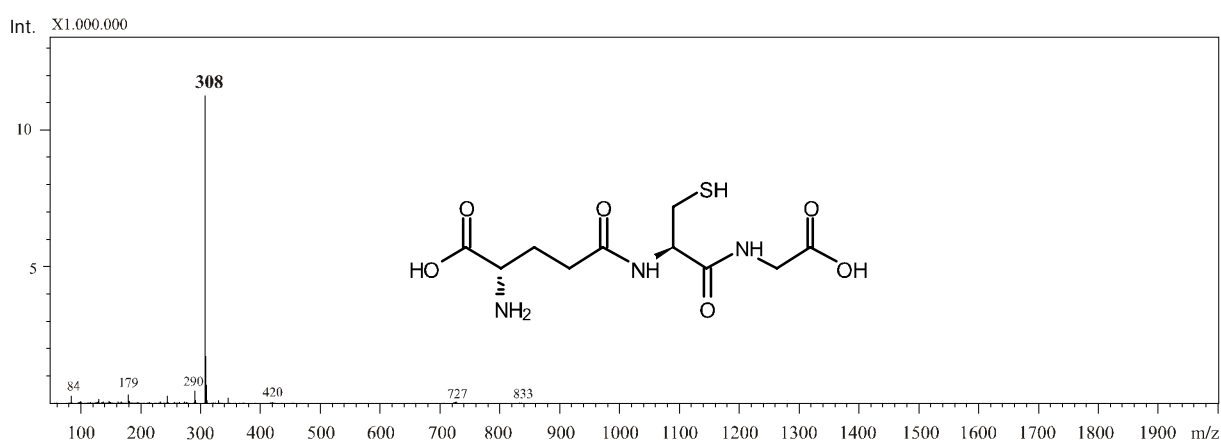


**14. ábra** kén tartalmú peptidek Cd-komplexált formájának folyadék-kromatográfiai meghatározása (UV/VIS detektálás 203 nm) (forrás: saját szerkesztés)

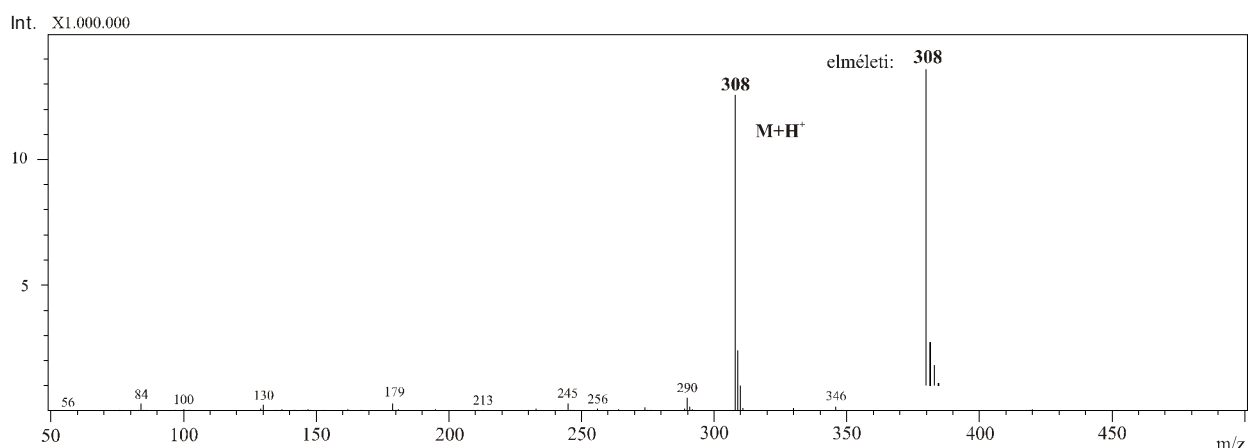
A  $\gamma$ -Glu-cis retenciós ideje 4,56 min., az L-glutation 4,1 min. retenciós idővel detektálható. A két vegyület a fenti kísérleti körülmények között közel alapvonalon történő elválása lehetővé teszi kvantitatív meghatározását. A megfelelő jelelválás az MS detektálást is lehetővé tette. A HPLC vizsgálat során a tömegspektrometriás detektálást alkalmazva az ion-kromatogramok alapján kerültek meghatározásra a molekulatömegek és a peptid-fém kapcsolódások.



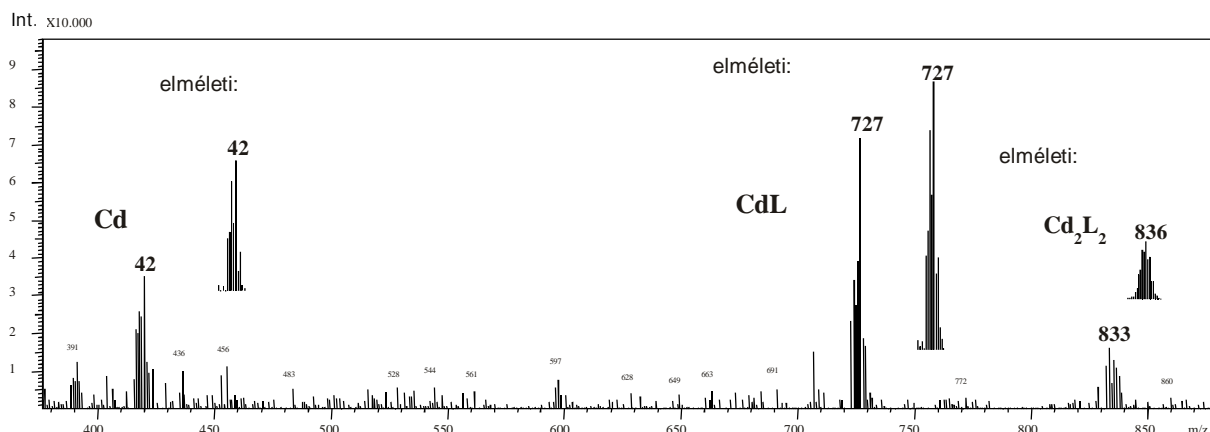
Az L-glutation MS spektrumában a ligandum móltömegén kívül (308 g/mol) (15. ábra) megjelennek a kadmium komplexre jellemző tömeggel rendelkező csúcsok is, melyet a csúcsok intenzitásának elméleti számításaival is igazoltam (16. ábra). A kiértékelés során megállapítottam, hogy a tömegspektrumban három komplex forma jelentkezett. Az első esetben egy glutation molekula kapcsolódik egy kadmiummal, melynek igazolásaként a CdL:420 g/mol molekula tömeg határozható meg a tömegspektrum értékelése során. A második lehetőség a peptid-fém komplex kialakulására az egy kadmium és két peptid molekula összekapcsolódása, mely CdL<sub>2</sub>:727 g/mol tömegértékkal jelenik meg a spektrumban. A harmadik kapcsolódási forma a két kadmium kettő peptiddel alkotott komplexe, mely Cd<sub>2</sub>L<sub>2</sub>:836 g/mol tömeg detektálásával igazolható a tömegspektrometriás detektálás során (17. ábra).



**15. ábra** az L-glutation kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása  
(forrás: saját szerkesztés)

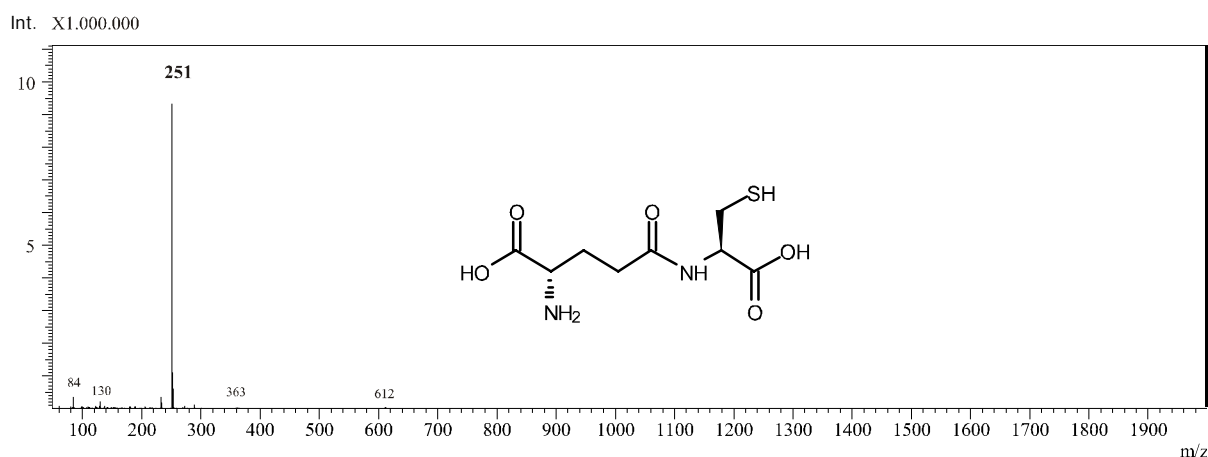


**16. ábra** az L-glutation kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása az elméleti és a tapasztalt tömegértékekkel (forrás: saját szerkesztés)

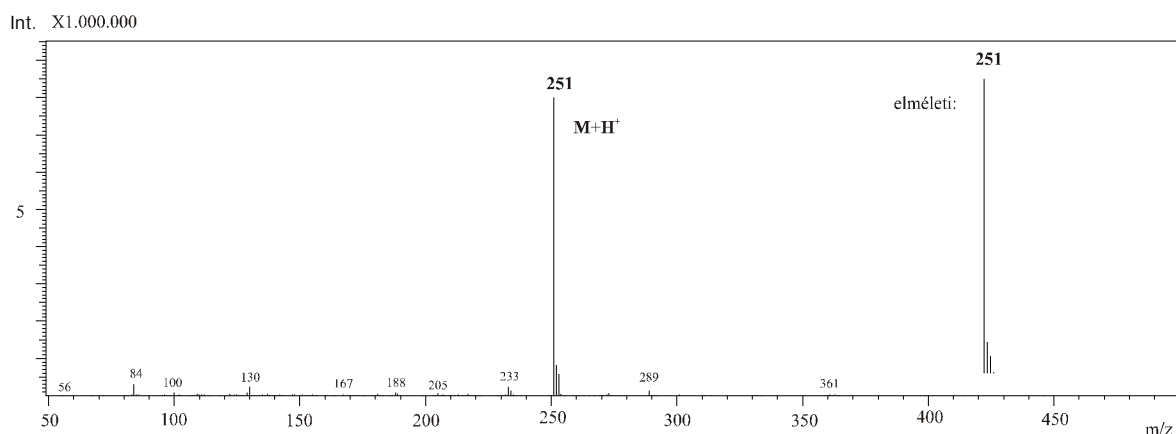


**17. ábra** az L-glutation kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása a fém-peptid komplexek kialakulásának lehetőségével (forrás: saját szerkesztés)

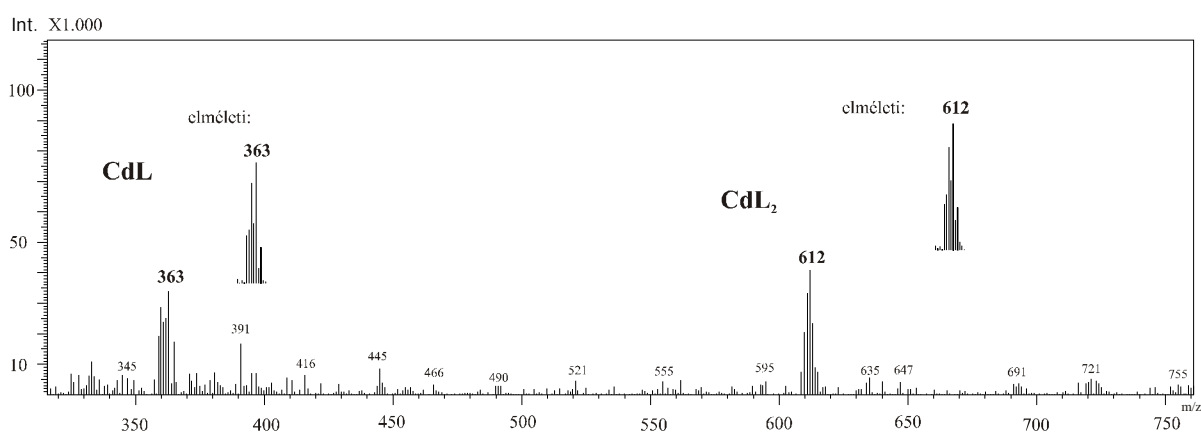
A  $\gamma$ -glutamil-cisztein esetén a ligandum 251 g/mol tömegű (19. ábra), a glutationtól eltérően azonban az MS spektrumban csak kétféle kapcsolódási formát sikerült megbízhatóan meghatározni. Az első komplex lehetőség az egy peptid egy fém kapcsolódása, mely CdL 363 g/mol tömegértékkal jelentkezik a tömegspektrumban. A másik komplex képződési alternatíva az egy peptid két fémmel alkotott komplex vegyülete, melyet CdL<sub>2</sub> 612g/mol tömegértékkal azonosítottam a tömegspektrumban (20. ábra).



**18. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása (forrás: saját szerkesztés)



**19. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása az elméleti és a tapasztalt tömegértékekkel (forrás: saját szerkesztés)

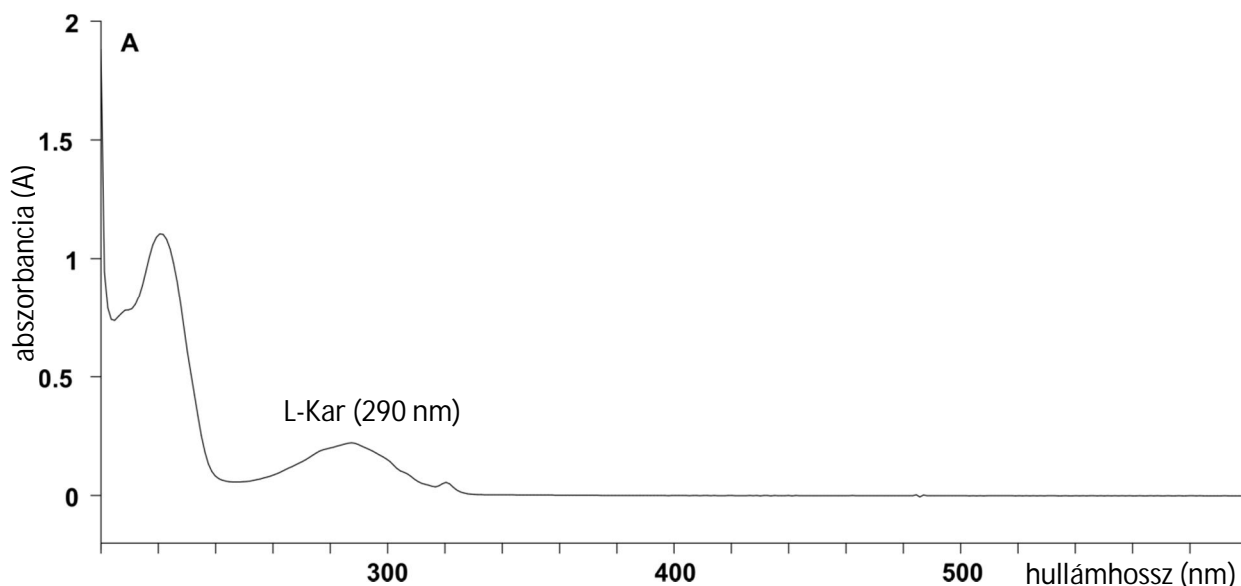


**20. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása a fém-peptid komplexek kialakulásának lehetőségeivel (forrás: saját szerkesztés)

Az ionkromatogramokban látható peptid:fém komplexek kialakulási viszonyai oldatbeli koncentrációjuk eltéréséből és arányából egyértelműen nem megállapítható, ugyanakkor a komplexek képződésének helye sem igazolható egyértelműen. Az elvégzett vizsgálatok alapján az állapítható meg, hogy a különböző komplex formák egyetlen kromatográfiai csúcsban jelentkeznek. A komplexek képződése történhet az oldatokban és történhet a tömegdetektorban az ionizáció során is.

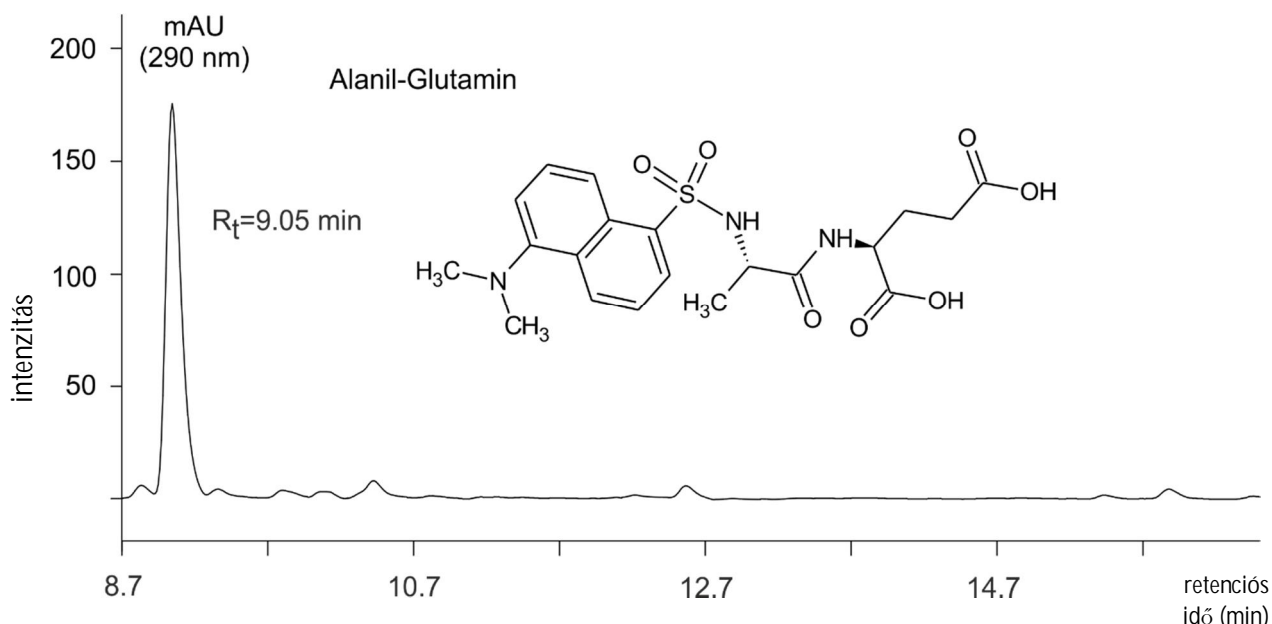
## 5.5. Danzil-koliddal végrehajtott származékképzési módszer eredményei

A peptidek kvalitatív és kvantitatív meghatározását standard vegyületeikből danzil-kloriddal végzett származékok azonosításával végeztem el. A kén tartalmú peptidek vizsgálata során megállapítottam, hogy a danzil-kloriddal történő származékképződést követően nem lehetséges kellő hatékonyságú kromatográfias meghatározás. A továbbiakban a vizsgálatok alapján a tiol csoportot nem tartalmazó peptidek (Ala-gln; Apm, L-kar) kromatográfias meghatározását végeztem el Danzil-kloriddal történt származékképzést követően a 4.5. fejezetben meghatározott módszer alapján. A kromatográfias elválasztás detektálása diódasoros detektorral történt, a kromatogramokat 290 nm hullámhosszon értékeltem ki. A 290 nm hullámhosszon történő kiértékelés indoklását a 21. ábra szemlélteti, melyen az L-karnozin danzil-kloriddal alkotott komplexének UV/VIS spektruma látható. A spektrum alapján egyértelműen megállapítható, hogy a danzil-peptid komplex maximális abszorbanciája 290 nm hullámhosszon található.



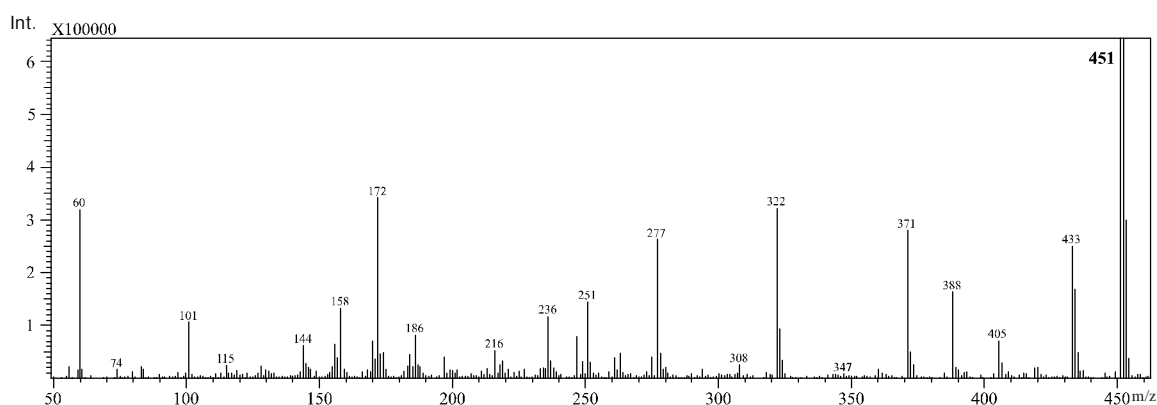
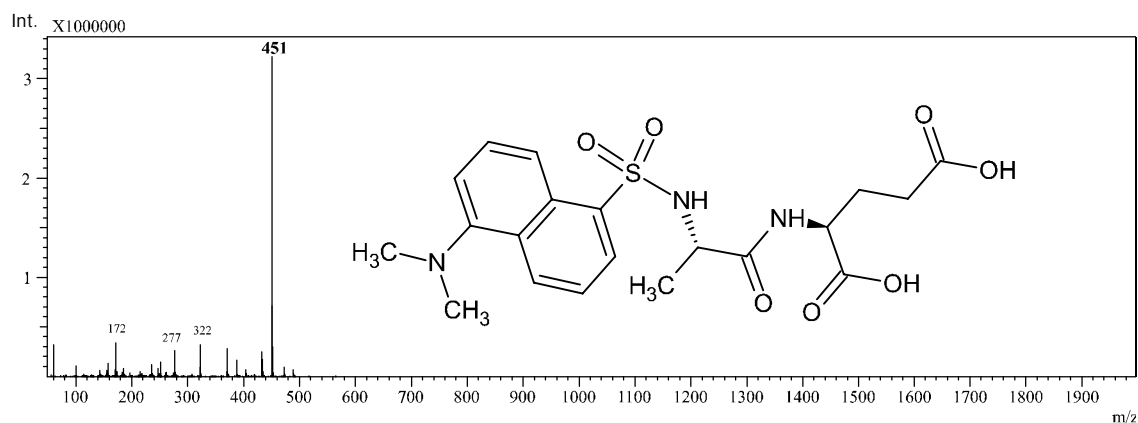
**21. ábra** Danzil-kloriddal származékképzett peptidek maximális abszorbanciájának igazolására szolgáló UV/VIS spektrum az L-karnozin peptid példáján szemléltetve  
(forrás: saját szerkesztés)

Az alanil-glutamin kromatográfiás vizsgálata alapján a vizsgált vegyület retenciós ideje 9,05 perc. A kapott kromatogram alapján megállapítható (22. ábra), hogy a danzil-kloriddal származékkolt peptid mennyiségi meghatározására alkalmazott módszer megfelelő. A jeleválás alapvonalon történik és a jelalak is megfelelő.



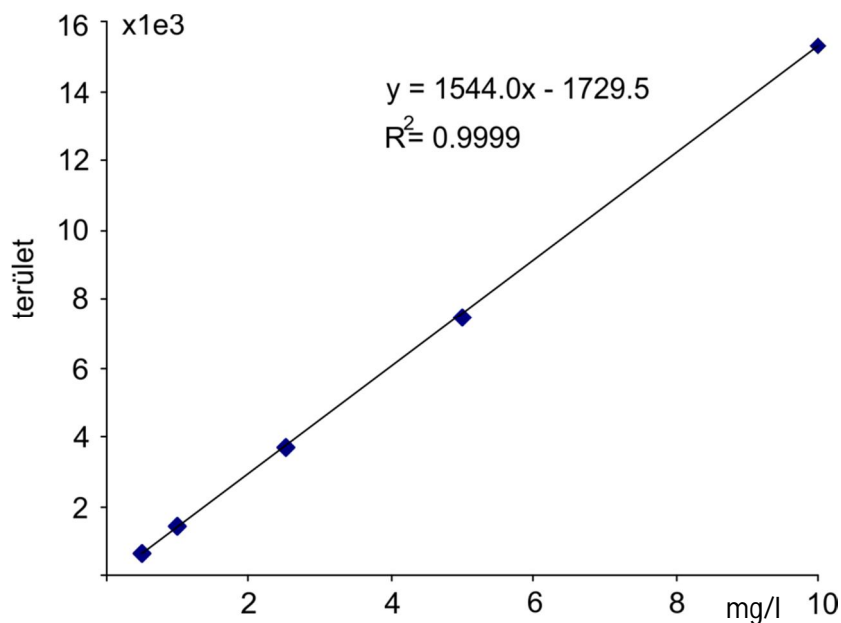
**22. ábra** az alanil-glutamin UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete danzil-kloriddal történt származékképzést követően  $R_t=9,05$  min. retenciós idő esetén (forrás: saját szerkesztés)

A módszer hatékonyságának igazolására szerkezetbizonyítást végeztem HPLC-MS (Shimadzu LCMS-2010) készüléssel atmoszférikus nyomáson végzett kémiai ionizáció (APCI) ionizáció mellett. Az Ala-gln retenciós ideje 15,5 perc és a csúcs MS spektrumában (23. ábra) egyetlen nagy intenzitású báziscsúcs jelenik meg a 451 g/mol móltömeggel, ami arra utal, hogy a dipeptid molekula egyetlen danzil csoportot tartalmaz (217+234). A fragmentációk alapján bizonyítható volt, hogy a danzil szubsztitúció a láncvégi amino-csoporton történt meg.



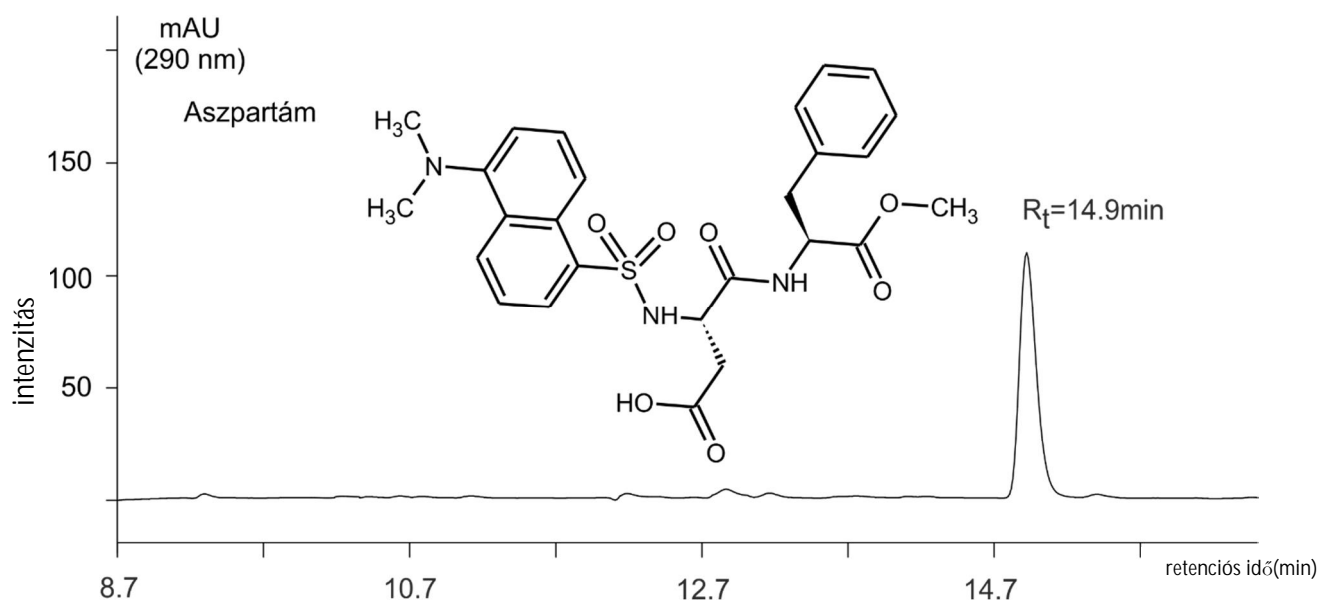
**23. ábra** az alanil-glutamin tömegspektruma  $m/z=50-2000$  és  $m/z=50-460$   
(forrás: saját szerkesztés)

A danzil-klorid származékképző alkalmazása során az alanil-glutamin mennyiségi meghatározását külső kalibráció felállításával hajtottam végre. A kalibrációt lineáris illesztéssel végeztem, a korreláció értéke ( $R^2$ ), mely a kalibrációs pontok egyenestől való eltérést mutatja, 0,9999 értéket adott, azaz a kalibrációs oldatokhoz tartozó koncentráció értékei jól illeszkednek az egyenesre, a köztük lévő összefüggés lineárisnak tekinthető (24. ábra). Az alanil-glutamin meghatározás érzékenysége az egyenes meredekségéből adódóan megfelelőnek mondható, azonban elmarad az L-karnozin érzékenységétől, mivel a peptidhez egyetlen danzil csoport kapcsolódik. A tömegspektrometriás detektálás során egy kromofor kapcsolódását igazoltam (23. ábra) 451 g/mol tömegértékkel.



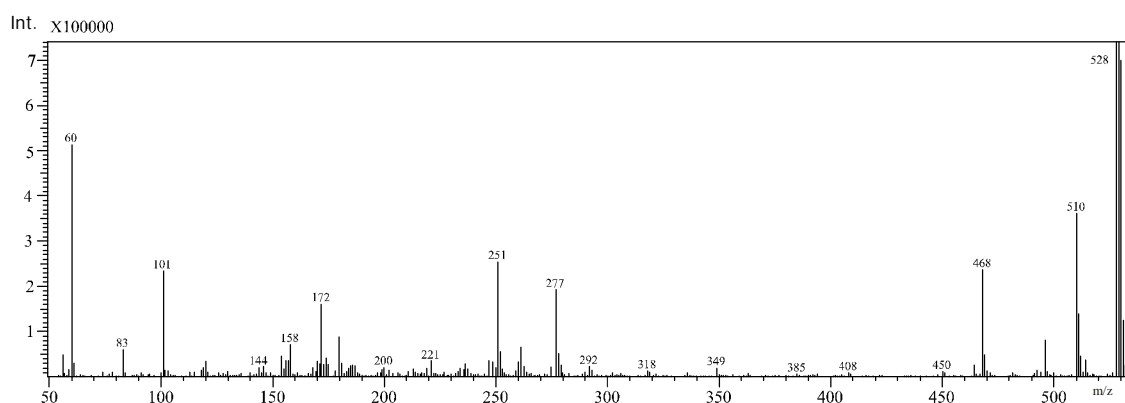
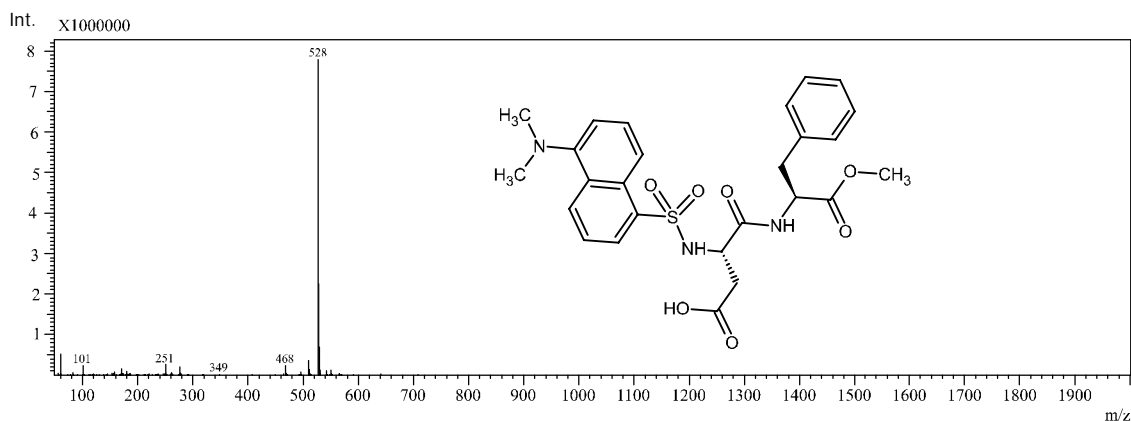
**24. ábra** Danszil-kloriddal származékkolt alanil-glutamil kalibrációs görbéje (forrás: saját szerkesztés)

Az aszpartám kromatográfiás meghatározása során megállapítottam, hogy a danszil-kloriddal történt származékképzést követően a danszil-peptid UV-aktív származék retenciós ideje  $R_t = 14,9$  min. Az alanil-glutamin esetén tapasztalt 9 perc körüli retenciós időhöz viszonyítva a jelszeparáció megfelelő, a kidolgozott módszer ez esetben is megfelel a későbbi mennyiségi meghatározás számára (25. ábra).



**25. ábra** az aszpartám UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete danszil-kloriddal történt származékképzést követően  $R_t=14,9$  min. retenciós idő esetén (forrás: saját szerkesztés)

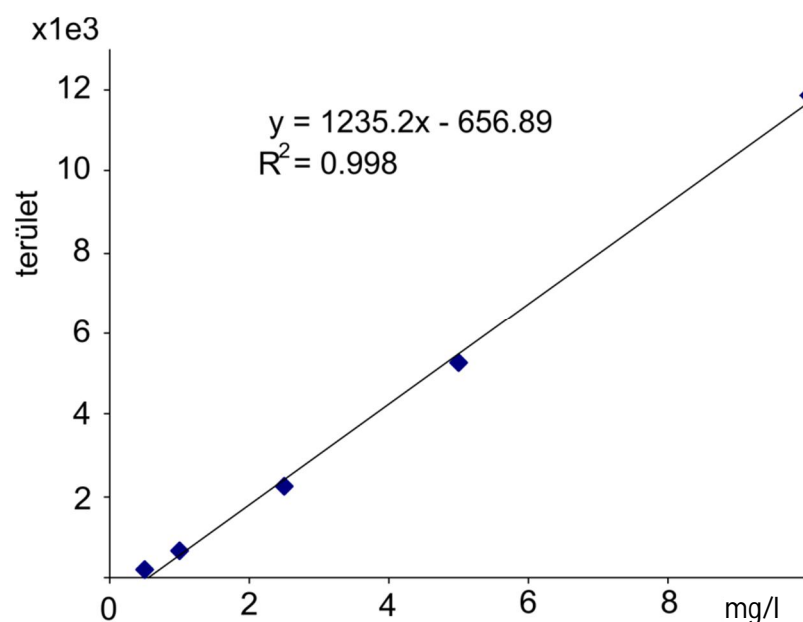
Az aszpartám-danzil származék esetében is elvégeztem a tömegdetektálást szerkezetazonosítás céljából. A HPLC csúcs 19,9 min. retenciós idővel rendelkezett, a báziscsúcshoz tartozó komponens molekulatömege 528 g/mol (26. ábra), ebben az esetben is egyetlen danzil csoport található a molekulán (294+234). A fragmentációk elemzése ebben az esetben is bizonyította a lánc végi amino csoport szubsztitúcióját.



**26. ábra** az aszpartám tömegspektruma m/z=50-2000 és m/z=50-550 (forrás: saját szerkesztés)

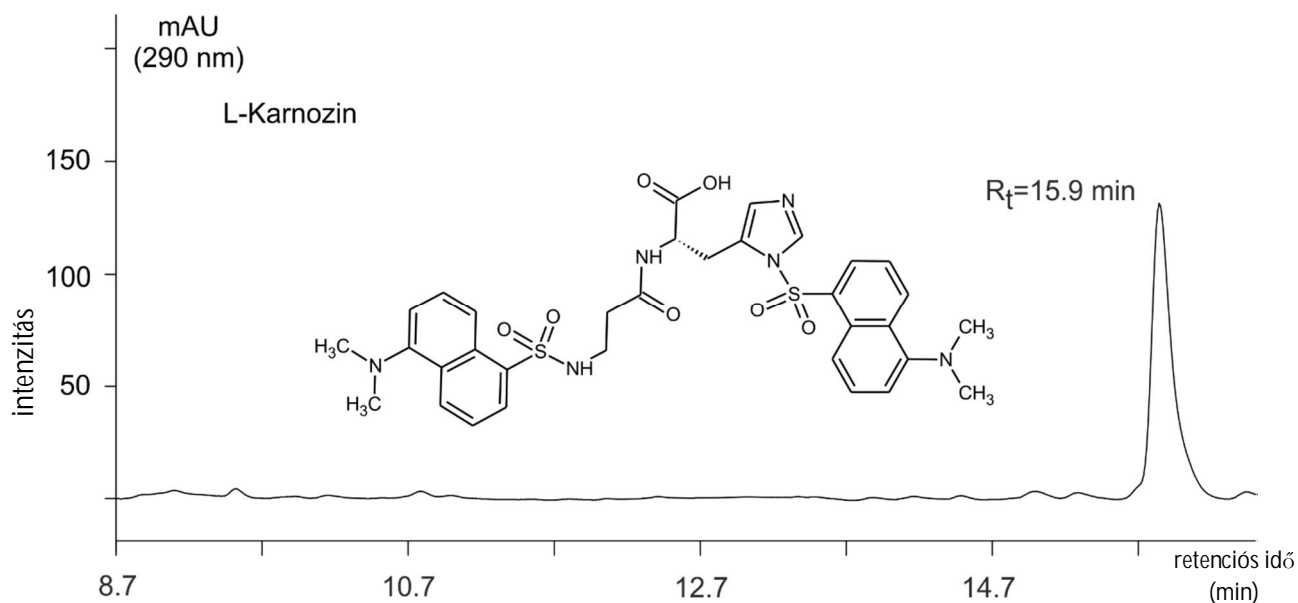
A danzil-klorid származékképző alkalmazása során az aszpartám mennyiségi meghatározását szintén külső kalibráció alkalmazásával hajtottam végre. A kalibrációt lineáris illesztéssel végeztem, a korreláció értéke  $R^2=0,998$ , azaz a kalibrációs oldatokhoz tartozó koncentráció értékei jól illeszkednek az egyenesre, a köztük lévő összefüggés lineárisnak tekinthető (27. ábra). Az aszpartám meghatározás érzékenysége nagyságrendileg azonos tartományba esik az alanil-glutamin kalibrációja során tapasztalt értékhez viszonyítva, mivel a két vegyület koncentrációjának meghatározására használt kalibrációs egyenes meredeksége egymáshoz közeli érték. Ezt alátámasztja, hogy mindkét vegyület esetén egy danzil molekula kapcsolódik a peptidhez, míg az L-karnozin esetén két származékképző kapcsolódását lehet igazolni.



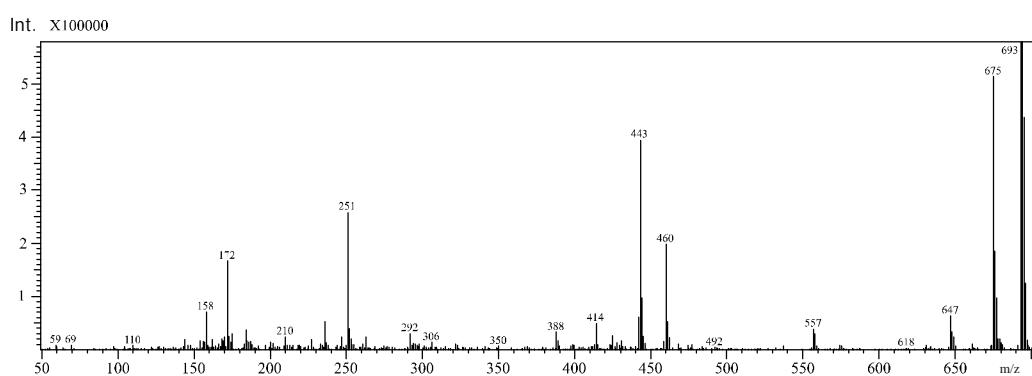
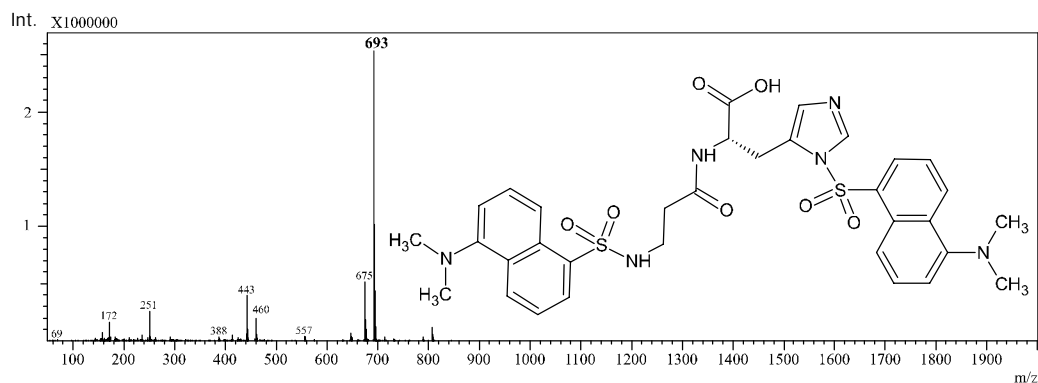


**27. ábra** Danzil-kloriddal származékkolt aszpartám kalibrációs görbéje (forrás: saját szerkesztés)

A danszil-kloriddal végzett származékképzést követően a harmadik kénmentes peptid esetében (L-karnozin) is elvégeztem a kidolgozott módszer szerinti kromatográfiai vizsgálatot. Megállapítottam a vegyület retenciós idejét ( $R_t = 15,9$  min.) (28. ábra), mely az Ala-gln esetén tapasztalt 9,05 min. és az Apm vizsgálata során megállapított 14,9 min. értékekhez viszonyítva megfelelő jelszeperációt eredményez a kromatogramban a három vegyület együttes vizsgálata.



**28. ábra** az L-karnozin UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiai jele és szerkezeti képlete danszil-kloriddal történt származékképzést követően  $R_t = 15,9$  min. retenciós idő esetén (forrás: saját szerkesztés)

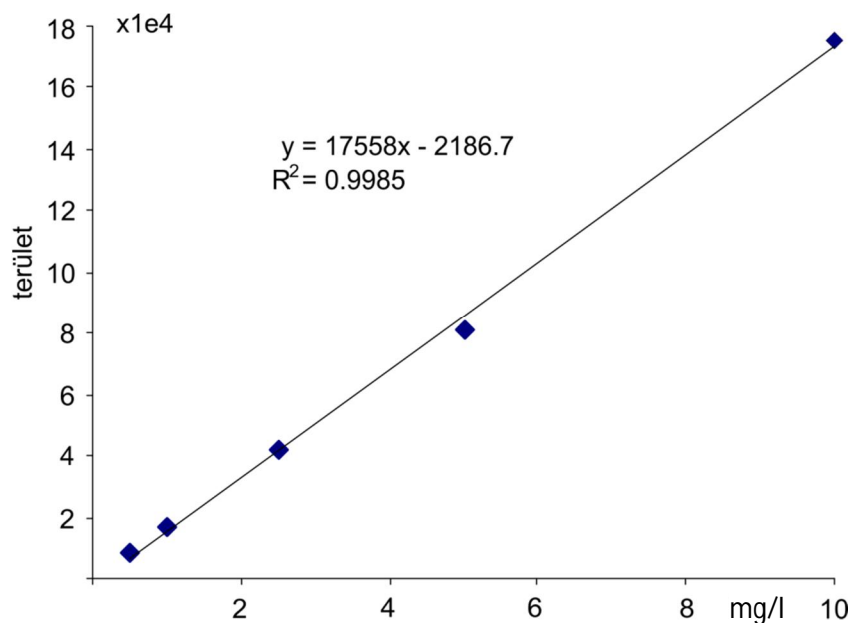


**29. ábra** az L-karnozin tömegspektruma  $m/z=50-2000$  és  $m/z=50-700$  (forrás: saját szerkesztés)

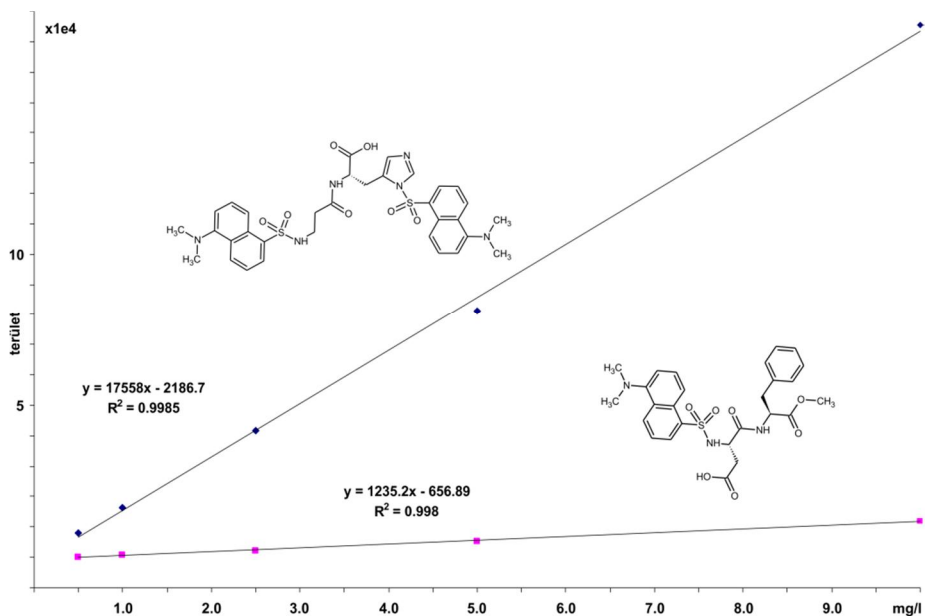
Az L-karnozin esetén a HPLC csúcs 15,9 min. retenciós idővel rendelkezett és a csúcshoz tartozó komponens molekulatömege 693 g/mol, ebben az esetben két danzil csoport található a molekulán ( $226+2*234$ ). A fragmentációk elemzése ebben az esetben bizonyította a lánc végi amino csoport szubsztitúcióját, azonban az imidazol gyűrű NH-csoportja is danzil csoporttal szubsztituált (29. ábra).

A danzil-klorid származékképző alkalmazása során az L-karnozin mennyiségi meghatározását külső kalibráció elvégzésével hajtottam végre. A kalibrációt lineáris illesztésével végeztem, a korreláció értéke  $R^2=0,9985$ , azaz a kalibrációs oldatokhoz tartozó koncentráció értékei jól illeszkednek az illesztett egyenesre, a köztük lévő összefüggés lineáris (30. ábra).

Az L-karnozin meghatározás érzékenysége egy nagyságrenddel jobb értéket adott a másik két kénmentes peptid esetén tapasztaltakhoz viszonyítva. Magyarozatként a tömegdetektálás során megállapított két származékképző kapcsolódása szolgál, mely során a két kromofor kapcsolódása növeli a peptid meghatározási módszer érzékenységét. Az L-karnozin és az aszpartám meghatározási módszer érzékenységének összehasonlítására vonatkozó megállapítás igazolására a 31. ábrán került összevetésre a két peptid kalibrációs egyenese.



**30. ábra** Danzil-kloriddal származékolt L-karnozin kalibrációs görbéje (forrás: saját szerkesztés)



**31. ábra** Danzil-kloriddal származékolt L-karnozin és aszpartám meghatározásához használt kalibrációs egyenesek meredekségének összehasonlítása (forrás: saját szerkesztés)

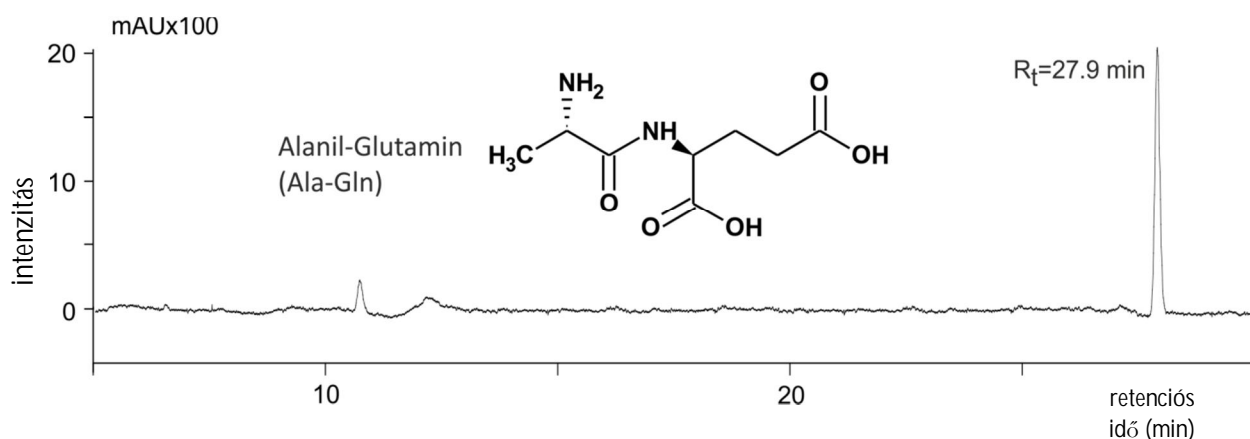
A kémiai analízis teljesítőképességének meghatározása az adott peptidhez tartozó kromatogram jel-zaj viszonyainak arányaival kerültek megállapításra. Az L-karnozin meghatározása során a kimutatási határ  $16 \mu\text{g/l}$ , az alanil-glutamin kimutatási határa  $17 \mu\text{g/l}$ , míg az aszpartám kimutatási határa  $160 \mu\text{g/l}$ .

## 5.6. OPA származékképzést követő meghatározás eredményei

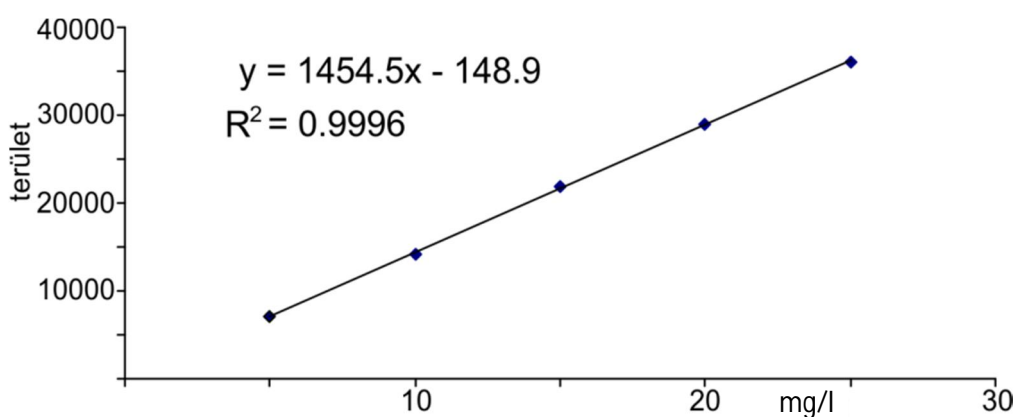
A danzil-kloriddal végzett származékképzési vizsgálatok eredményei alapján megállapítottam, hogy az öt peptid együttes meghatározása nem célszerű, mivel a vizsgált kénmentes vegyületek származékai nem eredményeznek értékelhető kromatográfiás jelet a mennyiségi meghatározáshoz. Az egy módszer szerinti meghatározást figyelembe véve újabb származékképzési módszert (OPA) alkalmaztam és a peptid-OPA származékok meghatározását UV/VIS detektálás mellett fluoreszcens detektálással (RF) is végrehajtottam.

### 5.6.1. UV/VIS (DAD) detektálás OPA származékképzést követően

A 4.6. fejezetben ismertetett származékképzési eljárást követően az öt peptid együttes meghatározását diódasoros detektálás alkalmazásával végeztem el. Az OPA peptid származékok UV/VIS detektálása során megállapítottam, hogy a vizsgált származékok meghatározása 336 nm hullámhosszon indokolt, itt detektáltam a legintenzívebb jelet, a retenciós idő 5-30 perc között változott. Megállapítható, hogy a kénmentes peptidek retenciós ideje jelentősen megnövekedett a danzil-kloriddal származékolás minták DAD vizsgálatához viszonyítva az OPA származékolást követő DAD detektálás során. A 32.-től 41.-ig feltüntetett ábrák alapján megállapítható, hogy a kénmentes peptidek orto-ftáaldehiddel történt származékképzést követően, diódasoros detektálás alkalmazásával a három vegyület retenciós idejének közelsége miatt nem adott elfogadható elválasztást. Az alanil-glutamin retenciós ideje ( $R_t=27,9$  min.) és az aszpartám retenciós ideje ( $R_t=27,14$  min.) még kellő távolságban van egymáshoz a két vegyület egyidejű meghatározására, azonban az L-karnozin meghatározása során detektált  $R_t=28,0$  min. retenciós idő már nem megfelelő a mennyiségi meghatározás végrehajtásához az alanil-glutamin retenciós idejét figyelembe véve. A danzil-kloriddal történt származékképzést követő kromatográfiás meghatározás során a vizsgált vegyületek retenciós ideje is alacsonyabb, ezáltal a vizsgálat időtartama is lerövidül, mely gyorsabb meghatározást eredményezhet. A kimutatási határ meghatározása is megtörtént az OPA származékképzést követően, diódasoros detektálás alkalmazása mellett.

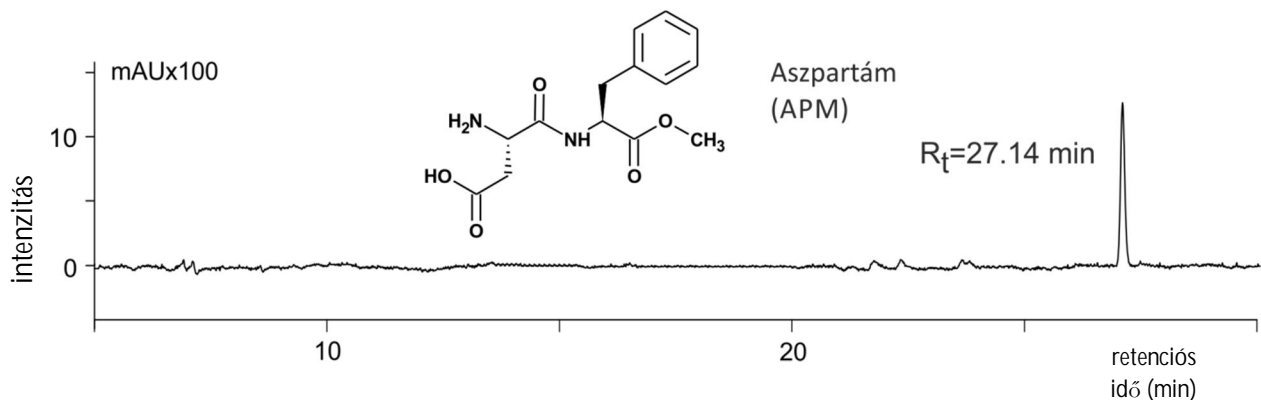


**32. ábra** az Ala-Gln UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=27,9$  min. retenciósi idő esetén (forrás: saját szerkesztés)

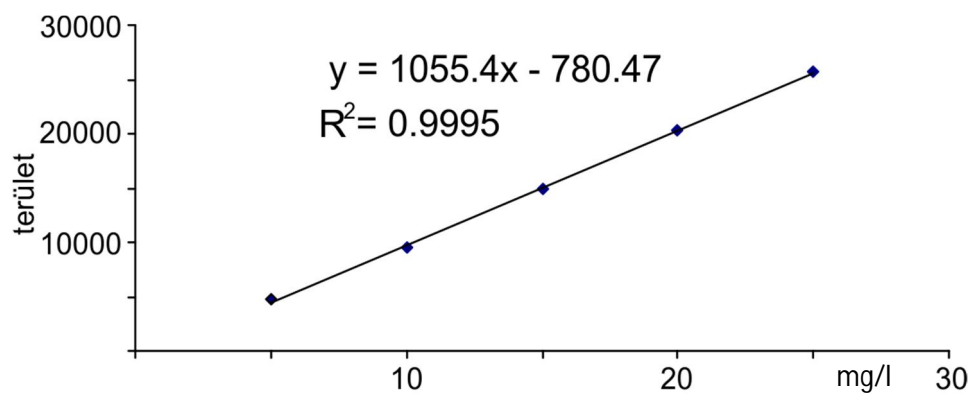


**33. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolat alanil-glutamin kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően (forrás: saját szerkesztés)

Az orto-ftálaldehid származékképzési módszert követő mennyiségi meghatározás külső kalibráció meghatározásával történt. A kalibrációt lineáris illesztéssel végeztem, a korreláció értéke ( $R^2$ ) alanil-glutamin esetén 0,9996 értéket adott, azaz a kalibrációs oldatokhoz tartozó koncentráció értékei jól illeszkednek az illesztett egyenesre, a köztük lévő összefüggés lineáris. Az orto-ftálaldehiddel történő származékképzést követő UV/VIS detektálás érzékenysége közel azonos a danzil kloriddal történt származékképzést követően alkalmazott UV/VIS detektáláshoz viszonyítva, emellett a kimutatási határ 17  $\mu\text{g/l}$ -ről 57  $\mu\text{g/l}$ -re emelkedett.



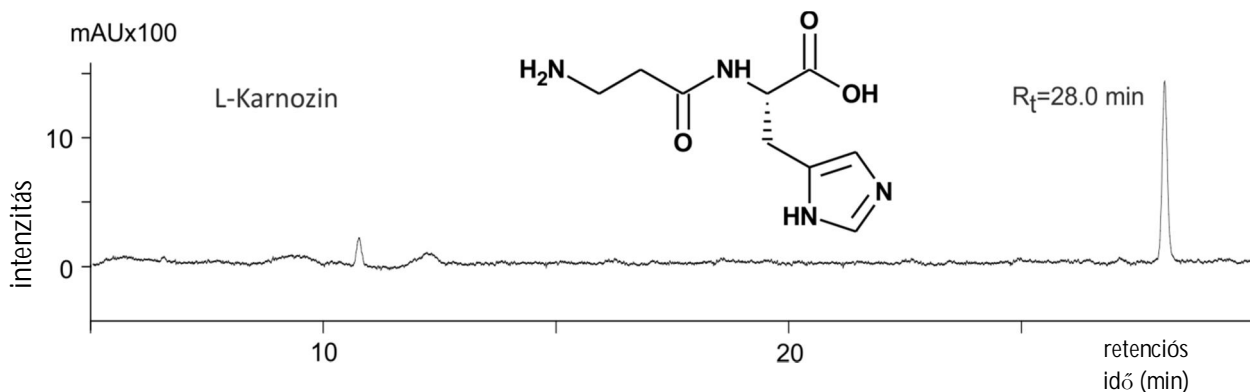
**34. ábra** az Apm UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=27,14 \text{ min.}$  retenció idő esetén (forrás: saját szerkesztés)



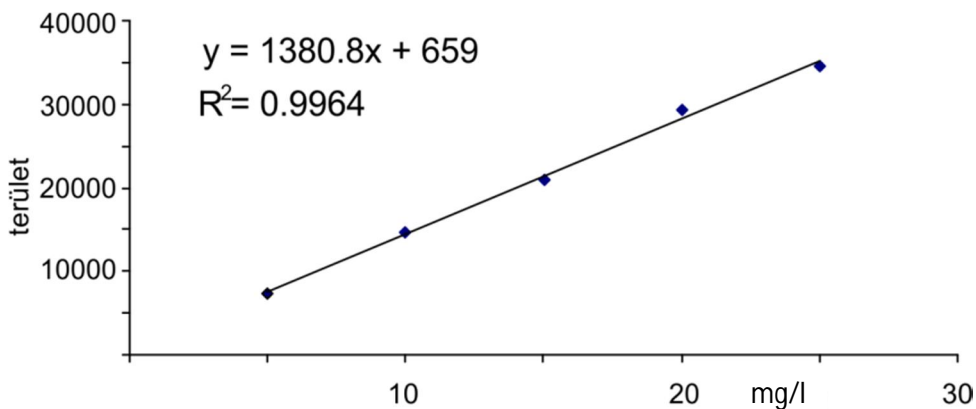
**35. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolat aszpartám kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően (forrás: saját szerkesztés)

Az aszpartám mennyiségi meghatározásához szükséges kalibráció meghatározása során megállapítható, hogy a  $R^2 = 0,9995$ , azaz a kalibrációs oldatokhoz tartozó koncentráció értékei jól illeszkednek az illesztett egyenesre, a köztük lévő összefüggés lineárisnak tekinthető. Az orto-ftálaldehiddel történő származékképzést követő UV/VIS detektálás érzékenysége kis mértékben romlott a danzil kloriddal történt származékképzést követően a kalibrációs egyenesek meredekségét összevetve, azonban a danzil-kloriddal származékolat aszpartám UV/VIS detektálása során kapott kimutatási határ  $160 \mu\text{g/l}$  koncentrációról  $92 \mu\text{g/l}$ -ra csökkent.

Az L-karozin orto-ftálaldehiddel történő származékképzését követő UV/VIS detektálás során megállapítható, hogy a danzil-kloriddal történt származékképzést követően jelentősen romlott a módszer érzékenysége (csökkent a kalibrációs egyenes meredeksége) és a kimutatási határ is emelkedett 16 µg/l-ről 81 µg/l koncentrációra.



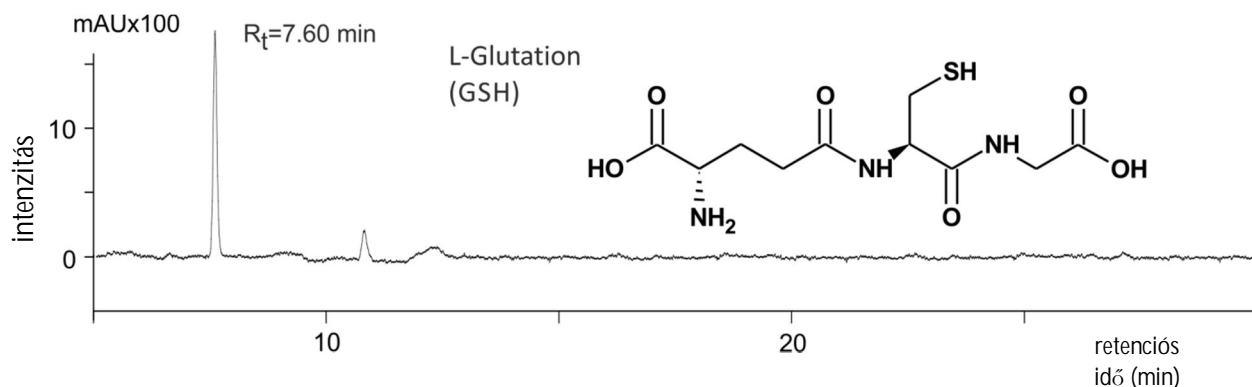
**36. ábra** az L-kar UV/VIS detektálás során kapott kromatográfias jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=28,0$  min. retenció idő esetén (forrás: saját szerkesztés)



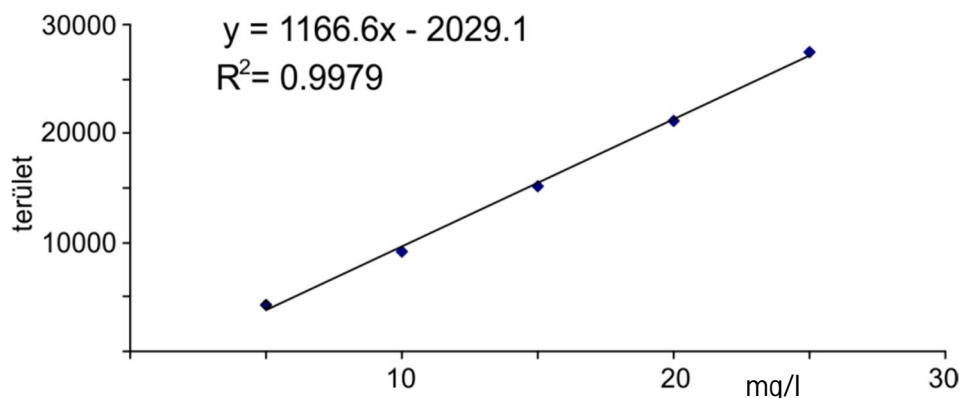
**37. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékkelt L-karozin kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően (forrás: saját szerkesztés)

Összességében megállapítható, hogy az orto-ftálaldehiddel történő származékképzést követő UV/VIS detektálás nem eredményezett javulást a peptidek mennyiségi meghatározása és a kimutatási határ meghatározását figyelembe véve.

A tiol csoportot tartalmazó peptidek OPA származékképzését követő UV/VIS detektálás alapján megállapítható, hogy a retenciós idők értékei alacsonyabbak ( $R_t(\gamma\text{-Glu-Cis})= 5,90 \text{ min.}; R_t(\text{Gsh})= 7,60 \text{ min.}$ ), mint a kénmentes peptidek kromatográfiás meghatározása során tapasztaltam. A két vegyület retenciós ideje egymástól kellő távolságban jelentkezik, alapvonali elválásuk megfelelő, ezáltal mennyiségi meghatározásuk is kellő biztonsággal végrehajtható.



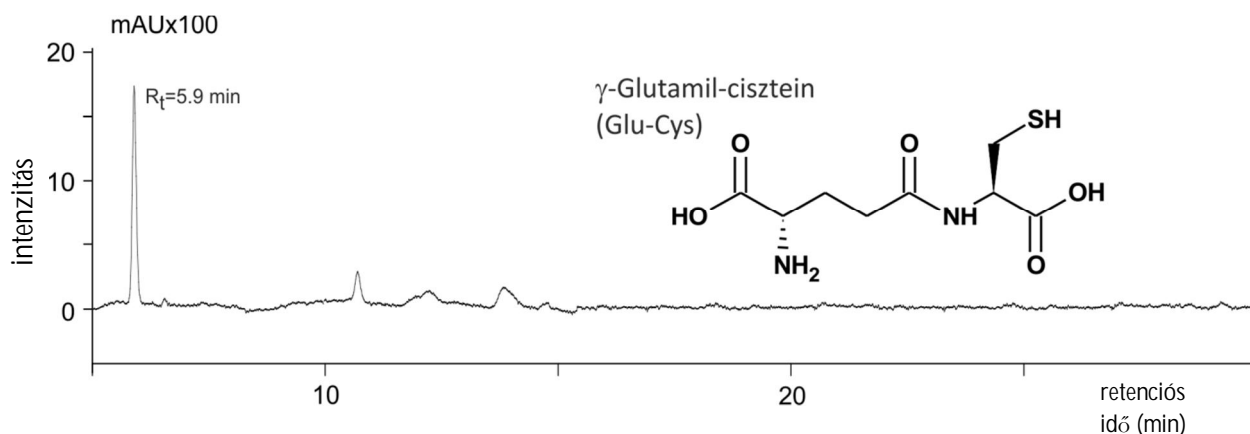
**38. ábra** a Gsh UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=7,60 \text{ min.}$  retenciós idő esetén  
(forrás: saját szerkesztés)



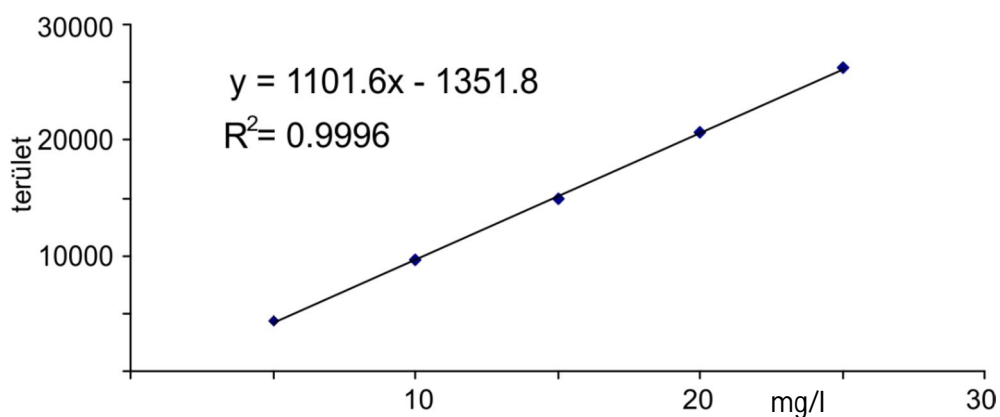
**39. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékkelt L-glutation kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően (forrás: saját szerkesztés)

A glutation orto-ftálaldehiddel történt származékképzését követő mennyiségi meghatározást szintén külső kalibrációs módszer alkalmazásával végeztem. A mérés során kapott  $R^2= 0,9979$  érték alapján megállapítható, hogy a kalibrációs oldatokhoz tartozó koncentráció értékei jól illeszkednek a trendvonalra, a köztük lévő összefüggés lineárisnak tekinthető. Az orto-ftálaldehiddel történő származékképzést követő UV/VIS detektálás érzékenysége azonos nagyságrendet ér el a  $\gamma$ -glutamil-cisztein meghatározása során tapasztalt meredekséggel, a kimutatási határ  $76 \mu\text{g/l}$ .





**40. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein UV/VIS detektálás során kapott kromatográfias jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=5,90$  min. retenciós idő esetén (forrás: saját szerkesztés)

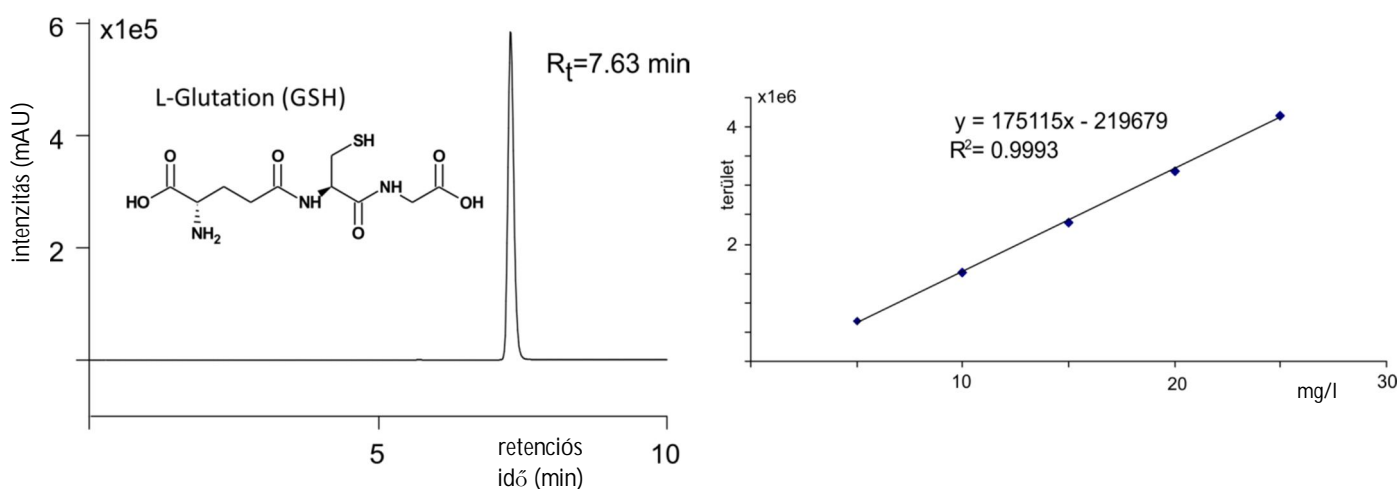


**41. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékkolt  $\gamma$ -glutamil-cisztein kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően (forrás: saját szerkesztés)

A  $\gamma$ -glutamil-cisztein orto-ftálaldehiddel történt származékképzését követő mennyiségi meghatározás során  $R^2 = 0,9979$  értéket határoztam meg. A származékképzést követő UV/VIS detektálás érzékenysége azonos nagyságrendű a glutation meghatározása során tapasztalt meredekséggel, a kimutatási határ  $64 \mu\text{g/l}$ .

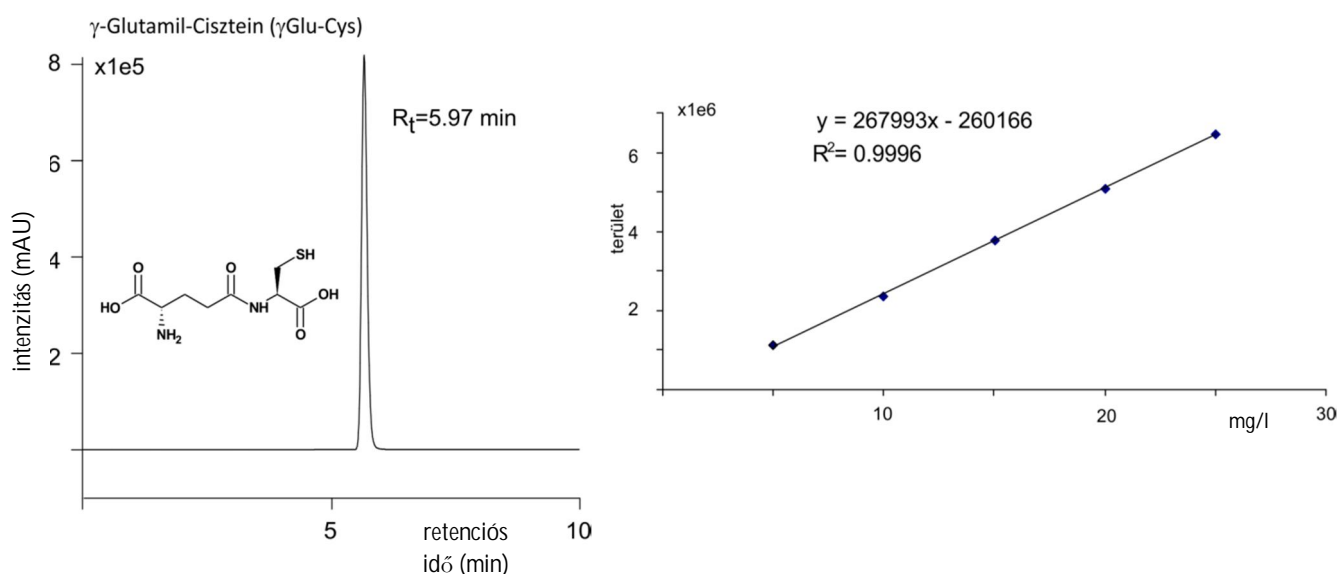
## 5.6.2. Fluoreszcens detektálás (RF) eredményei OPA származékképzést követően

A vizsgált peptidok fluoreszcens detektor (RF) alkalmazásával történő meghatározását a 4.6. fejezetben ismertetett származékképzési módszert követően végeztem el. A kromatográfiás detektálást 340 nm gerjesztési és 455 nm detektálási hullámhosszon hajtottam végre. A két tiol tartalmú peptid esetében megállapítható, hogy az UV/VIS detektáláshoz hasonlóan, alacsony retenciós idővel jelentkeztek a kromatogramban ( $R_{t\text{-Glu-Cis}} = 5,97$  min.;  $R_{t\text{Gsh}} = 7,63$  min.). A kromatográfiás jelek alakja megfelelő, elválásuk alapvonalon történik, mennyiségi meghatározásuk kellő biztonsággal megvalósítható az alkalmazott módszer alapján. A tiol tartalmú peptidok esetében a fluoreszcens detektálással történő mennyiségi meghatározás (OPA származékképzést követően) során 25 mg/l maximális koncentrációval rendelkező kalibrációs oldatokhoz tartozó kromatogramok terület alapú integrálásával kapott értékekre egyenes illesztéssel határoztam meg a linearitási tartományt. A linearitás megfelelő a felvett kalibrációs tartományban, az  $R^2$  értéke 1-hez közelítő érték, L-glutation esetén  $R^2 = 0,9959$ ;  $\gamma$ -glutamil-cisztein esetén pedig  $R^2 = 0,9993$ .



**42. ábra** az L-glutation fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftáldaldehyddel történt származékképzést követően  $R_t = 7,63$  min. retenciós idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe (forrás: saját szerkesztés)

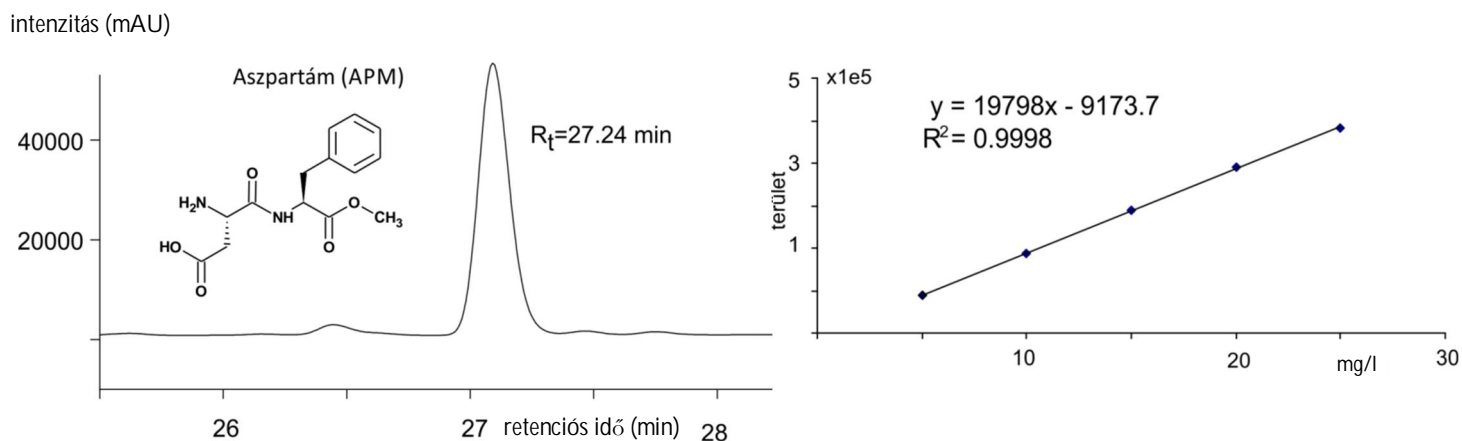
A kromatogram kiértékelése során kapott relatív retenciós idő értéke a kapcsolt detektálási rendszerből adódóan eltolódik az UV/VIS detektálás tapasztalt retenciós értékhez viszonyítva ( $\Delta R_t = 0,03$  min.). A kromatográfiás vizsgálat alapján megállapítható, hogy a vizsgált vegyület mennyiségi meghatározása kellő biztonsággal végrehajtható. A számított kimutatási határ  $2,1 \mu\text{g/l}$ , mely jelentős javulás az UV/VIS detektálás során kapott  $76 \mu\text{g/l}$  értékhez viszonyítva.



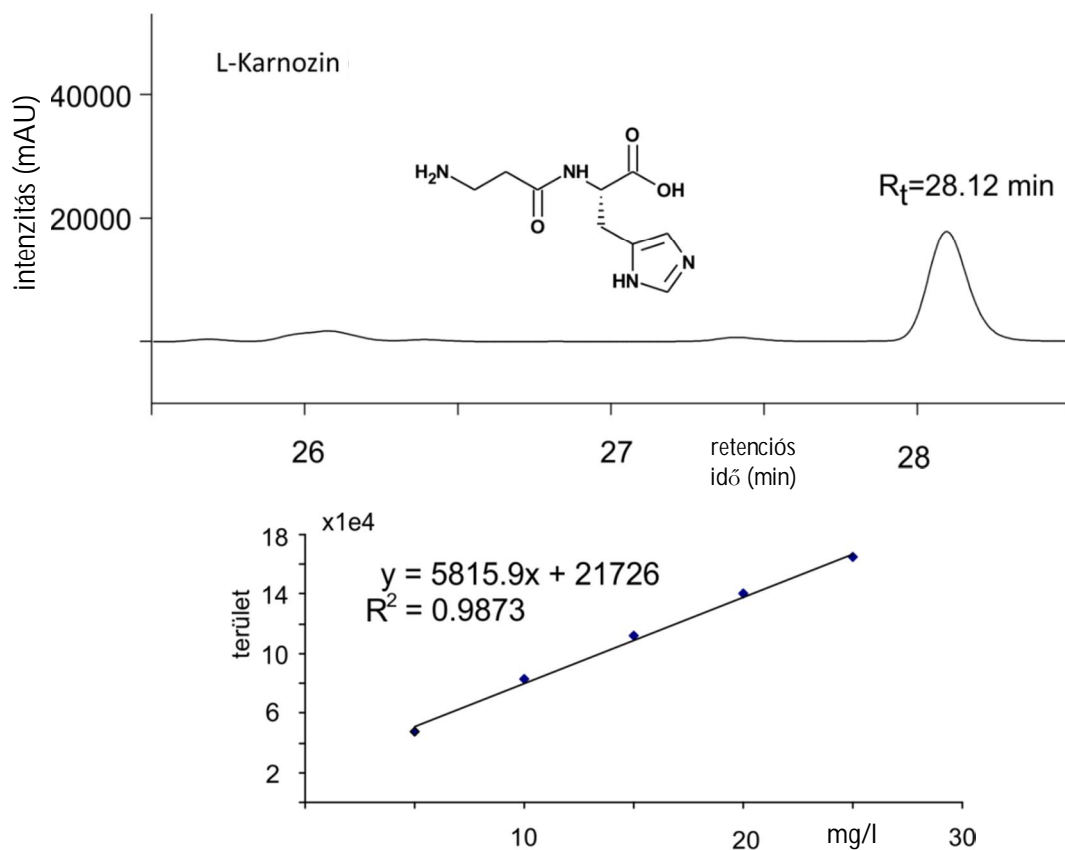
**43. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfias jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=5,97$  min. retenciósi idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe (forrás: saját szerkesztés)

A  $\gamma$ -glutamil-cisztein orto-ftálaldehiddel történt származékképzését követő fluoreszcens detektálás eredményének kiértékelését követően megállapítható, hogy a vizsgált peptid mennyiségi meghatározása számára a kidolgozott módszer megfelelő, az UV/VIS detektálás során a kimutatási határ értékét  $64 \mu\text{g/l}$ -ről  $1,3 \mu\text{g/l}$  koncentrációban állapítottam meg.

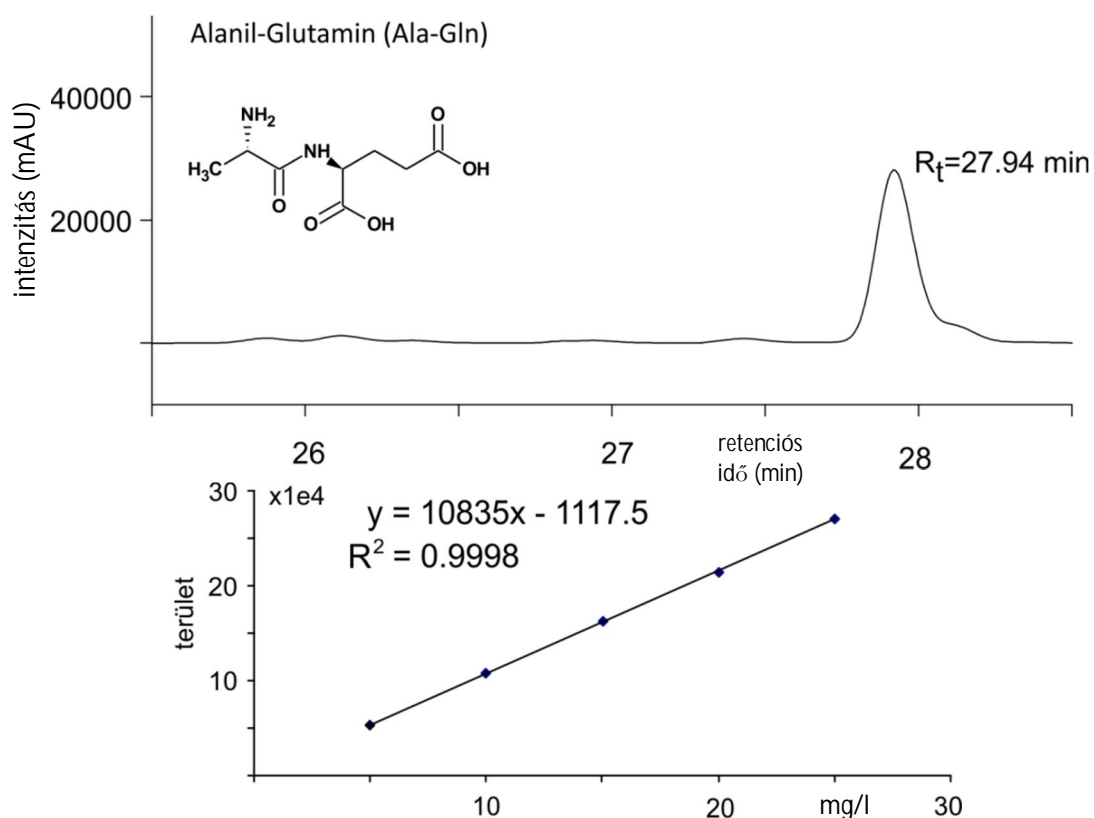
A kénmentes peptidok fluoreszcens detektálása során kapott kromatogramok kiértékelése alapján megállapítható, hogy a retenciósi idők közelsége nem teszi alkalmassá mennyiségi meghatározásukat az OPA származékképzést követően. A kapcsolt rendszerben történő detektálás alapján kapott, az adott peptidhez tartozó relatív retenciósi idők az UV/VIS detektálásnál tapasztalt retenciósi időket követően, mintegy  $0,1$  min. detektálási idő eltolódással jelentkeztek.



**44. ábra** az aszpartám fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiai jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t = 27,24$  min. retenció idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe (forrás: saját szerkesztés)



**45. ábra** az L-karnozin fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiai jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t = 28,12$  min. retenció idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe (forrás: saját szerkesztés)



**46. ábra** az alanil-glutamin fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiai jele és szerkezeti képlete orto-ftáaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t = 27,94$  min. retenció idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe (forrás: saját szerkesztés)

A mennyiségi meghatározás alapján az orto-ftáaldehiddel történő származékképzést követő meghatározás során a módszer érzékenysége mindhárom esetben javult fluoreszcens detektálást követően a DAD detektálási módnál tapasztalt értékekhez viszonyítva. A módszer kimutatási határa az aszpartám esetében  $92 \mu\text{g/l}$  -ről  $22 \mu\text{g/l}$  -re, az alanil-glutamin vizsgálata során  $56 \mu\text{g/l}$  -ről  $42 \mu\text{g/l}$  -re, míg az L-karnozin esetében  $81 \mu\text{g/l}$  -ről  $55 \mu\text{g/l}$  mennyiségben került megállapításra. A tapasztalt retenció idők közelsége alapján azonban a mennyiségi meghatározás számára a danzil-kloroddal történő származékképzési eljárást követő UV/VIS detektálás alkalmazása javasolt a tiol csoportot nem tartalmazó peptidok vizsgálata során.

A reális minták peptid tartalmának meghatározását megelőzően a kifejlesztett analitikai módszerek főbb paramétereit is összefoglaltam és értékeltem, melyek az 1. táblázatban kerülnek bemutatásra. Az adott módszernek megfelelően a módszerek linearitása hasonló koncentráció tartományba esik, a danzil-kloriddal történt származékképzést követő DAD detektálás alkalmazásával 1-10 mg/l közötti koncentrációban, míg az OPA származékképzést követő fluoreszcens detektálás alkalmazásával 5-25 mg/l közötti koncentrációban állapítottam meg a linearitási tartományt.

A kimutatási határok tekintetében megállapítható, hogy a danzil-kloriddal történő származékképzést követő diódasoros detektálás alkalmazásakor az aszpartám esetében 160 µg/l, azonban a másik két, tiol csoportot nem tartalmazó vegyület esetében 16 µg/l és 17 µg/l értékeket állapítottam meg. Az orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően a tiol funkciós csoportot tartalmazó peptidek kimutatási határát 1,3 µg/l és 2,1 µg/l koncentrációban állapítottam meg.

A visszamérés hatékonyságát, ismert koncentrációjú standard oldatokon végeztem el az adott módszernek megfelelően. Az eredmények kiértékelése alapján megállapítható, hogy módszertől függetlenül 90%, vagy azt meghaladó visszamérési hatásfokot értem el az adott peptid standard oldat mennyiségi meghatározása során. A legalacsonyabb (90%) értéket az aszpartám esetében állapítottam meg, azonban a 90%-ot meghaladó hatásfok elfogadhatónak mondható az analitikai mérések során.

**1. táblázat** a kifejlesztett kromatográfiai módszerek kimutatási határa, linearitási tartománya és visszamérési hatékonysága. (forrás: saját szerkesztés)

	<b>kimutatási határ (µg/l)</b>	<b>linearitási tartomány (mg/l)</b>	<b>visszamérési hatékonyság (%)</b>
Apm*	160	1-10	90
Ala-Gln*	17	1-10	98
L-Kar*	16	1-10	94
Gsh**	2,1	5-25	93
γ-Glu-cis**	1,3	5-25	93

\*: Danzil-kloriddal történt származékképzést követően DAD detektálás alkalmazása.

\*\* : OPA származékképzést követően RF detektálás alkalmazása.

## **5.7. Peptidek stabilitásának vizsgálata környezeti paraméterek függvényében**

A környezeti paraméterek hatásainak vizsgálati eredményei és vizsgálatokból levonható következtetések külön alfejezetben kerülnek ismertetésre a tiol csoportot nem tartalmazó és a kéntartalmú peptidek esetében, részben a kromatográfiás meghatározási módszer, részben az eltérő stabilitási paraméterek alapján.

### **5.7.1. Tiol csoportot nem tartalmazó peptidek stabilitási viszonyai a környezeti hatások függvényében**

Savas közegben (pH=4) az L-karnozin megfelelő stabilitást mutatott, 30 nap után a bemért minta mennyiségének 87,2%-át lehetett visszamérni. Az aszpartám esetén már a 12. napon vett minta esetén csak 19,4%-os szintet mértem, a kísérlet indítása után három nappal is markáns koncentráció csökkenést tapasztaltam, melynek mértéke megközelíti a 60% értéket. Az alanil-glutamin mennyisége a hosszú távú stabilitás vizsgálat során megközelítően 57%-on stabilizálódott (pH=4). A semleges pH-n végzett kísérletek során jelentős csökkenést mutatott az alanil-glutamin, 30 nap után 13,1%-ot lehetett visszamérni. Az Apm mennyisége három nap után 4,4%-ra csökkent és további csökkenés volt tapasztalható az 1%-os szint eléréséig. Az L-karnozin mennyisége semleges pH-n a 75%-os szintig csökkent a hosszú távú eltarthatósági vizsgálat alatt. A bázikus pH-n történt vizsgálatok alatt az alanil-glutamin mennyisége folyamatosan csökkent, 30 nap után 6,4%-os mennyiséget lehetett kimutatni. Az aszpartám mennyisége bázikus közegben drasztikusan csökkent, harminc nap után a bemért mennyiség 0,4%-át lehetett kimutatni. Az L-karnozin mennyisége bázikus közegben mintegy 64%-os szintet mutatott harminc nap után a kiindulási mennyiséghez képest.

Oxidáló közegben az Ala-Gln mennyisége folyamatosan csökken, harminc nap után 10%-os szintet detektáltam. Az oxidáló közeg az aszpartám mennyiségére is jelentős hatást gyakorol, mivel három nap után 6,1%-os mennyiséget határoztam meg, ami 1,3%-ra csökken harminc nap alatt a kezdeti koncentrációhoz viszonyítva. Az L-karnozin az oxidáló közegben nem mutat jelentős bomlást, szintje harminc nap alatt folyamatosan 90% körül állapítható meg. Oxigénhiányos közegben (levegőtől paraffin olajjal elzárt rendszer) az alanil-glutamin mennyisége folyamatosan csökken, harminc nap alatt csökken 24,2%-os szintre. Az oxigéntől elzárt környezetben az aszpartám rövid távú bomlása jelentős, a három napos tárolás után mutatott 5,9%-os szintről 1,1%-ra csökkent harminc nap alatt az eredeti koncentrációhoz képest. Az L-karnozin mennyisége folyamatosan csökken 96,1%-ról (3 nap) 0,1%-ra (30 nap).

Fény hatására az alanil-glutamin mennyisége folyamatosan csökken és 25,6%-os szintet mutat harminc nap után, míg az aszpartám mennyisége a harminc napos tárolási kísérlet végére 1,4%-ra csökken. Az L-karnozin mutatja a legnagyobb stabilitást, 47,8%-os szintet mutat a tárolási kísérlet végére. A sötétben végrehajtott tárolási kísérletben az Ala-Gln mennyisége folyamatosan csökken 24,1% koncentrációra. Az aszpartám bomlékonysága a sötétben tárolás esetén is megmutatkozik, mennyisége 1,5%-os a harminc nap végére. Az L-karnozin az alanil-glutaminhoz hasonló tendenciát mutat, a kísérlet végére 17,8%-os szintet ér el.

A -18 °C -os tárolás esetén látható a legnagyobb stabilitás mindhárom vegyület esetén, a harminc nap végére az alanil-glutamin mennyisége 89,1%, az aszpartám 83,1%, az L-karnozin 86,3%-os visszamért mennyiséget mutat. A +4 °C -os tárolási kísérletben visszamért anyagmennyiség az alanil-glutamin esetén 88,9%, az L-karnozin esetén 91,2%, az aszpartám esetén azonban jelentős mennyiségű bomlás tapasztalható 31,6% visszamért mennyiséggel a kiindulási koncentrációhoz képest. Az alanil-glutamin és az L-karnozin esetén megállapítható, hogy a hűtve tárolás és a fagyasztva tárolás hatására bekövetkező koncentráció különbség nem jelentős, a vegyületek bomlása kis mértékű hőelvonásos tárolás során. A +30 °C -on tárolt minták esetén az Ala-Gln mennyisége 19,5%-ra csökkent harminc nap alatt, az aszpartám jelentős bomlás után az eredeti mennyiséghez képest 1,5%-os szintet mutat. Magas hőmérsékleten a legnagyobb stabilitást az L-Kar mutatja a kiindulási mennyiséghez képest 50,6%-os visszamért mennyiséggel 30 napot követően.

**2. táblázat** kénmentes peptidok stabilitási viszonyai környezeti paraméterek függvényében, a peptidok visszamért mennyisége és a mérésekhez tartozó szórás értékek százalékban kerültek megadásra (mintaszám=90, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

	ALANIL-GLUTAMIN TARTALOM (% a kiindulási mennyiségekhez viszonyítva)			ASZPARTÁM TARTALOM (% a kiindulási mennyiségekhez viszonyítva)			L-KARNOZIN TARTALOM (% a kiindulási mennyiségekhez viszonyítva)		
	3 nap	12 nap	30 nap	3 nap	12 nap	30 nap	3 nap	12 nap	30 nap
pH=4	77,5±0,3	58,6±0,2	56,9±0,2	60,0±0,1	19,4±0,4	20,2±0,5	95,0±0,3	92,9±0,4	87,2±0,3
pH=7	88,5±0,3	56,4±0,2	13,1±0,3	4,4±0,9	1,1±1,5	1,0±1,8	99,8±0,2	77,9±0,5	74,0±0,3
pH=10	91,7±0,2	60,9±0,3	6,4±1,3	1,6±1,3	0,4±3,3	0,4±1,8	99,1±0,4	63,8±0,3	63,5±0,5
oxid.	91,9±0,2	24,4±0,4	10,0±0,9	6,1±0,8	1,1±1,8	1,3±1,0	90,9±0,5	89,8±0,4	89,6±0,1
reduk.	90,7±0,3	53,2±0,4	24,2±0,6	5,9±0,8	1,0±2,0	1,1±1,4	96,1±0,3	18,9±0,5	0,1±1,1
fény	89,9±0,1	49,0±0,3	25,6±0,8	5,8±1,2	1,3±1,8	1,4±1,2	95,0±0,5	49,0±0,6	47,8±0,5
sötét	90,2±0,2	55,8±0,2	24,1±0,6	6,7±1,3	1,5±0,8	1,5±0,8	94,8±0,3	32,4±0,4	17,7±0,3
(-)18 °C	98,6±0,2	92,2±0,3	89,1±0,3	98,3±0,3	83,0±0,2	83,1±0,4	90,4±0,4	88,2±0,6	86,3±0,1
(+)4 °C	97,9±0,2	92,8±0,2	88,9±0,2	79,2±0,2	31,3±0,4	31,6±0,8	98,0±0,8	93,7±0,3	91,2±0,2
(+)30 °C	87,5±0,3	48,0±0,2	19,5±0,3	4,9±1,5	1,5±1,1	1,5±1,1	88,5±0,5	52,2±0,4	50,6±0,3



### 5.7.2. Tiol csoportot tartalmazó peptidek stabilitási viszonyai a környezeti hatások függvényében

A közeg kémhatása jelentős befolyással van a tiol csoportot tartalmazó peptidek stabilitási viszonyaira. Savas közegben (pH=4) az L-glutation nagyobb stabilitást mutatott, 12 nap után a bemért minta 43,3%-át lehetett visszamérni, mely 30 nap elteltével csak alig több, mint 7% volt visszamérhető a kiindulási mennyiséghez viszonyítva. A savas közegben a  $\gamma$ -glutamil-cisztein bomlása kevésbé intenzív, azonban ez esetben már a 12 nap tárolást követően vett minta esetén 27,5%-os szintet mértem, a kísérlet indítása után három nappal is jelentős csökkenést tapasztaltam, melynek mértéke mintegy 60%. A  $\gamma$ -glutamil-cisztein savas kémhatáson lezajlott vizsgálata során 30 nap elteltével a visszaméréseket követően 80%-ot meghaladó mennyiségi csökkenést tapasztaltam. A semleges kémhatáson (pH=7) végzett kísérletek során mindkét vegyület erős degradációs hajlamot mutatott. Az L-glutation 3 nap elteltével 10% alatti, míg a  $\gamma$ -glutamil-cisztein 2,2%-os mennyiségben volt jelen a kiindulási értékhez viszonyítva. A 12 napos tárolást követő mintavételkor a  $\gamma$ -Glu-Cis még 0,5% mennyiségben volt kimutatható, mely 30 napra már a detektálható szint alá került, hasonlóan a Gsh-hoz, ahol mindezt már a 12 napos tárolást követően megállapítható. A bázikus kémhatáson (pH=10) történt vizsgálatok alatt a két peptid koncentrációja drasztikusan csökkent. Már 3 nap elteltével 20% alatti szintet (Gsh 16,8%;  $\gamma$ -Glu-cis 11,9%) mértem, azonban a bomlás intenzitása csökkent, a harmincadik nap végére még 5% körüli mennyiségben volt jelen a két vegyület.

A közeg redoxi sajátságának a szerepe is jelentősnek mondható az elvégzett vizsgálatok alapján, mely különösen fontos lehet nem megfelelő tárolási körülmények esetén. Az oxidáló közeg erőteljes degradáló hatást fejtett ki a vizsgált vegyületekre. 3 nap elteltével az L-glutation 13,7%, míg a  $\gamma$ -glutamil-cisztein 2,2% mennyisége volt kimutatható a kiindulási mennyiségekhez viszonyítva, mely már 12 napot követően a detektálási határ alatti szintre csökkent. Nem oxidáló közegben az L-glutation 3 napos tárolást követően még 21,8%-ban volt jelen, szemben a  $\gamma$ -glutamil-cisztein 2,4%-os mennyiségével. 12 napot követően viszont a  $\gamma$ -glutamil-ciszteiből még sikerült minimális mennyiséget kimutatni a kiindulási állapothoz képest (0,3%), azonban az L-glutation már ebben az időben is detektálási határ alatt volt, a kimutatási határ alatti koncentrációig történő teljes lebomlás a későbbiekben mindkét vegyületnél tapasztalható volt. A közvetlen napsugárzásnak kitett minták esetén is jelentős degradációt tudtam kimutatni, mely ugyancsak markáns tényező lehet adott élelmiszer tárolása során. A közvetlen megvilágításnak kitett minták stabilitása meglehetősen csekélynek mutatkozott. Az L-glutation esetén 3 napot követően 9,8%, ugyanezen időpontban vételezett  $\gamma$ -glutamil-cisztein minta vizsgálata csupán 2,1% mennyiséget eredményezett, mely 12 nap elteltével a kimutatási határ alá süllyedt. A

fénytől elzárt tárolás körülményei között végrehajtott kísérletben az L-glutation a 3 napot követően még 20,1% mennyiségben volt detektálható, mely már 12 napot követően a kimutatási határ szintje alá csökkent. A  $\gamma$ -glutamil-cisztein esetén 3 napot követő mintavételekor 2,5% mennyiséget határoztam meg, mely 12 nap után 0,3%-ra csökkent. A további tárolás során ez esetben is a kimutatási határ alatti szintben volt jelen a mintákban.

A tárolási hőmérséklet szintén meghatározó szerepet tölt be a standard vegyületek stabilitási viszonyait tekintve, mely összefüggésben van az élelmiszerekben bekövetkező változásokkal a tárolás során. A -18 °C -os tárolás során (pH=7) az L-glutation esetében látható a legnagyobb stabilitás. 3 nap elteltével a kiindulási mennyiség mintegy harmada visszamérhető (31,7%), mely minimális csökkenést mutatott a továbbiakban, a 12. naptól a 30. napig vizsgált mintákban 26% körüli szinten állandósult a glutation mennyisége. A  $\gamma$ -glutamil-cisztein esetén már 3 nap elteltével jelentős csökkenés volt kimutatható (7,53% maradék mennyiség a kiindulási koncentrációhoz képest), mely 12 napra 3,1%, majd 30 napra 2,3%-os szinten volt detektálható. A +4 °C -os tárolási kísérletben (pH=7) visszamért mennyiség alapján megállapítható, hogy hűtve tárolás során az L-glutation is folyamatosan bomlik, 30 napot követően 0,5% volt jelen a rendszerben. A  $\gamma$ -glutamil-cisztein 3 napot követően már csupán 6,3%-ban volt jelen a kiindulási mennyiséghez képest, 30 napot követően is csupán 1,6%-ot tudtam kimutatni a visszamérések során. A +30 °C -on tárolt minták (pH=7) esetén a degradáció jelentősnek mondható mindkét vegyület tekintetében. Az L-glutation már 3 napot követően 9,0%-ban volt kimutatható, mely 12 nap tárolást követően detektálási szint alá került, míg a  $\gamma$ -glutamil-cisztein mennyisége 3 napot követően 1,6%, majd a 12 napot követően detektálási határ alá került a mintában.

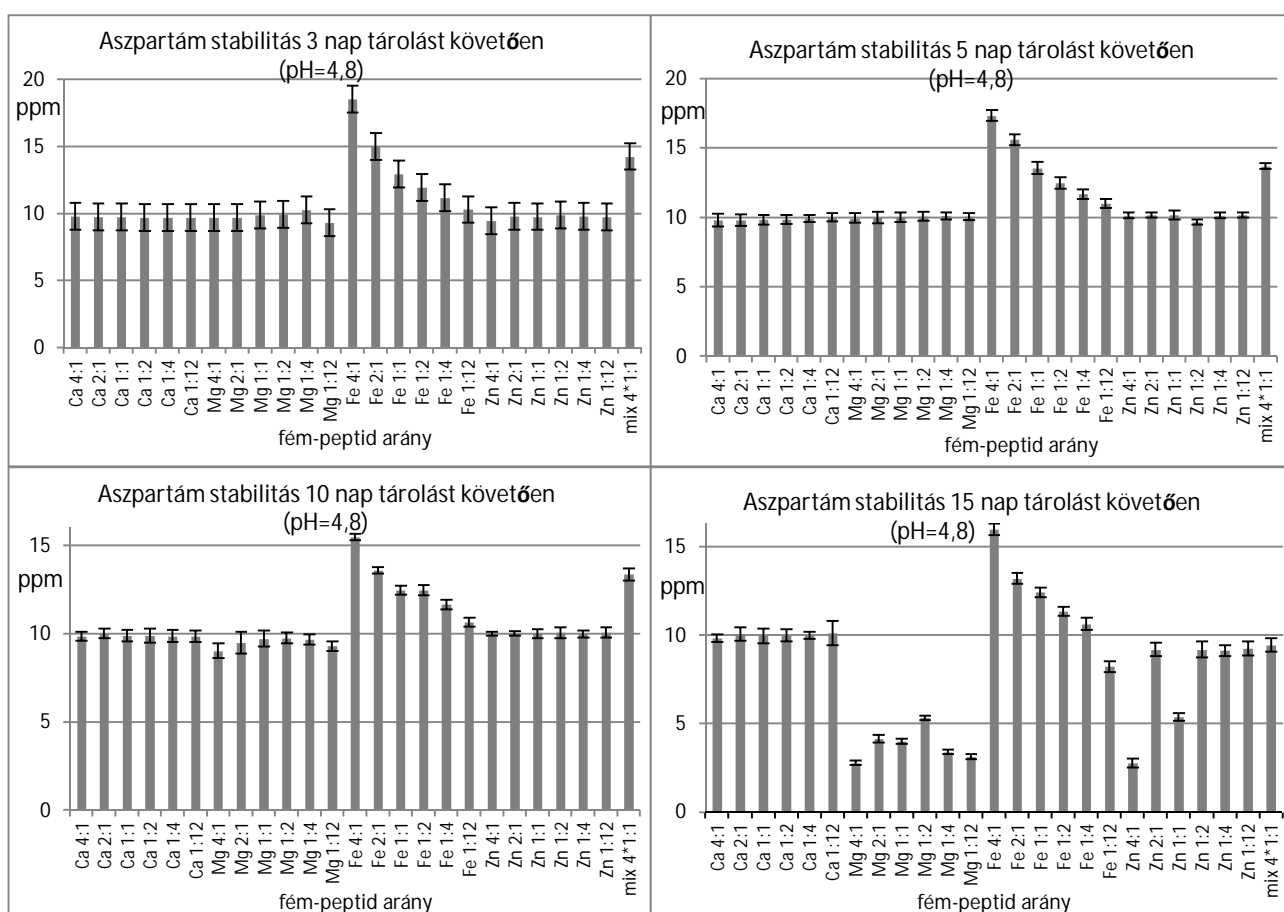
**3. táblázat** tiol tartalmú peptidek stabilitási viszonyai környezeti paraméterek függvényében, a peptidek visszamért mennyisége és a mérésekhez tartozó szórás értékek százalékban kerültek megadásra (mintaszám=60, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

	L-GLUTATION TARTALOM (% a kiindulási mennyiségekhez viszonyítva)			$\gamma$ -GLUTAMIL-CISZTEIN (% a kiindulási mennyiségekhez viszonyítva)		
	3 nap	12 nap	30 nap	3 nap	12 nap	30 nap
pH=4	76,5±0,2	43,3±0,4	7,4±0,8	39,9±0,6	27,5±0,6	16,0±1,0
pH=7	9,8±0,8	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>	2,2±1,1	0,5±0,9	<D <sub>L</sub>
pH=10	16,8±0,4	1,2±1,4	1,4±1,3	11,9±0,6	5,2±0,8	8,7±1,1
oxid.	13,7±0,6	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>	2,2±1,3	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>
reduk.	21,8±0,9	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>	2,4±1,1	0,3±1,2	<D <sub>L</sub>
fény	9,8±1,1	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>	2,1±1,3	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>
sötét	20,1±1,5	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>	2,5±1,5	0,3±1,1	<D <sub>L</sub>
(-)18 °C	31,7±1,7	26,1±0,5	26,2±0,8	7,5±1,1	3,1±1,3	2,3±1,2
(+)4 °C	31,8±0,5	14,0±0,7	0,5±1,3	6,3±1,2	3,3±1,3	1,6±1,3
(+)30 °C	9,0±0,9	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>	1,6±1,0	<D <sub>L</sub>	<D <sub>L</sub>

<D<sub>L</sub>: kimutatási határ alatti mennyiség (D<sub>L,Gsh</sub> = 2,1 µg/kg; D<sub>L, $\gamma$ -glu-cis</sub> = 1,3 µg/kg)

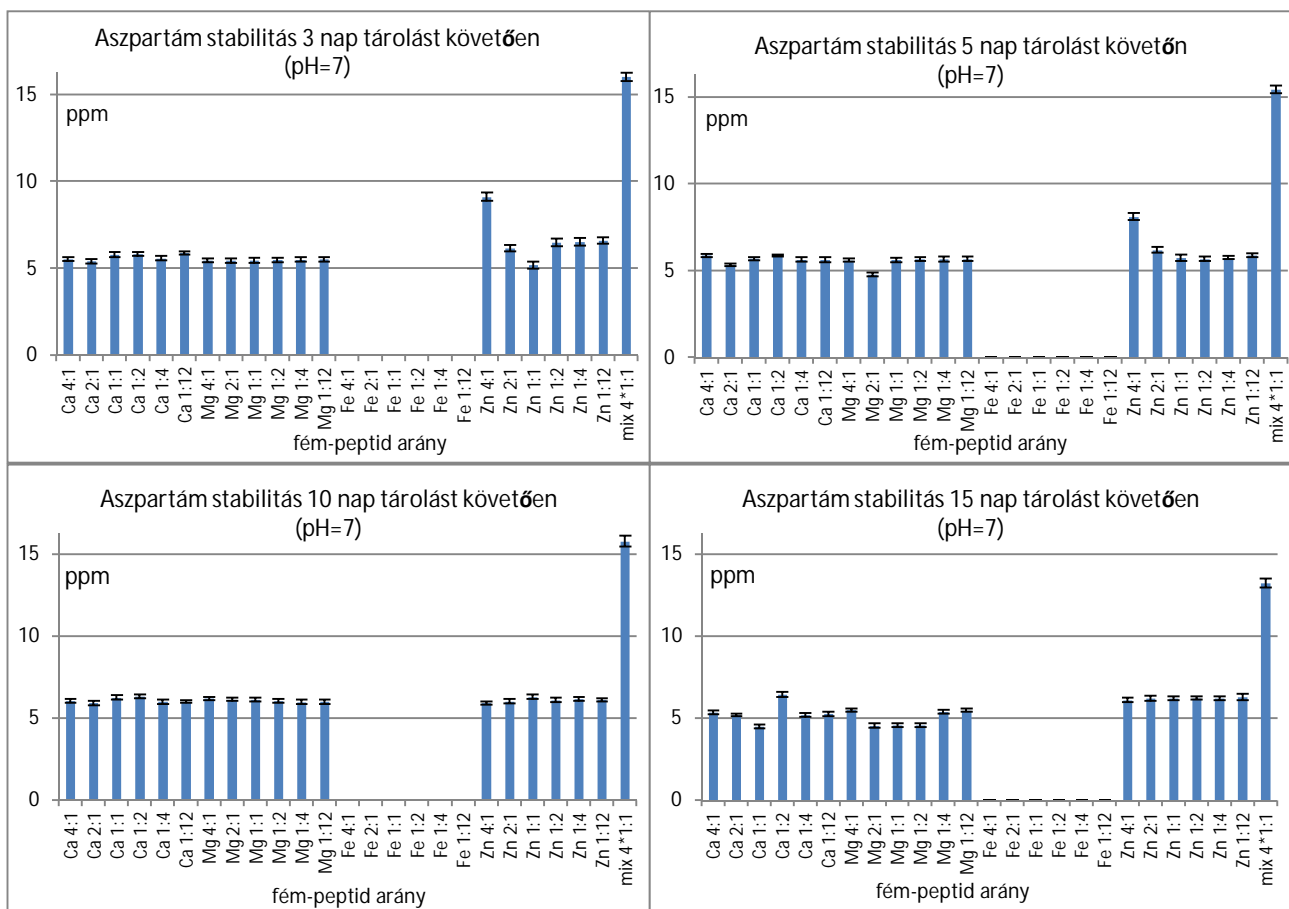
## 5.8. Komplexképző fémek stabilizáló hatásának vizsgálati eredményei és értékelésük

A kutatott peptidok stabilitásának növekedését célzó vizsgálatok során megállapítható, hogy az aszpartám enyhén savas kémhatással rendelkező közegben jelentős bomlást szenved a kiindulási koncentrációhoz (20 mg/l) viszonyítva. A stabilitási kísérlet során a peptid kiindulási mennyisége három nap elteltével a felére csökken (47. ábra), kivételt képez ez alól a vas-peptid komplex alkalmazása, mely a magasabb (4:1) arányú vastartalom esetén megközelíti a kiindulási koncentrációt és a 15 nap elteltével sem csökken 15 mg/l koncentráció alá. A kísérlet során jelentős stabilitást sikerült elérni az aszpartám stabilitásának tekintetében a 4 fém együttes alkalmazásával, ez esetben a kezdeti koncentrációról 9,44 mg/l-re csökkent az aszpartám mennyisége 15 napot követően. A többi fém és ezek eltérő arányú keveréke nem bír gátló hatással az aszpartám degradációját vizsgálva.



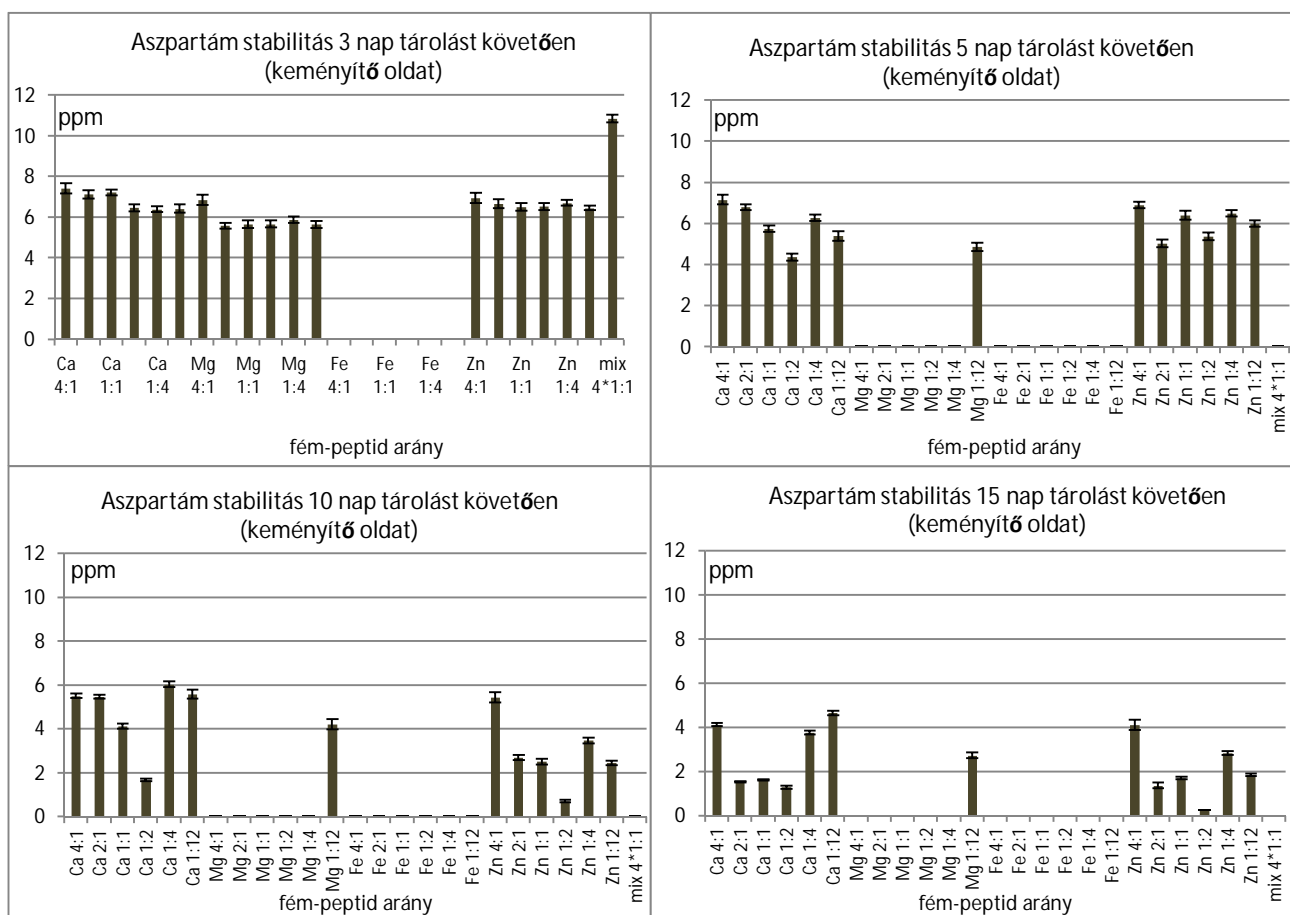
47. ábra az aszpartám stabilitási viszonyai savas közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett. (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

Jelentősebb különbség figyelhető meg semleges kémhatáson elvégzett kísérletek során (48. ábra). A kiindulási 20 mg/l koncentrációból maximum 6 mg/l, vagy az alatti koncentrációban maradt az aszpartám a vizsgálati mintákban. Kivételt képez ez alól a legnagyobb mennyiségű (4:1 arány) cinket tartalmazó oldat, mely esetén három nap tárolási időt követően 9,6 mg/l koncentráció került megállapításra, mely a 15 nap tárolási kísérlet végére 6 mg/l körüli mennyiségre csökkent. A kísérletek alapján megállapítható, hogy az alkalmazott fém komplexek stabilizáló hatásának leghatékonyabb módja a 4 fém együttes (1:1 arány) alkalmazása. A semleges kémhatáson alkalmazott négy fémvegyület együttes hatásaként a 3 nap tárolást követően 16 mg/l mennyiséget, a tárolási kísérlet végére kevéssel 13 mg/l feletti koncentrációt állapítottam meg. A többi alkalmazott komplexképző vegyület esetében az aszpartám kiindulási mennyiségek kismértékű csökkenését tapasztaltam. A vas stabilizáló hatásának meghatározására elvégzett kísérletek esetében kapott eredmények nem értelmezhetőek, valószínűleg a vas olyan folyamatokban (redox vagy hidrolitikus) vesz részt, mely az adott mérési hullámhosszon nem teszi lehetővé a koncentráció meghatározását.



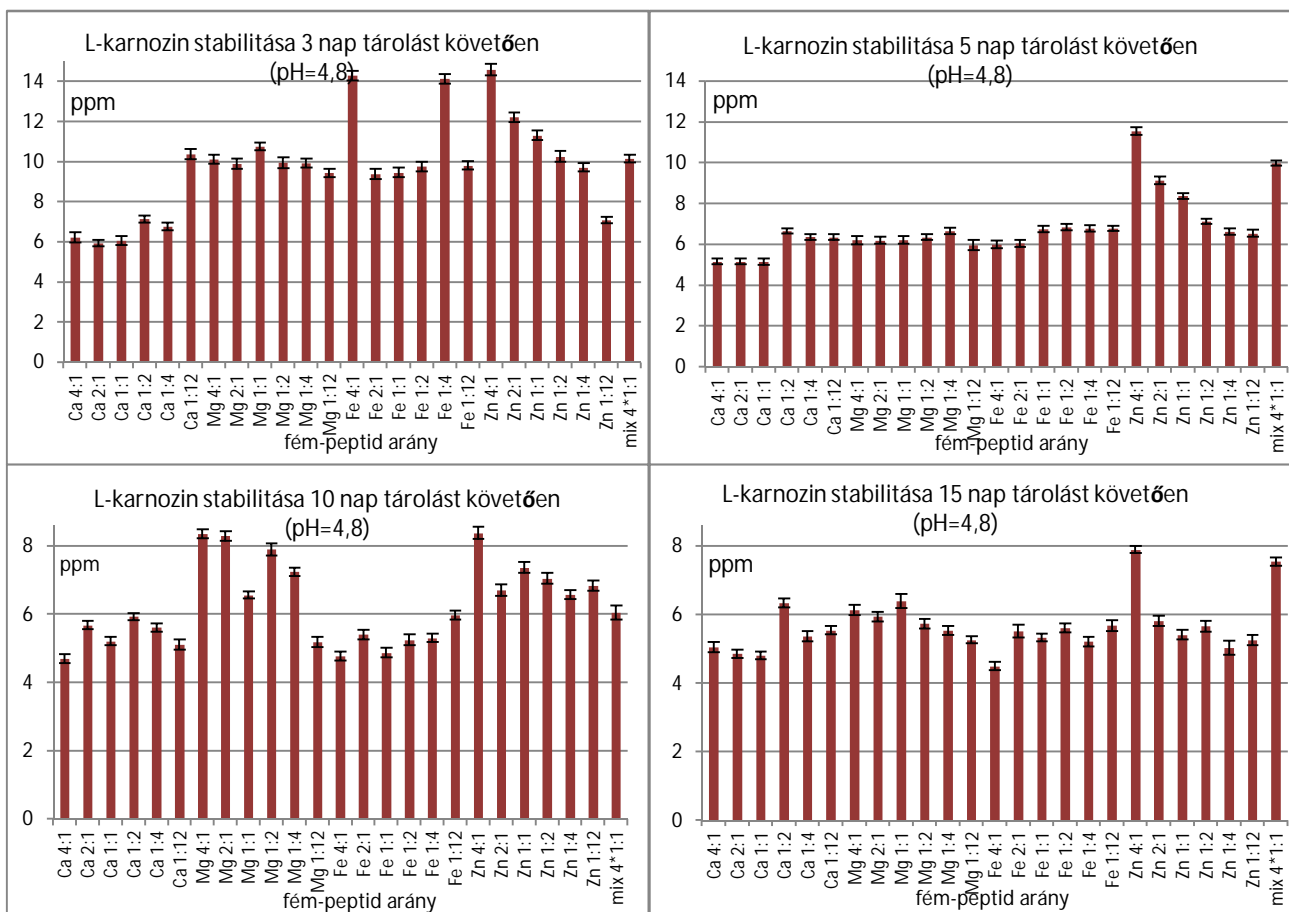
**48. ábra** az aszpartám stabilitási viszonyai semleges közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

Az aszpartám keményítő oldatban történt tárolási és stabilitási vizsgálatok kiértékelése során megállapítottam, hogy a szénhidrátok jelenléte jelentősen rontja az alkalmazott fémek stabilizáló hatását. A tárolási kísérlet során meghatározott kiindulási koncentrációk a keményítőt tartalmazó közegben csökkentek a legnagyobb mértékben (49. ábra), a legtöbb esetben már 3 napot követően 8 mg/l alatti koncentrációban lehetett meghatározni a peptidok mennyiségét. A vas felhasználásával elvégzett stabilitási kísérlet a semleges kémhatáson elvégzett kísérlethez hasonlóan nem adott értékelhető eredményt. Öt nap tárolást követően a magnézium stabilizáló hatása is megszűnik, kimutatható mennyiségű peptid nem volt jelen az oldatokban a mérések során. Fontos tapasztalat, hogy a korábbi kísérletektől eltérően a négy fém együttes alkalmazásakor megfigyelhető stabilizáló hatás három nap tárolási időt követően megszűnik, kimutatható mennyiségű peptid nem található az oldatban öt nap tárolási időt követően.



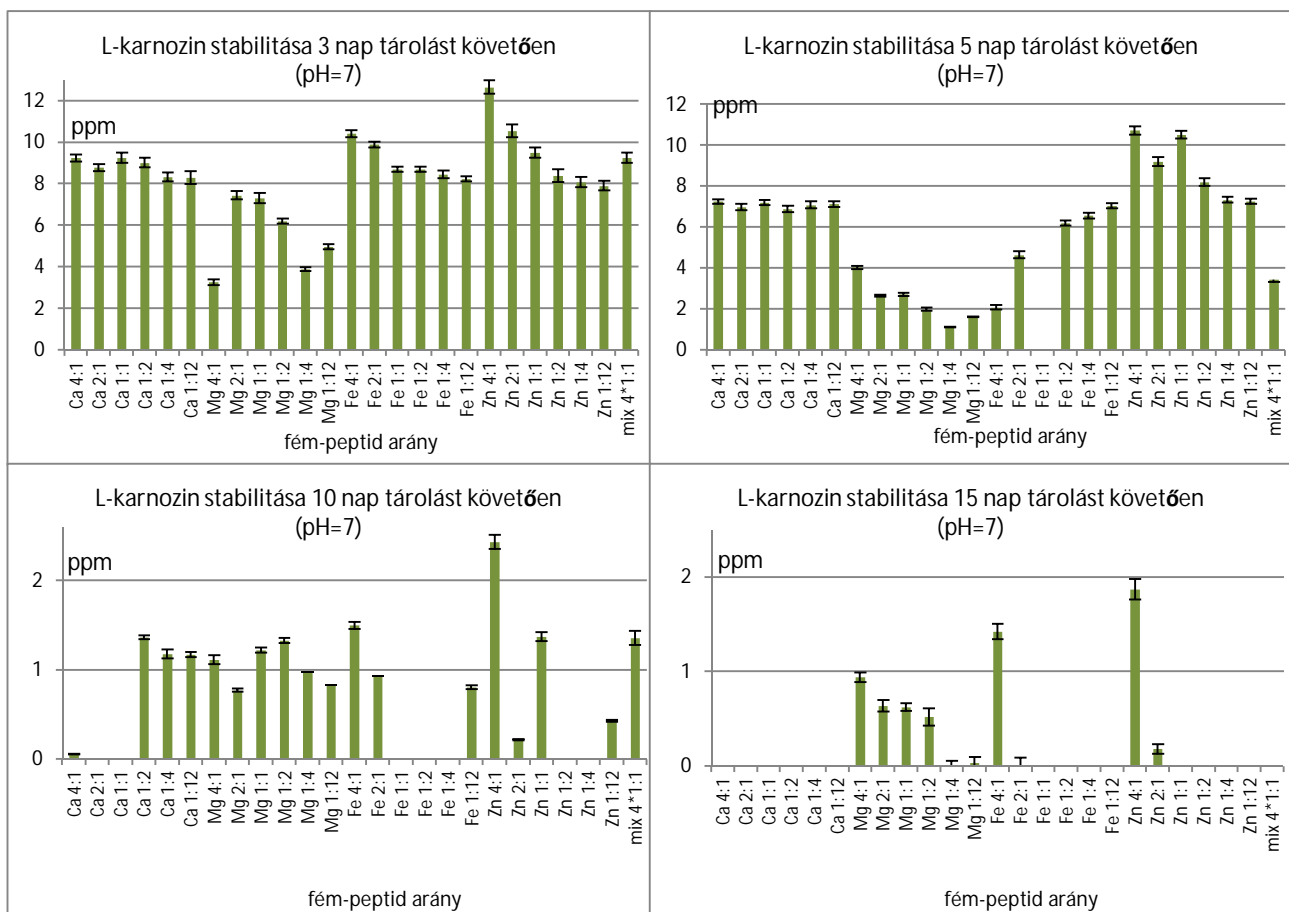
**49. ábra** az aszpartám stabilitási viszonyai keményítő mátrixban, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

Az L-karnozin savanyú kémhatáson történő tárolása során megállapítható, hogy a három nap tárolást követően 15 mg/l körüli mennyiséget mértem vissza vas és cink alkalmazásakor. Három nap tárolást követően (50. ábra) kalcium alkalmazása során már 6 mg/l alá csökkent a peptid mennyisége, mely a stabilizáló fém koncentrációjától függetlenül 4-5 ppm körüli szinten állandósult a tizenötödik nap végére. Magnézium és vas esetén a harmadik tárolási napot követően még 10 mg/l körüli peptid mennyiséget határoztam meg, azonban mindez az ötödik napra már visszaesett 5 mg/l körüli mennyiségre és ott állandósult. Az L-karnozin savas kémhatású közegben végzett tárolása során a magas koncentrációjú (4:1 arány) cink fejtette ki a legjelentősebb stabilizáló hatást. A kiindulási 20 mg/l koncentrációjú peptid mennyisége 15 nap elteltével is 8 mg/l feletti koncentrációt eredményezett. A teljes tárolási időt tekintve ez esetben is a 4 fém együttes alkalmazása adta a legjobb stabilitást, mely esetben a harmadik mintavételi napon 10 mg/l körüli mennyiséget határoztam meg és ezen mennyiség állandósult a 15 napos tárolás során.



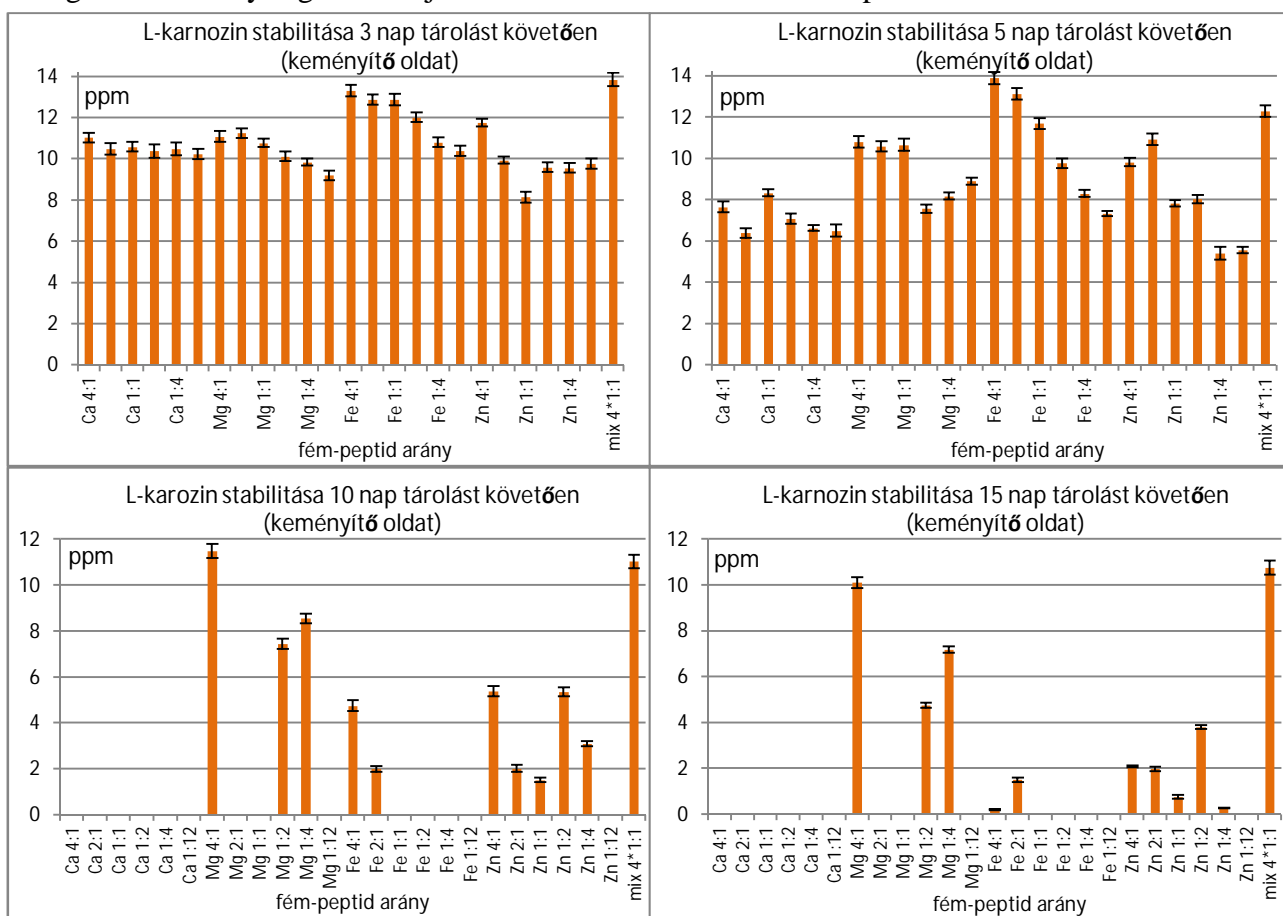
**50. ábra** az L-karnozin stabilitási viszonyai savas közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintasám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

Az L-karnozin semleges kémhatáson végzett stabilitási kísérletei alapján megállapítható, hogy a kiindulási 20 mg/l koncentráció három nap tárolást követően a legtöbb esetben 50%, vagy az alatti mértékre csökkent az alkalmazott stabilizáló fémvegyülettől függetlenül (51. ábra). Öt nap tárolási időt követően a magnézium eredetileg sem jelentős stabilizáló hatása tovább csökkent, mely 15 nap tárolási időt követően 1 mg/l alatti mennyiséget eredményezett az L-karnozin kiindulási mennyiségéhez képest. A karnozin stabilizációra legjobb védő hatást a magas cink koncentrációval (4:1) rendelkező peptid oldat esetén igazoltam. Az 5 napos tárolást követően még 10 mg/l koncentráció felett volt jelen a karnozin az oldatban, azonban 15 nap elteltével a peptid mennyisége 2 mg/l alatti koncentrációban lehetett meghatározni a peptidet. A 15 nap tárolási idő végére a nagy mennyiségű vas-szulfátot (4:1) tartalmazó oldatban 1 mg/l koncentrációt meghaladó karnozin mennyiség volt kimutatható, azaz a nagy mennyiségben jelen lévő vas kismértékű védő hatással bír a karnozin peptid vonatkozásában a többi komplexképző vegyülethez viszonyítva.



**51. ábra** az L-karnozin stabilitási viszonyai semleges közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

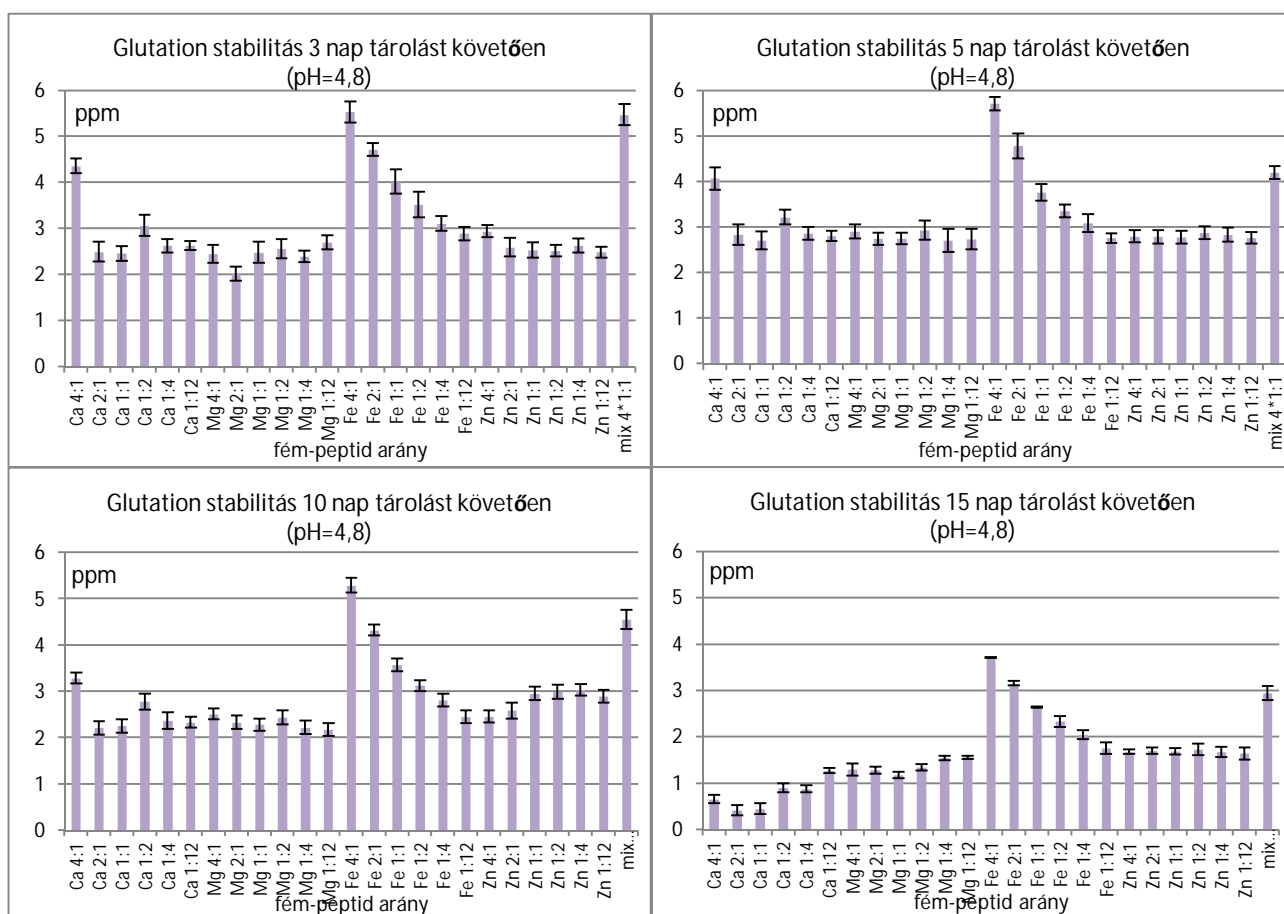
A karnozin keményítő mátrixban történő kísérletei során a stabilitás rövid tárolási idő alatt jelentősen növekedett semleges kémhatáson történő tárolási kísérlethez képest. A tárolás során jelentős stabilitást tudtam megállapítani a cink:peptid és a magnézium:peptid 4:1 arányú mennyiséget tartalmazó oldatokban (52. ábra). Megállapítható, hogy rövid idejű tárolás alatt nem mutatható ki eltérés az alkalmazott fémvegyületek védő hatását tekintve. Három nap tárolást követően a keményítő oldatban lévő peptid mennyisége 10-12 mg/l között volt kimutatható, mely öt nap tárolási idő elteltével több esetben is 6 mg/l koncentráció alá csökkent. Az alkalmazott fémek stabilizáló hatásának eltérése 10 nap tárolási időt követően figyelhető meg, ugyanis 10 nap tárolást követően a nagyobb mennyiségű stabilizáló fémvegyületet tartalmazó oldatokban mutatható ki a karnozin 6 mg/l koncentrációt meghaladó mennyiségben. Az elvégzett kísérlet alapján megállapítható, hogy a magnézium 15 nap tárolási időt követően jelentős szerepet játszik a karnozin peptid stabilitásának kialakulásában, ugyanis 15 nap tárolást követően a négyszeres mennyiségű magnéziumot tartalmazó oldatban 10 mg/l feletti koncentrációban volt jelen a karnozin. A magnéziumhoz hasonló stabilitás állapítható meg a négy komplexképző fém együttes alkalmazásakor. A négy fémvegyület együttes alkalmazásakor 10 mg/l koncentrációt meghaladó mennyiségben volt jelen a karnozin az oldatban 15 nap elteltével.



**52. ábra** az L-karnozin stabilitási viszonyai keményítő mátrixban, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

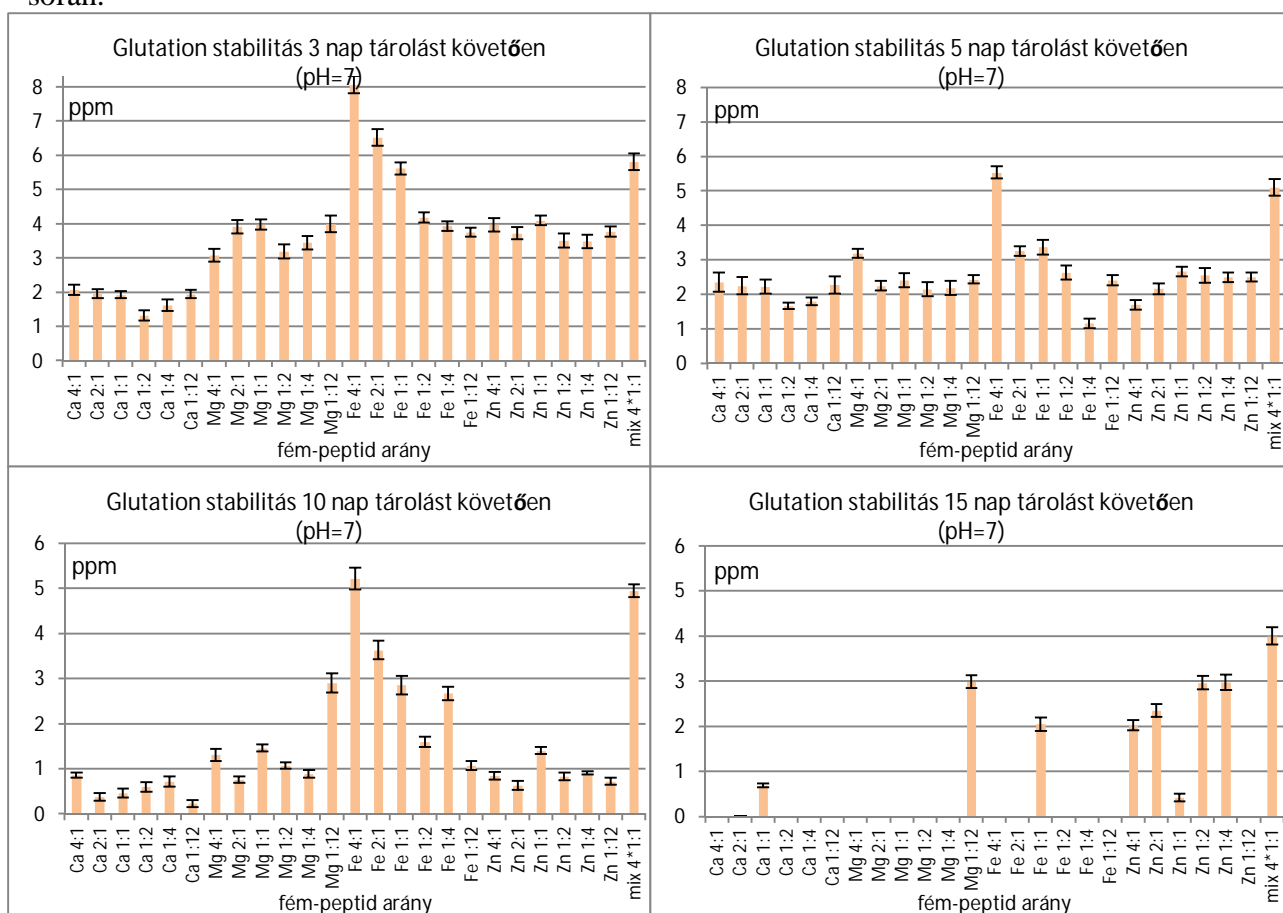


A kén tartalmú L-glutation savanyú kémhatáson történő tárolása során (53. ábra) a peptid előzetesen várt gyenge stabilitási tulajdonságai igazolásra kerültek. A kiindulási 20 mg/l glutation koncentráció három nap tárolási idő elteltével a vizsgált minták közül kettő esetben haladta meg (vas:peptid=4:1 és mix:peptid=4\*1:1) az 5 mg/l koncentrációt. A nagy feleslegben adagolt vas, mint peptid stabilitást növelő vegyület esetében megállapítható, hogy védő hatását hosszabb tárolási idő alatt is kifejti, ugyanis 15 nap tárolási idő elteltével is 4 mg/l mennyiségben van jelen a peptid a vizsgált mintában, mely a legtöbb stabilitást növelő vegyülethez képest jelentős növekedésként figyelhető meg. A négy komplexképző együttes alkalmazásakor (mix:peptid=4\*1:1) hasonló tendenciát lehet megfigyelni a vas:peptid=4:1 mintához viszonyítva, azzal az eltéréssel, hogy a Ca:peptid=4:1 mintában alacsonyabb kiindulási koncentráció mellett 15 nap tárolást követően 1 mg/l koncentráció alá csökken a peptid mennyisége.



**53. ábra** az L-glutation stabilitási viszonyai savas közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

A glutation semleges környezetben való stabilitási vizsgálatai (54. ábra) során megállapítható, hogy az alkalmazott fémek nem fejtenek ki jelentős stabilizáló hatást a peptid bomlási folyamataira. A magas vas tartalommal (vas:peptid=4:1) rendelkező oldat esetében 3 nap tárolást követően 8 mg/l koncentráció érték került megállapításra, mely öt nap elteltével 6 mg/l mennyiség alá csökkent. A tárolási idő növekedésével azonban a peptid-koncentráció csökken, 15 napot követően már nem mutatható ki a peptid jelenléte a mintában. A négy fém együttes alkalmazása során három nap tárolást követően 6 mg/l koncentrációban volt jelen a peptid az oldatban és a tárolási idő növekedésével a peptid mennyisége csak kis mértékben csökken az oldatban. A kísérlet során 15 nap tárolási időt követően az L-glutation koncentrációja 4 mg/l mennyiségben volt kimutatható a vizsgált mintában a négy fém együttes alkalmazása során.



**54. ábra** az L-glutation stabilitási viszonyai semleges közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett (mintaszám=100, ismétlések száma=3) (forrás: saját szerkesztés)

A glutation keményítőmátrixban történő tárolása során megállapítható, hogy három nap tárolási időt követően egyik alkalmazott stabilizáló fémvegyület sem fejtette ki a várt stabilizáló hatást, a peptid teljes mennyisége elbomlott a komplexképző fémek mennyiségétől és a korábbiakban tapasztalt hatásaitól függetlenül.

A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az alkalmazott mátrix jelentősen befolyásolja az adott peptid stabilitási paramétereit.

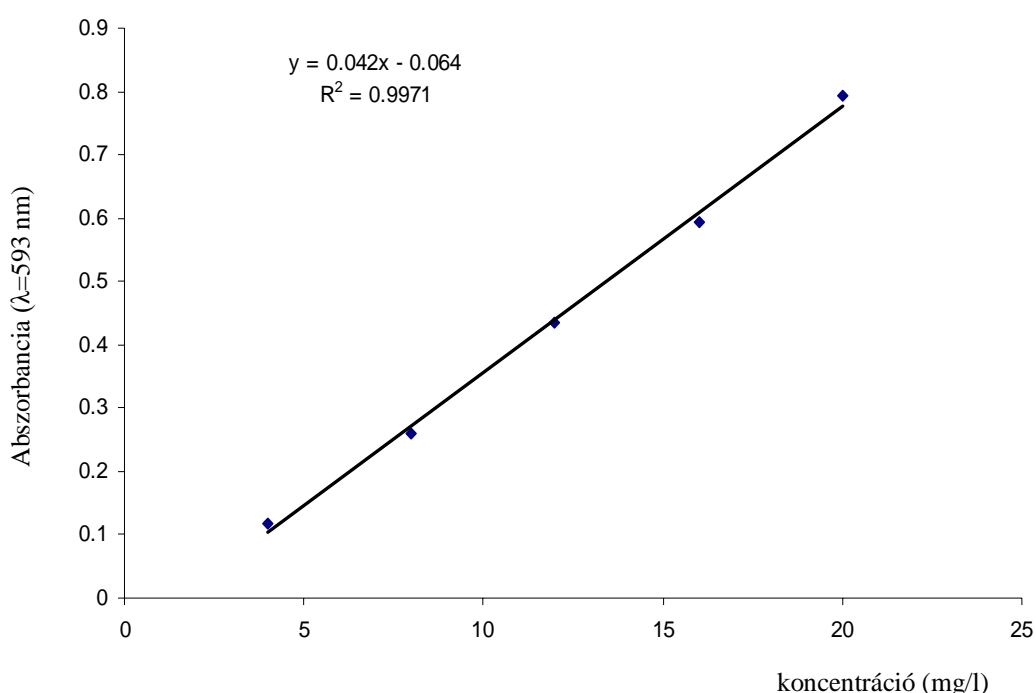
Az alkalmazott fémvegyületek eltérő módon hatnak az adott peptid stabilitására. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az aszpartám esetén a mátrixtól függetlenül a 4 fém együttes alkalmazása biztosítja a legjobb védő hatást a peptidnek. Amennyiben a mátrixok lehetséges hatásait is figyelembe vesszük, alacsony pH tartományban a vas:peptid 4:1 arányú elegye, semleges tartományban a négy fém együttes alkalmazása, keményítő oldatban pedig a cink és a magnézium négyszeres mennyisége eredményezi a legjobb stabilizáló hatást az aszpartám esetén.

A karnozin estében szintén a négy fém együttes alkalmazása biztosítja a legjobb stabilitást, amennyiben a mátrixhatást nem vesszük figyelembe. Savas és semleges közegben a négyszeres mennyiségű cink és a négy fém együttes alkalmazása, keményítő oldatban pedig az előző két stabilizáló mellett a magnézium négyszeres mennyisége is növeli a peptid stabilitását.

A glutation tárolása során mátrixtól függetlenül a vas négyszeres mennyisége és a négy fém együttes alkalmazása stabilizálja legnagyobb mértékben a peptidet. Savas tartományban a vas és a kalcium négyszeres mennyisége és a négy fém együttes alkalmazása, semleges tartományban a vas négyszeres mennyisége és a négy fém együttes alkalmazása fejt ki a legintenzívebb stabilizáló hatást a peptidre. Keményítő mátrixban a glutation stabilitása nem mérhető, 3 nap alatt a peptid mennyisége detektálási határ alá került.

## 5.9. A vizsgált peptid vegyületek antioxidáns aktivitásának meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) módszer alapján

Az antioxidáns aktivitás vizsgálatokat a 4.9. fejezetben megadott eljárásnak megfelelően aszkorbinsav kalibrációs oldatsort készítettem a mennyiségi meghatározáshoz. A mennyiségi meghatározás számára 100 ml térfogatú, 100 mg/l koncentrációjú törzsoldatot készítettem aszkorbinsavból (VWR), majd a törzsoldatból kalibrációs oldatokat készítettem 4 mg/l, 8 mg/l, 12 mg/l, 16 mg/l és 20 mg/l koncentrációban. Az elkészített kalibrációs oldatok azonnali felhasználásra kerültek a mérések során. Az oldatkészítést követően a felhasználásig a törzsoldat és a kalibrációs oldatsorozat műanyag edényben, fénytől elzárva került tárolásra, mely során az aszkorbinsav kémiai átalakulását gátolni lehetett. A FRAP reagens oldat és az aszkorbinsav oldat elegyítésével, 5 perces reakcióidőt követően az oldatok abszorbancia értékét 593 nm hullámhosszon spektrofotometriás módszerrel, UV/VIS spektrofotométerrel határoztam meg. A kapott abszorbancia értékeket koncentráció értékekkel összevető kalibrációs függvényt állítottam fel (55. ábra) az ismeretlen minta antioxidáns aktivitás értékének meghatározásához.



**55. ábra** a vizsgált peptid FRAP módszer szerinti antioxidáns aktivitás meghatározása (forrás: saját szerkesztés)

A FRAP módszer szerint elvégzett vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy vizsgált kis molekula tömegű peptid vegyületek nem tekinthetők erős antioxidáns tulajdonságú vegyületnek, redukáló képességük nem jelentős. A vizsgált peptidek közül a tiol csoportot tartalmazó dipeptidek (L-glutation és  $\gamma$ -glutamil-cisztein) esetében tudtam antioxidáns aktivitást meghatározni, mely a szakirodalmi közlésekkel (2.2. fejezet) is összhangban áll. A kéntartalmú peptidek antioxidáns hatása minden bizonnyal az SH funkciós csoportnak köszönhető, azonban az L-karnozin kismértékű redukáló képességének tulajdonítható alacsony érték az antioxidáns folyamatok más úton történő lejátszódására enged következtetni. A vizsgálatok során a peptid standardok antioxidáns aktivitás értékeinek meghatározása háromszori ismétlésben történt.

**4. táblázat** a vizsgált peptidek antioxidáns aktivitási értékei FRAP módszer alapján, (mintaszám:5, ismétlésszám:3) (forrás: saját szerkesztés)

Minta neve	FRAP aktivitás (mg/kg AAE)	Abszorbancia ( $\lambda=593$ nm)
aszpartám	2,2 $\pm$ 0,01	0,0028 $\pm$ 10 <sup>-4</sup>
alanil-glutamin	2,2 $\pm$ 0,02	0,0029 $\pm$ 10 <sup>-4</sup>
L-glutation	47,8 $\pm$ 0,08	0,3768 $\pm$ 10 <sup>-3</sup>
L-karnozin	3,6 $\pm$ 0,02	0,0086 $\pm$ 10 <sup>-4</sup>
$\gamma$ -glutamil-cisztein	29,9 $\pm$ 0,06	0,2276 $\pm$ 10 <sup>-3</sup>

## 5.10. Élelmiszerminták peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiai módszerek alapján

A reális minták vizsgálatát követően megállapítható, hogy mind a növényi alapanyagok és élelmiszerek (5. táblázat), mind az állati eredetű alapanyagok és élelmiszerek (6. táblázat) peptid tartalma is jelentősen eltér. Különbségek figyelhetők meg a vizsgált növényfajok peptid koncentrációja között, ugyanakkor az élelmiszeripari technológia behatása is befolyásolja ugyanazon alapanyagból készített élelmiszer peptid tartalmát. A vizsgált növényi eredetű minták alanil-glutamin tartalma széles sávban (7,5 mg/kg - 109,5 mg/kg) változik. Az Ala-Gln tartalom legmagasabb értékét zöldborsó mintákban állapítottam meg. A peptid átlagosan 90 mg/kg körüli mennyiségben volt jelen a zöldborsó mintákban, azonban két esetben (fagyasztott zöldborsó 1-100 mg/kg és konzerv zöldborsó felöntőlé 110 mg/l) 100 mg/l feletti mennyiséget tudtam meghatározni, mely jelentősen meghaladja a másik két növényi mintában (rizs és fokhagyma) detektált mennyiséget.

Az aszpartám mennyisége is széles határok között mozgott a vizsgálat élelmiszerek esetén. Mesterséges édesítőszerként reális volt azon tapasztalat, hogy több esetben sem tudtam az aszpartám jelenlétét igazolni a vizsgálati mintákban, azonban előfőzött rizs minták és zöldborsó mintákban 10 mg/kg körüli mennyiségben volt jelen az aszpartám. A detektált mennyiségek nem jelentősek, azonban érdekes tény, hogy a technológiai behatáson átesett (főzött, esetlegesen adalékanyagokkal dúsított) élelmiszerekben jelen volt az aszpartám.

Az L-karnozin mennyiségi meghatározása során detektálási határ alatti mennyiségtől 18 mg/kg koncentrációig állapítottam meg a dipeptid tartalmát a vizsgált növényi mintákban. A technológiai eljárások egyértelmű hatását igazolni nem lehet, ugyanis amíg a fokhagyma esetén jelentős csökkenés állapítható meg a nyers alapanyag és késztermék között, addig a hőkezelt, adalékanyagokat is tartalmazó rizs és zöldborsó mintákban a karnozin mennyisége emelkedett.

A glutation jelenlétét tubusos fokhagymakrém mintában nem tudtam kimutatni, míg az előfőzött fehér rizsben 265 mg/kg koncentrációban volt jelen. A legtöbb mintában 100 mg/kg körüli mennyiséget tudtam meghatározni a nyers élelmiszerekben, azonban a technológiai hatásokra egyértelmű megállapítást nem lehet tenni a vizsgált peptid esetén.

A  $\gamma$ -glutamil-cisztein mennyiségét illetően megállapítható, hogy a vizsgált élelmiszerek 100 ppm körüli mennyiségben tartalmazzák a vizsgált peptidet. Az átlagot meghaladó koncentrációban barna rizsben (155 mg/kg) és nyers fokhagymában (125 mg/kg) van jelen, ugyanakkor mennyiségét csökkentik a technológiai hatások a feldolgozott élelmiszerek esetében.

**5. táblázat** növényi alapanyagok peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiai módszer segítségével (mintaszám:12, ismétlések száma:3) (forrás: saját szerkesztés)

	<b>Ala-Gln</b>	<b>Apm</b>	<b>L-Kar</b>	<b>Gsh</b>	<b>γ- Glu-Cis</b>
<b>koncentráció (mg/kg nyers mintában)</b>					
<b>fehér rizs</b>	7,5±0,2	0,2±0,01	1,3±0,04	112,4±2	103,8±1,4
<b>barna rizs</b>	22,7±0,5	0,8±0,03	<D <sub>L</sub>	119,8±2,6	<b>155,3±3,3</b>
<b>előfőzött fehér rizs</b>	23,6±0,7	10,8±0,2	3,2±0,1	<b>265,0±5,3</b>	99,2±2,4
<b>előfőzött barna rizs</b>	26,3±0,8	15,0±0,4	2,9±0,1	<b>241,4±5,2</b>	<b>120,2±2,7</b>
<b>fagyasztott zöldborsó 1</b>	<b>100,1±2,0</b>	<b>27,5±0,9</b>	2,2±0,1	145,7±3,6	109,5±2,7
<b>fagyasztott zöldborsó 2</b>	89,5±1,9	14,7±0,3	14,2±0,3	45,0±1,0	106,6±4,5
<b>konzerv borsó 1</b>	89,9±4,0	1,8±0,1	3,3±0,1	37,9±0,9	111,3±3,8
<b>konzerv borsó 2</b>	85,8±1,9	3,0±0,1	3,2±0,1	76,3±2,0	119,1±3,6
<b>konzerv borsó felöntőlé 1</b>	87,3±3,1	0,4±0,02	7,4±0,2	29,7±0,8	107,0±2,6
<b>konzerv borsó felöntőlé 2</b>	<b>109,5±2,1</b>	4,1±0,1	13,0±0,3	61,9±1,8	96,4±5,0
<b>nyers fokhagyma</b>	80,2±2,0	<D <sub>L</sub>	<b>18,4±0,3</b>	89,3±2,9	<b>124,5±3,0</b>
<b>tubusos fokhagyma krém</b>	37,9±1,2	0,2±0,01	2,6±0,1	<D <sub>L</sub>	<b>115,0±3,8</b>

<D<sub>L</sub>: kimutatási határ alatti mennyiség (D<sub>L,Apm</sub>= 160 µg/kg, D<sub>L,L-kar</sub>= 16 µg/kg D<sub>L,Gsh</sub>= 2,1 µg/kg.)

Állati eredetű élelmiszer alapanyagok és élelmiszerek peptid tartalmának megállapításához nemzetközi közleményekből kiindulva (CLARE and SWAISGOOD (2000)) tej- és tejtermékek vizsgálatát végeztem el a fejlesztett kromatográfiai módszereket alkalmazva. A vizsgálatok során megállapítható, hogy az alanil-glutamin átlagosan 10 mg/l koncentrációban (0,8 mg/l és 68,9 mg/l között) van jelen a vizsgált mintákban. Átlag feletti koncentrációt Ultra Magas Hőmérsékleten hőkezelt tejmintában (68,9 mg/l) és juhtúró mintában (25,9 mg/kg) állapítottam meg. Technológiai hatás tekintetében egyértelmű megállapítás nem tehető, érdekes tény azonban hogy magas hőmérséklet hatására a peptid mennyisége jelentősen emelkedett,

holott a stabilitási vizsgálataim alapján (5.7. fejezet) megállapítható, hogy már szobahőmérsékletet meghaladó hőmérsékleten is (30 °C) jelentős bomlást szenved a molekula.

Az aszpartám kvantitatív meghatározása során megállapítható, hogy bár természetes úton nem kerülhet a vizsgált termékekbe, jelenléte mégis kimutatható. Fermentált tejtermékek esetén mind az öt vizsgált vegyület és az összes vizsgált élelmiszert figyelembe véve juhsajtban mutattam ki a legnagyobb mennyiségben az aszpartámot 420,8 mg/kg koncentrációban. A későbbiekben javasolt egy fermentációs kísérlet sorozatban vizsgálni az aszpartám, vagy azzal rokon vegyületek jelenlétét fermentált tejtermékekben, többszörösen kapcsolt rendszerű tömegspektrometriás detektálást alkalmazva. Jelen kutatás során többszörösen kapcsolt tömegdetektálási módszer nem állt rendelkezésemre, így egyértelműen nem lehet kizárni az aszpartám mennyiségét befolyásoló, esetleges zavaró komponens jelenlétét.

Az L-karnozin mennyisége egy mintában haladta meg a 10 mg/kg értéket (juhtúró: 12,9 mg/kg), mely nem mondható jelentősnek. A technológiai folyamatok hatásait a peptid mennyiségét tekintve nem lehet egyértelműen igazolni. Átlag feletti mennyiséget a két vizsgált túró készítményben határoztam meg, a koncentráció növekedése összefüggésben lehet a túró gyártási technológiájával, mely során a tej víztartalmának jelentős részét eltávolítják, ez által a hatóanyagok koncentrációja következik be.

A glutation mennyiségének meghatározása során a peptid 22,6 mg/kg és 34,1 mg/kg között volt jelen a vizsgált mintákban. Kecskesajt mintában állapítottam meg a legmagasabb koncentrációt, azonban ez az eltérés sem jelentős a többi mintához képest és technológiai hatást sem tudunk egyértelműen hozzárendelni a peptid mennyiségének kismértékű változását figyelembe véve.

A  $\gamma$ -gutamil-cisztein koncentrációt vizsgálva megállapítható, hogy a vizsgálati minták jelentős részében átlagosan 10 mg/kg koncentrációban található meg a peptid molekula. A detektált legalacsonyabb koncentráció 9,1 mg/l volt a vizsgált 2,8% zsírtartalmú tejmintában, míg a legmagasabb értéket tehénsajt mintában állapítottam meg 37,4 mg/l koncentrációban. A technológiai hatásokat ez esetben sem tudtam egyértelműen összefüggésbe hozni a vizsgált élelmiszerek  $\gamma$ -gutamil-cisztein koncentrációjával. Az élelmiszer típusait figyelembe véve viszont megállapítható, hogy legnagyobb mennyiségben sajtok tartalmazzák a vizsgált peptidet.

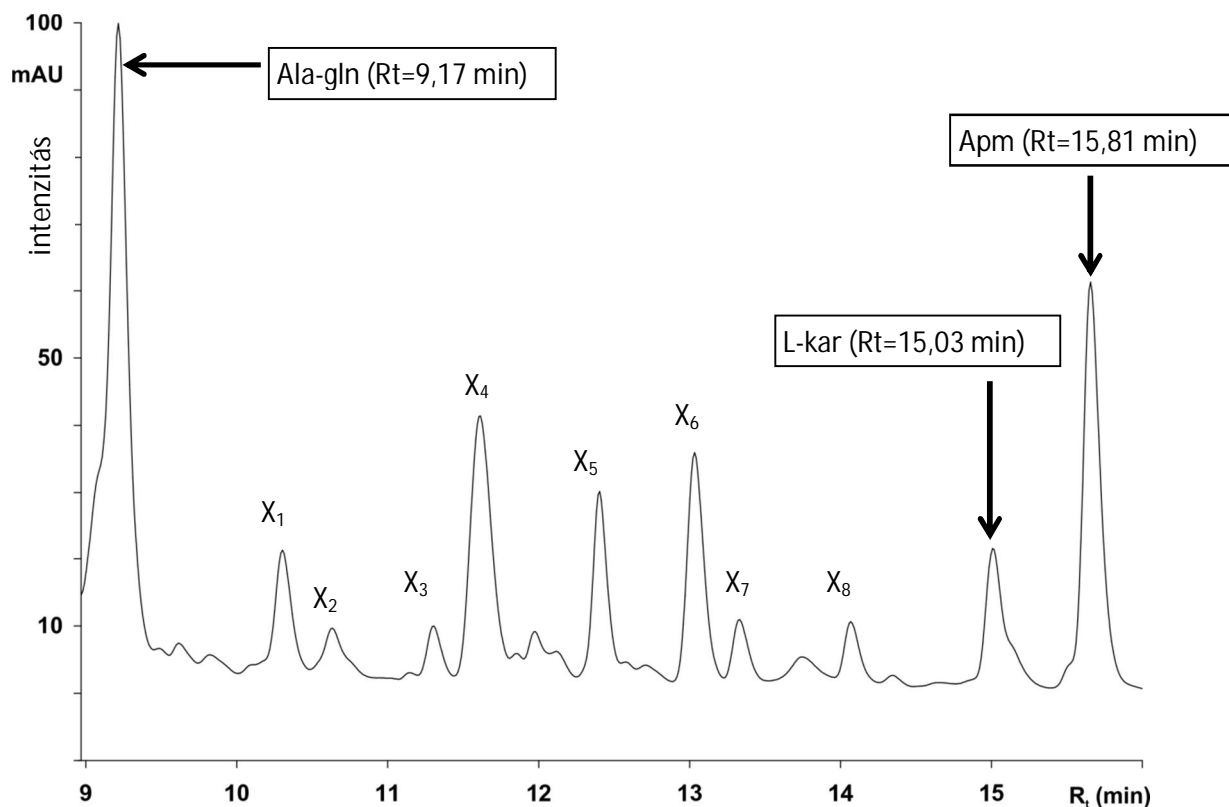


**6. táblázat** állati eredetű alapanyagok és élelmiszerek peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszer segítségével (mintaszám:12, ismétlések száma:3) (forrás: saját szerkesztés)

	Ala-Gln	Apm	L-Kar	Gsh	$\gamma$ -Glu-Cis
	<b>koncentráció (mg/kg nyers mintában)</b>				
<b>tej 1,5%</b>	1,8±0,04	22,7±0,8	1,5±0,03	22,6±0,4	9,4±0,2
<b>tej 2,8%</b>	1,9±0,02	20,7±0,7	1,3±0,04	27,3±0,6	9,1±0,2
<b>tej UHT</b>	<b>68,9±2,2</b>	5,4±0,1	1,3±0,04	26,9±0,9	10,1±0,3
<b>kecskesajt</b>	0,8±0,02	<b>154,2±3,1</b>	1,7±0,03	<b>34,1±1,0</b>	<b>19,6±0,6</b>
<b>juhsajt</b>	7,8±0,1	<b>420,8±6,7</b>	2,5±0,1	28,5±0,6	13,3±0,4
<b>tehénsajt</b>	5,3±0,2	<b>191,6±2,7</b>	2,7±0,1	23,6±0,6	<b>37,4±0,7</b>
<b>tehéntúró</b>	1,9±0,02	<b>149,2±3,5</b>	<b>6,6±0,1</b>	<b>30,7±0,7</b>	10,9±0,3
<b>juhtúró</b>	<b>25,9±0,7</b>	13,4±0,4	<b>12,9±0,2</b>	25,9±0,8	17,4±0,5
<b>tejföl 10%</b>	1,3±0,03	77,9±2,7	3,1±0,1	28,3±0,6	10,7±0,2
<b>tejföl 20%</b>	1,2±0,02	52,1±1,4	1,2±0,03	25,6±0,7	10,4±0,3
<b>joghurt</b>	2,2±0,04	32,6±0,8	2,4±0,1	24,9±0,5	11,8±0,3
<b>kefir</b>	1,5±0,03	36,3±1,1	2,2±0,1	27,1±0,7	10,5±0,3

## 5.11. Reális minták elemzése során fellépő zavaró hatások ismertetése

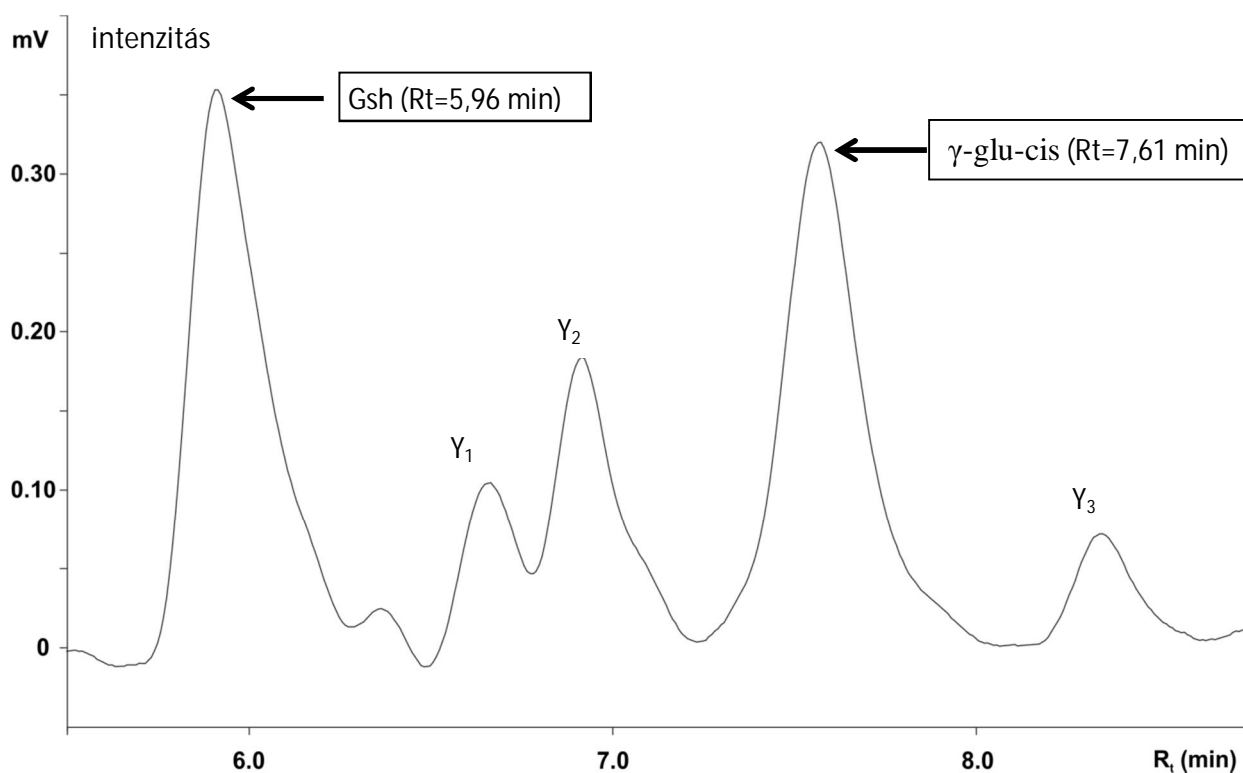
A valós minták vizsgálatakor fontos szempont a kifejlesztett módszerek alkalmazása során a kísérő anyagok jelenlétének ismerete és azok szerepének meghatározása. A továbbiakban bemutatásra kerülő két ábrán fagyasztott zöldborsó minta kromatogramjai kerülnek bemutatásra danzil-kloriddal és orto-ftálaldehid tioetanols oldatával történt származékképzést követően.



**56. ábra** fagyasztott zöldborsó kromatográfiás vizsgálata során kapott kromatogram UV/VIS detektálás alkalmazásával, Danzil-kloriddal történő származékképzést követően. A retenciósidők ( $R_{t_{\text{Ala-gln}}}=9,17$  min,  $R_{t_{\text{L-kar}}}=15,03$  min és  $R_{t_{\text{Apm}}}=15,81$  min) kismértékű eltolódása figyelhető meg. X<sub>1</sub>-X<sub>8</sub>: egyéb komponens (forrás: saját szerkesztés)

Az 56. ábrán fagyasztott zöldborsóból történő mennyiségi meghatározás során kapott kromatogram látható tiol csoportot nem tartalmazó peptidek danzil-kloriddal történő származékképzését követően. A standard minták esetén tapasztalt relatív retenciósidők ( $R_{t_{\text{Ala-gln}}}=9,05$  min,  $R_{t_{\text{Apm}}}=15,90$  min és  $R_{t_{\text{L-kar}}}=14,90$  min) értékeihez képest kismértékű eltérés (~0,1 min) tapasztalható az adott peptidek retenciósidejében ( $R_{t_{\text{Ala-gln}}}=9,17$  min,  $R_{t_{\text{L-kar}}}=15,03$  min és  $R_{t_{\text{Apm}}}=15,81$  min) a példaként bemutatásra kerülő valós minta kromatográfiás vizsgálata során.

A retenció idő eltolódásán túl egyéb zavaró hatással nem kell számolni a kromatográfiás meghatározás során, a három peptid kromatográfiás jelalakja megfelelő, elválásuk alapvonalon történik, terület alapú integráljuk kellő pontossággal meghatározható a mennyiségi meghatározás számára



**57. ábra** fagyasztott zöldborsó kromatográfiás vizsgálata során kapott kromatogram fluoreszcens detektálás (RF) alkalmazásával, orto-ftálaldehid tioetanolos oldatával történő származékképzést követően. A retenció idők ( $Rt_{Gsh}=5,96$  min és  $Rt_{\gamma\text{-glu-cis}}=7,61$  min) kismértékű eltolódása figyelhető meg.  $Y_1$ - $Y_3$ : egyéb komponens (forrás: saját szerkesztés)

Az 57. ábrán fagyasztott zöldborsó mintából történő mennyiségi meghatározás során kapott kromatogram látható tiol tartalmú peptidok orto-ftálaldehid tioetanolos oldatával történő származékképzését követően. A standard minták esetén tapasztalt relatív retenció idők ( $Rt_{Gsh}=5,90$  min és  $Rt_{\gamma\text{-glu-cis}}=7,63$  min) értékeihez képest kismértékű ( $\sim 0,1$  min) eltérés tapasztalható az adott peptidok retenció idejében ( $Rt_{Gsh}=5,96$  min és  $Rt_{\gamma\text{-glu-cis}}=7,61$  min) a valós minták vizsgálata során. A retenció idő eltolódásán túl egyéb zavaró hatással nem kell számolni a kromatográfiás meghatározás során, a három peptid kromatográfiás jelalakja megfelelő, elválásuk alapvonalon történik, terület alapú integráljuk kellő pontossággal meghatározható a mennyiségi meghatározás számára.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezésben összefoglalt eredmények alapján az alábbi megállapítások tehetők a kis molekula tömegű peptidok folyadékkromatográfiás meghatározása, a vizsgált peptidok stabilitási viszonyai, a stabilitási problémák csökkentése, a peptidok antioxidáns tulajdonságainak és élelmiszeripari felhasználása tekintetében:

- A folyadékkromatográfiás vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a kis molekula tömegű bioaktív peptidok meghatározása egy módszer szerint nem hajtható végre. Az orto-ftáldaldehyddel történő származékképzést követően a vizsgált öt peptid meghatározása a közeli retenciós idők alapján nem végezhető el kellő biztonsággal.
- A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy két különböző származékképzési eljárás és detektálási mód szerint célszerű végrehajtani a kis molekula tömegű peptidok kromatográfiás meghatározását annak megfelelően, hogy a vizsgálni kívánt peptid tartalmaz-e kén tartalmú funkciós csoportot. A ciszteint nem tartalmazó peptidok (Apm, Ala-Gln, L-Kar) esetén danzil-kloriddal történő származékképzés alkalmazása indokolt, UV/VIS detektálás (290 nm) diódasoros detektor alkalmazása mellett. A kifejlesztett módszer alkalmazásával elvégzett vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a vizsgált peptidok 10 µg/kg kimutatási határral határozhatók meg.
- A cisztein tartalmú peptidok (Gsh,  $\gamma$ -Glu-Cis) folyadékkromatográfiás meghatározására a danzil-kloriddal történő származékképzés kevésbé alkalmas, ez esetben OPA származékképző használata indokolt, a vizsgált komponensek válaszjelének detektálását pedig fluoreszcens detektor alkalmazásával indokolt elvégezni 336 nm gerjesztés mellett, 455 nm detektálási hullámhosszon. A fluoreszcens detektálási mód alkalmazásával a kén tartalmú peptidok meghatározásának alsó küszöbértékét 1-2 µg/l közötti koncentrációban tudtam meghatározni.
- A peptidok FRAP módszer szerint végzett antioxidáns aktivitás vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a vas redukción alapuló módszerrel nem tudtam jelentős antioxidáns aktivitást meghatározni a vizsgált peptidok vonatkozásában, a szakirodalmi adatokban szereplő antioxidáns aktivitás alapvetően nem a peptidok a gyökfogó képességén alapul.
- A környezeti paraméterek peptid stabilitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata során megállapítható, hogy a kis molekula tömegű peptidok kifejezetten érzékenyek azon környezeti tényezőkre, amelyek leggyakrabban hatással vannak az

élelmiszerekre és élelmiszeripari nyersanyagokra. A környezet kémhatása (főként alacsony pH érték), az oxidatív körülmények (levegővel hosszabb ideig érintkezve) és a fény (hosszabb ideig napfényen tárolva) is nagymértékben károsítja a peptid vegyületeket, stabilitásuk még kisebbnek mutatkozik, ha a vizsgált paraméterek együttesen fejtik ki hatásukat.

- A peptid vegyületek kismértékű stabilitása erősíthető komplex képző fémek alkalmazásával. A vizsgálatok alapján a peptidek bomlását legjobb hatásfokkal a kadmium alkalmazása csökkenti. A komplexképző fémek stabilizáló hatását ronthatja az alkalmazott mátrix (magas szénhidrát koncentráció).
- A növényi és állati eredetű források vizsgálata során megállapítható, hogy a peptidek nem fordulnak elő olyan mennyiségben az általunk vizsgált élelmiszeripari alapanyagokban és késztermékekben, hogy kinyerésük gazdaságosan kivitelezhető lenne, mely párosul még a peptidek kis mértékű stabilitásával is. A stabilitási problémák kiküszöbölésére legjobb hatékonysággal alkalmazható kadmium toxikusságából adódóan nem használható élelmiszeripari alapanyagokban.
- Megállapítható, hogy bizonyos peptidek adott élelmiszer típusokban nagyobb mennyiségben fordulnak elő.  $\gamma$ -glutamil-cisztein nagyobb mennyiségben található meg fokhagymában és vizsgált barna rizs mintában, míg alanil-glutamin dipeptidből zöldborsó készítményekben határozta meg magasabb koncentrációt a többi vizsgált mintához viszonyítva.
- Az alkalmazott élelmiszeripari technológia (hőkezelés, savanyítás) a vizsgált minták jelentős részénél csökkentette a peptid koncentrációt, azonban az alanil-glutamin esetén tejben az UHT kezelést követően a kiindulási koncentrációhoz viszonyítva magasabb értéket állapítottam meg.

## JAVASLATOK

Az elvégzett vizsgálatok kiértékelését követően megállapítható, hogy a kis molekuláris tömeggel rendelkező peptidekkel kapcsolatos analitikai vizsgálatok folytatása indokolt a vegyületcsoport humánbiológiai és élelmiszertudományi hatásait illetően:

- Javasolt az antioxidáns aktivitásának további vizsgálata több módszer (DPPH, ORAC, TRAP) szerint, mely segítségével a peptidek antioxidáns folyamatokban betöltött szerepét és annak folyamatát egyértelműen meg lehet állapítani.
- Célszerű a vizsgált peptidek természetes forrásainak vizsgálatát kibővíteni a kutatás során vizsgált növényi (rizs, borsó, fokhagyma) és állati alapanyagok és késztermékek (tej- és tejtermékek) további vizsgálataival. A kutatás ilyen téren történő továbbvitele eredményezheti olyan természetes források igazolását, melyből gazdaságosan is kinyerhető az adott peptid humánklinikai vagy élelmiszeripari alkalmazásra.
- A kutatás során valós mintákból történő mennyiségi meghatározást követően fermentált élelmiszerekben (sajtok) az aszpartám mennyiségét kiugróan magasnak találtam. Az elvégzett kontroll vizsgálatok alapján a mérési eredményeket igazolni tudtam, azonban indokoltnak tartom többszörösen kapcsolt tömegdetektorok (MS/MS, TOF-MS) alkalmazásával ismételt vizsgálatát elvégezni. Nem kizárható, hogy a fermentáció során az aszpartám molekulához hasonló szerkezetű és az alkalmazott származékképzővel analóg módon kötődő vegyület képződik, mely befolyásolhatta mérési eredményeimet. Abban az esetben, ha a többszörösen kapcsolt tömegdetektorok alkalmazásával is hasonló következtetésre jutnak, a tejtermékek (főként fermentált termékek) széles körű vizsgálata indokolt a továbbiakban.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Kis molekulatömegű peptidok kromatográfiás meghatározásának lehetőségeit, a vizsgált peptidok környezeti paraméterek hatására történő stabilitási viszonyainak meghatározását, fémvegyületek stabilitásra gyakorolt hatását és a kis molekulatömegű peptidok élelmiszeripari adalékanyagként történő felhasználásának lehetőségét vizsgáltam kutatásom során.

1. A vizsgált peptid vegyületek folyadékkromatográfiás meghatározásának vizsgálata során megállapítottam, hogy a modellvegyületek (aszpartám, L-karnozin, L-glutation, alanil-glutamin és  $\gamma$ -glutamil-cisztein) egy adott HPLC módszer szerinti meghatározása nem végezhető el kellő pontossággal és reprodukálható módon. A peptidok eltérő funkciós csoportjai meghatározzák kémiai tulajdonságaikat, így azonos származékképzővel szemben eltérő módon reagálnak.
2. A ciszteint nem tartalmazó peptidok vizsgálata során megállapítottam, hogy danzil-kloriddal történő származékképzést követően UV tartományban (290 nm), diódasoros detektálással kellő pontossággal és precizitással lehet mennyiségi meghatározást végrehajtani. A kromatográfiás elválasztás reverz fázisú kromatográfiás oszlopon valósult meg (Agilent Eclipse plus RPC18 150X3, 3,3  $\mu$ m). A vizsgálatok során a modellvegyületek kimutatási határa: Ala-Gln=17  $\mu$ g/l, L-Kar=16  $\mu$ g/l, Apm=160  $\mu$ g/l.
3. A cisztein tartalmú peptidok vizsgálata során megállapítottam, hogy folyadékkromatográfiás mennyiségi meghatározásuk orto-ftálaldehid tioetanolos oldatával történő származékképzést követően, fluoreszcens detektor (RF) alkalmazásával végezhető el. A meghatározás származékképzés utáni injektálását követően 340 nm gerjesztés mellett 455 nm detektálási hullámhosszon történt. A kromatográfiás elválasztást fordított fázisú oszlopon (Agilent Eclipse plus RPC18 150X3, 3,3  $\mu$ m) hajtható végre. A modellvegyületek kimutatási határa ez esetben is a kromatogramok jel-zaj viszonyából került meghatározásra, mely mindkét kén tartalmú peptidnál 2  $\mu$ g/l értéknek adódott (Gsh=2,1  $\mu$ g/l,  $\gamma$ -Glu-Cis=1,3  $\mu$ g/l), mely jelentős javulás korábbi eljárásokhoz képest.
4. A kutatás során megállapítottam, hogy a vizsgált peptidok stabilitása jelentősen eltér egymástól különböző környezeti paraméterek hatására. A ciszteint nem tartalmazó peptidok bomlása savas kémhatás (pH=4), magas hőmérséklet (+30 °C) és a levegő oxigén tartalmának hatására számottevő, tárolhatóságuk néhány nap időtartamra korlátozódik. A tiol csoportot tartalmazó peptidok esetén intenzívebb mértékű bomlás

határozható meg a tiol csoportot nem tartalmazó peptidekhez képest a környezeti paraméterek hatására, melynek eredményeként megállapítható, hogy néhány nap tárolási idő alatt közel 100%-os mértékű bomlást szenvednek.

5. Vizsgálataim alapján igazoltam, hogy fém-komplexek képzésével növelhető a vizsgált peptidek stabilitása. A leghatékonyabb védő hatást az alkalmazott négy fém (cink, kalcium, magnézium, vas) együttes alkalmazása biztosítja a peptidek számára. Megállapítottam ugyanakkor, hogy az alkalmazott mátrix a komplexképzésért felelős fémek jelenlététől függetlenül jelentősen befolyásolja a stabilitást, keményítő mátrix alkalmazása során a fémek védő funkciója nem érvényesül.
6. Megállapítottam, hogy a vizsgált növényi és állati eredetű élelmiszer alapanyagok és késztermékek nem tartalmazzák a vizsgált bioaktív peptid vegyületeket olyan mennyiségben, mely gazdaságos módon történő kinyerésüket lehetővé tenné élelmiszeripari adalékanyagként való felhasználásukat figyelembe véve. Az élelmiszer előállítási technológiák legtöbbször (közeg kémhatásának változása, hőkezelés módja és ideje) a peptidek koncentrációjának csökkenését eredményezi.



## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban ismertetett kutatás során kis molekulatömegű peptidok kromatográfiás meghatározásának lehetőségeit, a peptidok antioxidáns aktivitásának vizsgálatát végeztem el. A kutatómunka során meghatározásra került a peptidok stabilitási tulajdonsága környezeti paraméterek függvényében. Komplexképző fémek alkalmazásával vizsgáltam a peptidok stabilitási tulajdonságait környezeti paraméterek és élelmiszer mátrix hatására. A kiválasztott modellvegyületek mennyiségének megállapítását az általam fejlesztett folyadékkromatográfiás módszer alkalmazásával hajtottam végre.

A téma szakirodalmi tanulmányozását követően megállapítást nyert, hogy több tanulmány foglalkozott kis molekulatömegű peptid vegyületek elválasztásával, detektálásával és meghatározásával, azonban a közölt módszerek a kvantitatív meghatározás, érzékenység és reprodukálhatóság szempontjából nem tökéletesek, mivel számos aminosav gyenge elnyeléssel rendelkezik az UV/látható tartományban. A vizsgálatok során megbízható és érzékeny folyadékkromatográfiás módszereket dolgoztam ki a di-, és tripeptidok meghatározására (aszpartám, L-karnozin, L-glutation, alanil-glutamin és  $\gamma$ -glutamil-cisztein) nyers és feldolgozott élelmiszerekben. A peptid tartalmú komplex élelmiszer minták vizsgálata során HPLC módszert alkalmaztam trifluor-ecetsav, acetonitril eluens rendszer és C18 inverz fázisú HPLC oszlop használatával. A detektálást gáz fázisú fényszóráson alapuló detektorral (ELS), UV detektálást a danzil-kloriddal végzett származékképzés után, fluoreszcens detektálást (RF) orto-ftáldaldehyddel történő származékképzést követően alkalmaztam. A vizsgálatok során kapcsolt rendszerben, tömegdetektálással igazoltam a képződő komplexek jelenlétét a vizsgálati mintákban. A munka során megállapítottam, hogy az egy módszer szerinti kromatográfiás meghatározás nem alkalmas a peptidok mennyiségi meghatározására, a kéntartalmú peptidok esetén fluoreszcens detektálás, míg a tiol csoportot nem tartalmazó peptidok esetén UV detektálás alkalmazása indokolt a származékképzést követően. A mennyiségi meghatározást megelőzően külső kalibrációt alkalmazva meghatároztam a kimutatási tartomány lineáris értékét, a jel-zaj viszony alapján megállapításra került a kimutatási határ, mely a tiol csoportot nem tartalmazó peptidok esetében 10  $\mu\text{g/l}$  körüli, míg a tiol tartalmú peptidok esetében 1-2  $\mu\text{g/l}$  közötti értéknek adódott.

Vizsgálataim során a kiválasztott peptidok különböző környezeti paraméterek hatására (pH, hőmérséklet, fényhatás, oxidatív hatás) történő tárolási vizsgálatát és az élelmiszer-mátrixban (szénhidrát) végbemenő változások feltárását végeztem el. A peptidok bomlásának intenzitását és a visszamaradt mennyiségét az általam kifejlesztett nagy nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerekkel határoztam meg. Megállapítottam, hogy a

peptidek stabilitása lúgos tartományban (pH=10) alacsony volt, az aszpartám, a karnozin és a  $\gamma$ -glutamil-cisztein esetében 12 nap alatt csak néhány százalékát tudtam visszamérni a kiindulási mennyiségnek. Oxidatív körülmények között a cisztein tartalmú peptidek és az aszpartám jelentős, 95% feletti bomlást mutattak, míg az alanil-glutamin 75% körüli degradációt szenvedett. Az oxigéntől elzárt körülmények közt is kis stabilitást mutattak, a bomlás mértéke 12 napot követően 90% közelinek adódott. Fényben tárolt tiol tartalmú peptidek szintén jelentős degradációt mutattak, mértéke 12 nap alatt közel 100% volt. A vizsgált paraméterek közül a hőmérséklet is jelentős befolyással volt a stabilitásra. A  $\gamma$ -glutamil-cisztein  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  -os hőmérsékleten jelentős bomlást (94%) szenvedett 3 nap tárolást követően. Az L-glutation hűtött tárolás mellett ( $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) és magasabb tárolási hőmérsékleten ( $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) is jelentős mértékben degradálódott 12 napot követően. A ciszteint nem tartalmazó peptidek közül az aszpartám mutatta a legjelentősebb hőérzékenységet,  $+30^{\circ}\text{C}$ -on már 3 nap tárolást követően 95% feletti bomlás volt tapasztalható. A másik két peptid hőstabilitása jónak mondható,  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  -on 10% alatti a bomlás 30 nap elteltével, és  $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$  -os hőmérsékleten, 3 napot követően sem haladja meg az 50%-ot.

A stabilitási vizsgálatokat követően fém-komplexek alkalmazásával ismételt stabilitási vizsgálatokat végeztem a peptidekkel. Megállapítottam, hogy az alkalmazott mátrix jelentősen befolyásolja az adott peptid stabilitási paramétereit. Az alkalmazott fémvegyületek eltérő módon hatnak az adott peptid stabilitására. Mátrixtól függetlenül a 4 komplexképző fém együttes alkalmazása biztosítja a legjobb stabilitást az Aszpartám számára. Amennyiben a mátrixokat is figyelembe vesszük, alacsony pH tartományban a vas:peptid=4:1 arányú komplex, semleges tartományban a négy fém együttes alkalmazása, keményítő oldatban pedig a cink és a magnézium négyszeres mennyisége adja a legjobb stabilitást a peptidnek.

A karnozin estében szintén a négy fém együttes alkalmazása növeli a stabilitást, amennyiben az alkalmazott mátrix hatását nem vesszük figyelembe. Savas és semleges közegben a négyszeres mennyiségű cink és a négy fém együttes alkalmazása, keményítő oldatban pedig a magnézium négyszeres mennyisége is növeli a peptid stabilitását. A glutation tárolása során a mátrixtól függetlenül vas négyszeres mennyisége és a négy fém együttes alkalmazása stabilizálja legnagyobb mértékben a peptidet. A savas tartományban a vas és a kalcium négyszeres mennyisége és a négy fém együttes alkalmazása, semleges tartományban a vas négyszeres mennyisége és a négy fém együttes alkalmazása fejt ki a legintenzívebb stabilizáló hatást a peptidre.

Elvégeztem az öt modellvegyület antioxidáns aktivitásának vizsgálatát FRAP módszer szerint. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy nem sikerült jelentős antioxidáns aktivitást

kimutatni a vizsgálat peptidek esetén, a vizsgált vegyületek közül a kén tartalmú peptidek antioxidáns aktivitás értékei magasabbak, azonban ezen érték sem tekinthető kiemelkedőnek más, erős antioxidáns aktivitással bíró vegyületekhez viszonyítva.

## 9. SUMMARY

Chromatographic determination of small molecular weight peptides and antioxidant activity tests were performed as described in the thesis research proposal. Furthermore, research work has been carried out to study peptide stability properties as a function of environmental parameters. The stability properties of peptides as a function of environmental parameters and food matrix effect using a metal complexing agent has also been determined.

The quantitative analysis of the selected model compounds was performed using newly developed liquid chromatography methods. Following the study of literature data it was found that several papers addressed the separation, detection of small molecule peptides, however, the published methods are not perfect, as many amino acids have weak absorption with the UV/VIS range. The developed methods are reliable and sensitive for the determination of di- and tri-peptides (aspartame, L-carnosine, L-glutathione, and alanyl-glutamine  $\gamma$ -glutamyl-cysteine) in raw and processed foods. The applied HPLC methods used trifluoroacetic acid in acetonitrile as the eluent system, and C18 reversed phase HPLC column in the examination of complex food samples containing peptides. Evaporative light-scattering method (ELS) was used to detect the model compounds, UV/VIS detection could be used only after derivatization with dansyl chloride, the more sensitive fluorescence (RF) method was used after ortho phthalaldehyde derivatization. Mass spectrometry detection (M+H) proved the presence of transition metal complexes in the test samples. It was observed, that a single detection method cannot be applied for the quantitative determination of the peptides, fluorescence based methods are superior for sulphur containing derivatives, while UV/VIS is desirable for derivatives without thiol functionality. The linearity of the detection range has been identified in an external calibration procedure, the signal to noise ratio has been determined along with the minimum detectable quantity (10  $\mu\text{g/l}$  in general and 1-2  $\mu\text{g/l}$  for sulfur-containing peptides).

During the examination of selected peptides various environmental parameters influence the stability (pH, temperature, light exposure, oxidative stress), storage tests and effect of food matrices (proteins and carbohydrates) have been studied. The intensity decay and the remaining amounts were determined with the developed the high-pressure liquid chromatography (HPLC) methods. It was found, that the stability of peptides in the alkaline range (pH 10) was low, in the case of aspartame, carnosine and  $\gamma$ -glutamyl-cysteine only a few percent of the initial amount could be measured in 12 days. The cysteine-containing peptides and aspartame showed significant decomposition above 95% under oxidative conditions, while in the alanyl-glutamine suffered a degradation of about 75%. The stability under oxygen free conditions was similar, the

decomposition rate was 90% after 12 days. Cysteine-containing peptides also showed significant degradation under light storage, the decomposition was almost 100% in 12 days. Of the parameters examined, the temperature had also a significant influence on the stability. In case of the  $\gamma$ -glutamyl-cysteine at -18 °C significant degradation (94%) took place after 3 days storage. In addition to the L-glutathione cold storage (+ 4 °C) and higher storage temperatures (+ 30 °C) is significantly decomposed after 12 days. The non-cysteine containing peptides (aspartate) showed the greatest sensitivity to temperature increase, at + 30 °C, decomposition of over 95% was observed already after 3 days of storage. The other two peptides had fairly high thermal stability, at + 4 °C less than 10% degradation took place after 3 days and after time period the degradation did not exceed the 50% level.

After the stability studies the same experiments have been carried out with the involvement of transition metals. It was found that the stability of the transition metal - peptide complex has a significant effect on the stability parameters. The metal compounds used in different molar ratios affect the stability of the peptide. The combination of four transition metals provides the best stability for the aspartame. If the different matrix effects are taken into account, at low pH range, the Fe:peptide=4:1 complex, at neutral range the combined use of the four metals, in starch solution, the zinc and magnesium fourfold amount gives the best stability of the peptide. In case of carnosine the combined use of four metal increases stability when the effect of the matrix used is not taken into account. Under acidic and neutral conditions quadruple amounts of zinc and the four metals, in starch solution four times the amount of magnesium can also increase the stability of the peptide. When storing glutathione independently of the matrix co-administration four times the amount of iron and the four metals the stabilization of peptide is the highest. In acidic region the combined use of iron and four times the amount of calcium and the four metal, in the neutral range four-fold metal amount and the combined use of iron and four metals exerts the most intense effect in the stabilization of the peptide.

The antioxidant activity determination of the model compounds has been also carried out using the FRAP method. The established studies demonstrated, that significant antioxidant activities cannot be detected for the model compounds, however the thiol containing peptides have higher antioxidant activity, but the measured values are not considered outstanding compared to other potent antioxidant compounds.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

ABHILASH M., SAUGANTH PAUL M. V., VARGHESE M. V., HARIKUMARAN NAIR R. (2011) Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver, *Food and Chemical Toxicology* 49, 1203–1207 p.

ARII K., KAI T., KOKUBA Y. (1998) Degradation kinetics of L-alanyl-L-glutamine and its derivatives in aqueous solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 7, 107–112.

BADR H. M. (2007) Antioxidative activity of carnosine in gamma irradiated ground beef and beef patties. *Food Chemistry* 104, 665–679 p.

BELL L. N., WETZEL C. R. (1995) Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2608–2612 p.

BERSET J. D., OCHSENBEIN N. (2012) Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS), *Chemosphere* 88, 563–569 p.

BLACK R. M., TANAKA P., LEITER L. A., ANDERSON G. H. (1991) Soft Drinks With Aspartame: Effect on subjective hunger, food selection, and food intake of young adult males. *Physiology & Behavior* 49, 803–810 p.

BOEHM M. F., BADA J. L. (1984) Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100°C. *Proceeding of the National Academy of sciences of the USA* 81, 5263–5266 p.

BOISSONNEAULT G. A., HARDWICK T. A., BOGARDUS S. L., CHAN W. K. M., TATUM V., GLAUERT H. P., CHOW C. K., DECKER E. A. (1998) Interactions between carnosine and vitamin-E in mammary cancer risk determination, *Nutrition Research* 18, 723–733 p.

BURKE D. J., ALVERDY J. C., AOYS E., MOSS G.S. (1989) Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Archives of Surgery Journal* 124, 1396–1399 p.

CARNEGIE P. R., ILIC M. Z., ETHERIDGE M. O., COLLINS M. G. (1983) Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balenine present in fresh meat. *Chromatographia* 261, 153-157 p.

CHABANCE B., JOLLES P., IZQUIERDO C., MAZOYER E., FRANCOUAL C., DROUET L., FIAT A. M. (1995) Characterization of an antithrombotic peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition* 73, 583–590 p.

CHEKMENEVA E., PRONES R., DIAZ-CRUZ J.-M., ARINO C., ESTEBAN M. (2008) Thermodynamics of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> binding by the phytochelatin (γ-Glu-Cys)<sub>4</sub>-Gly and its precursor glutathione. *Analytical Biochemistry*. 375, 82–89 p.

CHOUDHARY A. K., SUNDARESWARAN L., DEVI R. S. (2016) Aspartame induced cardiac oxidative stress in Wistar albino rats. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 30, 29–37 p.

CHRISTIAN B., MC CONNAUGHEY K., BETHEA E., BRANTLEY S., COFFEY A., HAMMOND L., HARRELL S., METCALF K., MUEHLENBEIN D., SPRUILL W., BRINSON L., MC CONNAUGHEY M. (2004) Chronic aspartame affects-maze performance, brain cholinergic receptors and Na, K-ATPase in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78, 121–127 p.

CLARE D. A., SWAISGOOD H. E. (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science* 83, 1187–1195 p.

CORNET M., BOUSSET J. (1999) Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between ‘red’ and ‘white’ muscles. *Meat Science* 51, 215–219 p.

CRUSH K. G. (1970) Carnosine and related substances in animal tissues. *Comparative Biochemistry Physiology*, 34, 3–30 p.

CUI H., LEON J., REUSAET E., BULT A. (1995) Selective determination of peptides containing specific amino acid residues by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Review Article Journal of Chromatography (A)* 704, 27–36 p.

DECKER E. A., CRUM A. D. (1993) Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Science*, 34, 245–253 p.

DUNKEL A., KÖSTER J., HOFMANN T. (2007) Molecular and sensory characterization of γ-glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55, 6712–6719 p.

DUNNETT M., HARRIS R. C., SOLIMAN M. Z., SUWAR A. A. S. (1997) Carnosine, anserine and taurine contents in individual fibres from the middle gluteal muscle of the camel. *Research in Veterinary Science* 62, 213–216 p.

DZIURLA M. A., LEROY P., STRÜMKMANN G. W., SALHI M., LEE D. U., CAMACHO P., HEINZ V., MÜLLER J. A., PAUL E., GINESTET P., AUDIC J. M., BLOCK J.C. (2004) Measurement of glutathione in activated sludges. *Water Research* 38, 236–244 p.

ERDMANN K., GROSSER N., SCHIPPOREIT K., SCHRÖDER H. (2006) The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *Journal of Nutrition* 136, 2148–2152 p.

FUKUDOME S., YOSHIKAWA M. (1993) Gluten exorphin-C. a novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Letters* 316, 17–19 p.

FÜRST P., KUHN K. S. (2000) Amino-acid substrates in newbottles: implications for clinical nutrition in the 21st century. *Nutrition* 6, 603–606

FÜRST P., POGAN K., STEHLE P. (1997) Glutamine dipeptides in clinical nutrition. *Nutrition* 13, 731–737 p.

GARCIA-FUENTES M., TRAPANI A., ALONSO M. J. (2006) Protection of the peptide glutathione by complex formation with  $\alpha$ -cyclodextrin: NMR spectroscopic analysis and stability study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64, 146–153 p.

GIBBS B. F., ALLI I., MULLIGAN C. (1996) Sweet and taste-modifying proteins: A review. *Nutrition Research* 16, 1619–1630 p.

GOETERS C., WENN A., MERTES N., WEMPE C., VAN AKEN H., STEHLE P., BONE H. G. (2002) Parenteral L-alanyl-L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 30, 2032–2037 p.

HARTMANN R., MEISEL H. (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology* 18, 163–169 p.

HAYES M., ROSS R. P., FITZGERALD G. F., HILL C., STANTON C. (2006) Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied Environmental Microbiology* 72, 2260–2264 p.

HEDING L. G. (1975) Radioimmunological determination of human C-peptide in serum *Diabetologia* 11, 541–548 p.

HERNÁNDEZ-LEDESMA B., DÁVALOS A., BARTOLOMÉ B, AMIGO L. (2005) Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 588–593 p.

HEYLAND D. K., DHALIWAL R., SUCHNER U., BERGER M. M. (2005) Antioxidant nutrients. A systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. *Intensive Care Medicine* 31, 327–337p.

HIRAYAMA A., IGARASHI K., TOMITA M., SOGA T. (2014) Development of quantitative method for determination of  $\gamma$ -glutamyl peptides by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry: An efficient approach avoiding matrix effect. *Journal of Chromatography (A)* 161–169 p.



HOLEČEK M., SKOPEC F., SKALSKÁ M., ŠPRONGL L. (2000) Effect of alanylglutamine on leucine and protein metabolism in endotoxemic rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 24, 215–222 p.

HOUTMAN C. J. (2010) Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences* 7, 271-295 p.

JÁMBOR A, MOLNÁR-PERL I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride Literature overview and further study (2009), *Journal of Chromatography (A)* 1216, 3064-3077 p.

JONAS C. R., PUCKETT A. B., JONES D. P., GRIFFITH D. P., SZESZYCKI E. E., BERGMAN G. F., FURR C.C., TYRE C., CARLSON J. L., GALLOWAY J. R., BLUMBERG J. B. ZIEGLER T. R. (2000) Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *American Journal of Clinical Nutrition* 72, 181–189 p.

KANTHA S. S., TAKEUCHI M., WATABE S., OCHI H. (2000) HPLC Determination of Carnosine in Commercial Canned Soups and Natural Meat Extracts. *LWT - Food Science and Technology* 33, 60–62 p.

KODERA T., NIO N. (2006) Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats. *Journal of Food Science* 71, 164–173 p.

KŐRÖS Á., HANCZKÓ R., JÁMBOR A., QIAN Y., PERL A., MOLNÁR-PERL I. (2007) Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their o-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by HPLC: A deproteinization study. *Journal of Chromatography (A)* 1149, 46–55 p.

LAMONT C., MILLER D. J. (1992) Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous, imidazoles in chemically skinned striated muscle. *Journal of Physiology* 454, 421–434 p.

LANCASTER J. E., SHAW M. L. (1991) Metabolism of  $\gamma$ -glutamyl peptides during development, storage and sprouting of onion bulbs Crop Research Division, *Phytochemistry* 30, 2857–2859 p.

LIMA A. I. G., ALMEIDA PEREIRA S. I., DE ALMEIDA PAULA FIGUERA E. M., CALDEIRA N., DE MATOS CALDEIRA H. D. Q. (2006) Cadmium detoxification in roots of

Pisum sativum seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alternations and growth. *Environmental and Experimental Botany* 55, 149–162 p.

MAC BURNEY M., YOUNG L. S., ZIEGLER T. R., WILMORE D. W. (1994) A costevaluation of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplant patients. *Journal of the American Dietetic Association* 94, 1263–1266 p.

MAGALHÃES L. M., SEGUNDO M. A., REIS S., LIMA J. L. F. C.. (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613, 1–19 p.

MARINOVICH M., GALLI C. L., BOSETTI C., GALLUS S., VECCHIA C. (2013) Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology* 60, 109–115 p.

MARTENSSON J., MEISTER A. (1989) Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 471–475 p.

MC CANN K., SHIELL B. J., MICHALSKI W. P., LEE A., WAN J., ROGINSKI H., COVENTRY M. J. (2006) Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine aS1-casein. *International Dairy Journal* 16, 316–323 p.

MIGUEL M., ALEIXANDRE A. (2006) Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *Journal of Nutrition* 136, 1457–1460 p.

MINE Y., KOVACS-NOLAN J. (2006) New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *Worlds Poult Science Journal* 62, 87–95 p.

MOINGT M., BRESSAC M., BÉLANGER D., AMYOT M. (2010) Role of ultra-violet radiation, mercury and copper on the stability of dissolved glutathione in natural and artificial freshwater and saltwater *Chemosphere* 80, 1314–1320 p.

MOREIRA A., KEKKONEN R. A., DELGADO L., FONSECA J., KORPELA R., HAAHTELA T. (2007) Nutritional modulation of exercise-induced immunodepression in athletes: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition* 61, 443–460 p.

MORELLI E., CRUZ B. H., SOMOVIGO S., SCARANO G. (2002) Speciation of cadmium- $\gamma$ -glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science*, 163, 807–813 p.

MORLION B. J., STEHLE P., WACHTLER P., SIEDHOFF H. P., KÖLLER M., KÖNIG W., FÜRST P., PUCHSTEIN C. (1998) Total parenteral nutrition with glutamine

dipeptide after major abdominal surgery: A randomized, double-blind, controlled study. *Annals of Surgery* 227, 302–308 p.

NAGAI T., SUZUKI N., NAGASHIMA T. (2006) Antioxidative activities and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of enzymatic hydrolysates from commercially available Kamaboko species. *Food Science and Technology* 12, 335–346 p.

NAGAOKA S., FUTAMURA Y., MIWA K., AWANO T., YAMAUCHI K., KANAMARU Y., TADASHI K., KUWATA T. (2001) Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk betalactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281, 11–17 p.

NISHIUCHI H., SUEHIRO M., SUGIMOTO R., YAMAGISHI K. (2013) Preparation of a  $\gamma$ -glutamylcysteine-enriched yeast extract from a newly developed GSH2-deficient strain, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115, 50–54 p.

ODASHIMA M., OTAKA M., JIN M., WADA I., HORIKAWA Y., MATSUHASHI T., OHBA R., HATAKEYAMA N., OYAKE J., WATANABE S. (2006) Zinc L-carnosine protects colonic mucosal injury through induction of heat shock protein 72 and suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Life Sciences* 2, 2245–2250 p.

PASTORE A., FEDERICI G., BERTINI E., PIEMONTE F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 333, 19–39 p.

PECK A. (1994) Intense sweeteners for bakery products. *American Institute of Baking Technology Bulletin* 16, 1–8 p.

PEIRETTI P. G., MEDANA C., VISENTIN S., GIANCOTTI V., ZUNINO V., MEINERI G. (2011) Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chemistry* 126, 1939–1947 p.

PRANKERD R. J., STONE H. W., SLOAN K. B., PERRIN J. H. (1992) Degradation of aspartame in acidic aqueous media and its stabilization by complexation with cyclodextrins or modified cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 88, 189–199 p.

ROGERO M. M., TIRAPEGUI J., PEDROSA R. G., CASTRO I. A., PIRES I. S. (2006) Effect of L-alanyl-L-glutamine supplementation on the plasma and tissue concentrations of glutamine in rats submitted to exhaustive exercise. *Nutrition* 22, 564–571 p.

SAETRE R., RABENSTEIN D. (1978) Determination of cysteine and glutathione in fruit by highperformance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 982–983 p.

SÁNCHEZ-VIOQUE R., GIRÓN-CALLE J., RODRIGUEZ-CONDE M. F., VIOQUE J., DE-LOS-MOZOS-PASCUAL M., SANTANA-MÉRIDAS O., IZQUIERDO-MELERO M. E., ALAIZ M. (2011) Determination of g-glutamyl-S-ethenyl-cysteine in narbon vetch (*Vicia narbonensis* L.) seeds by high performance liquid chromatography, *Animal Feed Science and Technology* 165, 125–130 p.

SARDESAI V. M., WALDSHAN T. H. (1991) Natural and synthetic intense sweeteners *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2, 236–244 p.

SCHIFFMAN S. S., GATLIN C. A. (1993) Sweeteners: State of knowledge review *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 17, 313–345 p.

SILVA S. V., MALCATA F. X. (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15, 1-15 p.

SIMINTZI I., SCHULPIS K. H., ANGELOGIANNI P., LIAPI, TSAKIRIS S. (2007) The effect of aspartame on acetylcholinesterase activity in hippocampal homogenates of suckling rats. *Pharmacological Research* 56, 155–159 p.

STEHLE P., ZANDER J., MERTES N., ALBERS S., PUCHSTEIN C., LAWIN P., FÜRST P. (1989) Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 1, 231–233 p.

SUN J-P., HAN Q., ZHANG X-Q, DING M-Y. (2014) Investigations on the degradation of aspartame using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chinese Chemical Letters* 25, 1259–1264 p.

SZIJARTO A., HAHN O., BATMUNKH E., STANGL R., KISS A., LOTZ G., SCHLAFF ZS., VÁLI L., BLÁZOVICS A., GERŐ D., SZABÓ CS., KUPCSULIK P., HARSÁNYI L. (2007) Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia–reperfusion model: Effects on microcirculation and antioxidant status in rats, *Clinical Nutrition* 26, 640–648 p.

TAKAHASHI M., FUKUNAGA H., KANETO H., FUKUDOME S., YOSHIKAWA M. (2000) Behavioral and pharmacological studies on gluten exorphin A5, a newly isolated bioactive food protein fragment, in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology* 84, 259–265 p.

TAPUHI Y., SCHMIDT D. E., LINDNER W., KARGER B. L. (1981) Dansylation of Amino Acids for High-Performance Liquid Chromatography Analysis, *Analytical Biochemistry* 115, 123–129 p.

TSOUBELI M. N., LABUZA T. P. (1991) Accelerated kinetic study of aspartame degradation in the neutral pH range. *Journal of Food Science* 56, 1671–1675 p.

TUBEROSO C. I. G., CONGIU F., SERRELI G., MAMELI S. (2015) Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD, *Food Chemistry* 175, 29–35 p.

VERCRUYSSSE L., VAN CAMP J., SMAGGHE G. (2005) ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8106–8115 p.

WALKER G., CAI F., SHEN P., REYNOLDS C., WARD B., FONE C., HONDA S., KOGANEI M., ODA M., REYNOLDS E. (2006) Increased remineralization of tooth enamel by milk containing added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of Dairy Research* 73, 74–78 p.

WANG C., HE H., ZHANG J., LI X., MA Z. (2016) High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC-diode array detection and HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis* 24, 95–104 p.

WANG W., DE MEJIA E. G. (2005) A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4, 63–78 p.

WANG Y., LI S-M., HE M-W. (2014) Fragmentation Characteristics and Utility of Immonium Ions for Peptide Identification by MALDI-TOF/TOF-Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 42, 1010–1016 p.

WETZEL C. R., BELL L. N. (1998) Chemical stability of encapsulated aspartame in cakes without added sugar. *Food Chemistry* 63, 33-37 p.

WIERZBICKA G. T., HAGEN T. M., JONES D. P. (1989) Glutathione in Food, *Journal of Food Composition and Analysis* 2, 327–337 p.

YAGASAKI M., TABATA H., HASHIMOTO S., (2005) Development of innovative dipeptide manufacturing process and its prospects. *Report Research and Development* 34, 25–35 p.

ZALOGA G. P., ROBERTS P. R., BLACK K. W., LIN M., ZAPATA-SUDO G., SUDO R. T., NELSON T. E. (1997) Carnosine is a novel peptide modulator, of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *American Journal of Physiology* 272, 462–468 p.

ZALOGA G. P., ROBERTS P. R., NELSON T. E. (1996) Carnosine: a novel peptide regulator of intracellular calcium and contractility in cardiac muscle. *New Horizons for Learning Journal* 4, 26–35 p.

ZAPATA-SUDO G., SUDO R. T., LIN M., NELSON T. E. (1997) Calcium-sensitizing function for the dipeptide carnosine in skeletal muscle contractility. *Cellular Physiology and Biochemistry* 7, 81–92 p.

ZENK M. H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants- a review, *Gene* 179, 21–30 p.

ZHU K. X., ZHOU M. H., QUIAN H. F. (2006) Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein Hydrolysates (WGPH) prepared with Alcalase. *Process Biochemistry* 41, 1296–1302 p.

## 11. ÁBRAJEGYZÉK

1. **ábra** Alanil-glutamin, L-alanil- $\gamma$ -L-glutamin szerkezeti képlete
2. **ábra** L-karnozin, (2S)-2-[(3-amino-1-oxopropil) amino]-3-(3H-imidazol-4-yl) propánsav szerkezeti képlete
3. **ábra** Glutation, (2S)-2-amino-5-[[[(2R)-1-(karboximetilamino)-1-oxo-3-szulfanilpropán-2-yl]-amino]-5-oxopentánsav szerkezeti képlete
4. **ábra**  $\gamma$ -glutamil-cisztein,  $\gamma$ -L-glutamil- L-cisztein szerkezeti képlete
5. **ábra** Aszpartám, N-(L-alfa-aszpartil)-L-fenilalanin-1-metilészter szerkezeti képlete
6. **ábra** a peptidek maximális abszorbancia hullámhosszának meghatározására használt Jasco V-650 spektrofotométer
7. **ábra** a kis molekula tömegű peptidek kromatográfias meghatározása során alkalmazott Agilent 1200 plus HPLC készülék
8. **ábra** a kutatott peptidek kromatográfias meghatározása során alkalmazott Shimadzu LC-2010 HPLC rendszer és PL-ELS 2100 detektor kapcsolt rendszerben
9. **ábra** a kutatás során alkalmazott Shimadzu LC-2010 folyadékkromatográf LC/MS 2010 detektorral kapcsolt rendszerben
10. **ábra** a vizsgált peptidek UV spektruma
11. **ábra** a vizsgált peptidek 195 nm hullámhosszon, diódasoros detektálás során kapott kromatogramja (L-karnozin (3,66 min.), Alanil-glutamin (3,78 min.), L-glutation (4,12 min.),  $\gamma$ -Glutamil-cisztein (4,48 min.), Aszpartám (5,07 min.))
12. **ábra** alanil-glutamin, L-karnozin és aszpartám ELS detektálást követően kapott kromatogramok és a vegyületek tömegspektrumai
13. **ábra** a peptid-fém komplexek kromatográfias értékelése ezüst, réz, cink és kadmium komplexképzők alkalmazása esetén
14. **ábra** kéntartalmú peptidek Cd-komplexált formájának folyadék-kromatográfias meghatározása (UV/VIS detektálás 203 nm)
15. **ábra** az L-glutation kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása
16. **ábra** az L-glutation kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása az elméleti és a tapasztalt tömegértékekkel
17. **ábra** az L-glutation kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása a fém-peptid komplexek kialakulásának lehetőségeivel
18. **ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása

- 19. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása az elméleti és a tapasztalt tömegértékekkel
- 20. ábra** az  $\gamma$ -glutamil-cisztein kadmiummal alkotott komplexének tömegspektrometriás detektálása a fém-peptid komplexek kialakulásának lehetőségeivel
- 21. ábra** Danzil-kloriddal származékolt peptidek maximális abszorbanciájának igazolására szolgáló UV/VIS spektrum az L-karnozin peptid példáján szemléltetve (forrás: saját szerkesztés)
- 22. ábra** az alanil-glutamin UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete danzil-kloriddal történt származékképzést követően  $R_t=9,05$  min. retenciós idő esetén
- 23. ábra** az alanil-glutamin tömegspektruma  $m/z=50-2000$  és  $m/z=50-460$
- 24. ábra** Danzil-kloriddal származékolt alanil-glutamil kalibrációs görbéje
- 25. ábra** az aszpartám UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete danzil-kloriddal történt származékképzést követően  $R_t=14,9$  min. retenciós idő esetén
- 26. ábra** az aszpartám tömegspektruma  $m/z=50-2000$  és  $m/z=50-550$
- 27. ábra** Danzil-kloriddal származékolt aszpartám kalibrációs görbéje
- 28. ábra** az L-karnozin UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete danzil-kloriddal történt származékképzést követően  $R_t=15,9$  min. retenciós idő esetén
- 29. ábra** az L-karnozin tömegspektruma  $m/z=50-2000$  és  $m/z=50-700$
- 30. ábra** Danzil-kloriddal származékolt L-karnozin kalibrációs görbéje
- 31. ábra** Danzil-kloriddal származékolt L-karnozin és aszpartám meghatározásához használt kalibrációs egyenesek meredekségének összehasonlítása
- 32. ábra** az Ala-Gln UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=27,9$  min. retenciós idő esetén
- 33. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolt alanil-glutamin kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően
- 34. ábra** az Apm UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=27,14$  min. retenciós idő esetén
- 35. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolt aszpartám kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően
- 36. ábra** az L-kar UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=28,0$  min. retenciós idő esetén
- 37. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolt L-karnozin kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően



- 38. ábra** a Gsh UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=7,60$  min. retenciós idő esetén
- 39. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolt L-glutation kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően
- 40. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein UV/VIS detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=5,90$  min. retenciós idő esetén
- 41. ábra** Orto-ftálaldehiddel származékolt  $\gamma$ -glutamil-cisztein kalibrációs görbéje diódasoros detektálást követően
- 42. ábra** az L-glutation fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=7,63$  min. retenciós idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe
- 43. ábra** a  $\gamma$ -glutamil-cisztein fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=5,97$  min. retenciós idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe
- 44. ábra** az aszpartám fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=27,24$  min. retenciós idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe
- 45. ábra** az L-karnozin fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=28,12$  min. retenciós idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe
- 46. ábra** az alanil-glutamin fluoreszcens detektálás során kapott kromatográfiás jele és szerkezeti képlete orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően  $R_t=27,94$  min. retenciós idő esetén és a peptid mennyiségi meghatározásához szükséges kalibrációs görbe
- 47. ábra** az aszpartám stabilitási viszonyai savas közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett
- 48. ábra** az aszpartám stabilitási viszonyai semleges közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett
- 49. ábra** az aszpartám stabilitási viszonyai keményítő mátrixban, komplexképző fémek alkalmazása mellett
- 50. ábra** az L-karnozin stabilitási viszonyai savas közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett
- 51. ábra** az L-karnozin stabilitási viszonyai semleges közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett
- 52. ábra** az L-karnozin stabilitási viszonyai keményítő mátrixban, komplexképző fémek alkalmazása mellett

**53. ábra** az L-glutation stabilitási viszonyai savas közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett

**54. ábra** az L-glutation stabilitási viszonyai semleges közegben, komplexképző fémek alkalmazása mellett

**55. ábra** a vizsgált peptidek FRAP módszer szerinti antioxidáns aktivitás meghatározása

**56. ábra** tejminta kromatográfiás vizsgálata során kapott kromatogram UV/VIS detektálás alkalmazásával, Danzil-kloriddal történő származékképzést követően. A retenciók idők ( $R_{t_{Ala-gln}}=9,17$  min,  $R_{t_{L-ka}}=15,03$  min és  $R_{t_{Apm}}=15,81$  min) kismértékű eltolódása figyelhető meg.  $X_1$ - $X_8$ : egyéb komponens

**57. ábra** tejminta kromatográfiás vizsgálata során kapott kromatogram fluoreszcens detektálás (RF) alkalmazásával, orto-ftálaldehid tioetanolos oldatával történő származékképzést követően. A retenciók idők ( $R_{t_{Gsh}}=5,96$  min és  $R_{t_{\gamma-glu-cis}}=7,61$  min) kismértékű eltolódása figyelhető meg.  $Y_1$ - $Y_3$ : egyéb komponens

**1. táblázat** a kifejlesztett kromatográfiás módszerek kimutatási határa, linearitási tartománya és visszamérési hatékonysága (forrás: saját szerkesztés)

**2. táblázat** kénmentes peptidek stabilitási viszonyai környezeti paraméterek függvényében, peptidek visszamért mennyisége és a mérésekhez tartozó szórás értékek százalékban kerültek megadásra (mintaszám=90, ismétlések száma=3)

**3. táblázat** tiol tartalmú peptidek stabilitási viszonyai környezeti paraméterek függvényében, a peptidek visszamért mennyisége és a mérésekhez tartozó szórás értékek százalékban kerültek megadásra (mintaszám=60, ismétlések száma=3)

**4. táblázat** a vizsgált peptidek antioxidáns aktivitási értékei FRAP módszer alapján, (mintaszám:15, ismétlésszám:3) (forrás: saját szerkesztés)

**5. táblázat** növényi alapanyagok peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszer segítségével

**6. táblázat** állati eredetű alapanyagok és élelmiszerek peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszer segítségével

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton fejezem ki köszönetem mindazok részére, akik hozzájárultak ahhoz, hogy kutató munkám elvégezhessem, a kutatás és az abban foglalt eredmények az elkészült dolgozatban közlésre kerülhessenek.

Köszönöm elsőként témavezetőmnek, Dr. Fodor Péternek, aki tanácsaival és iránymutatásával segítette munkám és a dolgozat elkészítését.

Köszönöm folyamatos szakmai irányítását és tanácsait Dr. Forgó Péternek, akinek támogatására és kritikai észrevételeire egyaránt számíthattam a kutatói munkám teljes időtartamában, így a disszertációm elkészítésében is mind szakmai, mind emberi téren.

Köszönöm segítségét Dr. Kiss Attila Péternek az Eszterházy Károly Főiskola Egerfood Regionális Tudásközpont korábbi főigazgatójának, kutatói munkám elindításában nyújtott támogatásért és a szakmai munkához szükséges feltételek biztosításáért.

Köszönetem fejezem ki Dr. Váczy Kálmán Zoltánnak az Eszterházy Károly Egyetem Élelmiszertudományi és Borászati Tudásközpont igazgatójának a disszertáció elkészítése során nyújtott támogatásért.

Hálával tartozom az Eszterházy Károly Egyetem Élelmiszertudományi és Borászati Tudásközpont, az Élelmiszertudományi Intézet és a Biológiai Intézet munkatársainak, akik kutatói éveim alatt számos szakmai tanáccsal segítettek munkám, szakmailag és emberileg is sokat tanulhattam tőlük.

Köszönöm támogatásukat rokonaimnak, barátaimnak, ismerőseimnek, és ismeretleneknek, akik az eddigiek során bíztattak, támogattak, vagy éppen kritizáltak, azonban tudom, minden esetben csak az én érdekemben tettek.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a támogatást és szeretetet Családomnak.

Páromnak, Erikának, aki a legnehezebb időkben is kitartó és megértő társ, erőt és magabiztosságot adó hitves.

Köszönöm édesanyámnak, húgomnak és testvéreimnek, akik mindenben támogattak, biztosították a családi otthont, a háttérrel és az erkölcsi támogatást életem során.

Köszönöm nagyszüleimnek, akik tapasztalatukkal és szeretetükkel segítettek egyenes, őszinte emberré válnom, támogattak és bíztattak a legnagyobb gondok közt is, melyet soha nem fogok elfeledni.