Élelmiszertudományi Kar

Szilárd fázisú extrakciós minta-előkészítés polifenolok HPLC-UV vizsgálatához

TDK dolgozat

Készítette: Molnár Petra Andrea
Biomérnök BSc. IV. évfolyam

Témavezető: Dr. Abrankó László

Készült: Budapesti Corvinus Egyetem

Alkalmazott kémia Tanszék

Budapest, 2013

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés 3

2. Irodalmi áttekintés 4

2.1. Polifenolokról általában 4

2.1.1. Flavonoidok 4

2.1.2. Fenolsavak 9

2.2. Polifenolok mérési módszerei 11

2.2.1. HPLC-UV 11

2.2.2. HPLC-MS 13

2.2.3. VRK 13

2.3. A szilárd fázisú extrakció 14

2.3.1. A minta-előkészítés szerepe 14

2.3.2. Az extrakció és az SPE jellemzői 14

2.3.3. Az SPE típusai, felépítése 16

2.3.4. Lépései 18

2.4. Célkitűzések a munka során 21

3.Anyag és módszer 22

3.1. Használt standardok, vegyszerek 22

3.2. Használt berendezések 23

3.2.1. SPE 23

3.2.2. HPLC 23

3.3. Alkalmazott módszerek 23

4.Kísérleti eredmények és értékelésük 25

4.1. Tesztelés standard oldatokkal 25

4.1.1. Flavonoidok 25

4.1.1.1. Mosási körülmények optimálása 27

4.1.1.2. Elúció körülményeinek optimálása 32

4.2. Tesztelés gyümölcsmintákkal 35

4.2.1. Szőlőmag-kivonatok vizsgálata 35

4.2.2. Vékonyréteg-kromatográfiás preparátumok vizsgálata 40

5. Irodalomjegyzék. 45

1. Bevezetés

A tudomány és a technológia folyamatos fejlődése lehetővé teszi, hogy fokozatosan egyre többet tudjunk meg a minket körülvevő világról, s persze az emberi test működésének megfejtése is rendkívüli fontossággal bír. Az egészség tudatos megőrzése, a betegségek megelőzése rohanó világunkban nem könnyű. A stressz egész életünkön át elkísér minket, az időhiány következtében nehéz mindig megfelelő életmódot folytatni. Hazánkban is megfigyelhető, hogy az emberek többsége az ajánlotthoz képest igen kis mennyiséget fogyaszt zöldségekből és gyümölcsökből, s nem sportol rendszeresen. Ez vélhetően hozzájárul a szív-és érrendszeri betegségek, valamint elhízáshoz köthető kórok és a rák előfordulásának magas számához. Az utóbbi időben azonban egyre inkább előtérbe kerül a megelőzés, melynek talán legfontosabb része a táplálkozás.

Gyermekkorunk óta hallhattuk, hogy milyen fontos elegendő gyümölcsöt, zöldséget fogyasztani. De miért is van ennek ekkora jelentősége? A növények számos olyan összetevővel rendelkeznek, melyek az emberi egészség megőrzésében igen fontos szerepet játszanak. Ezek a tulajdonságok a bennük rejlő számos értékes komponensből adódnak. Nagy mennyiségben tartalmaznak rostokat, emészthető szénhidrátokat, lipideket, ásványi anyagokat, vitaminokat, és egyéb másodlagos anyagcseretermékeket, mint amilyenek a polifenolok. A polifenolok csoportja régóta aktívan vizsgált vegyületcsoport, mivel élettani szerepük rendkívül sokrétű. Számos tanulmány készült, melyek igazolják a szervezetre széleskörűen gyakorolt jótékony hatásukat. Ezek a természetes vegyületek igen nagy mennyiségben vannak jelen a legtöbb zöldségben és gyümölcsben, gyógyfüvekben. Az élelmiszeriparban is érezhető a hatás, hiszen sok olyan új terméket hoztak létre, melyben a polifenol-tartalom növelése volt a cél. (Patika Magazin) Bár ma már számos esetben igazolt a szervezetben lejátszódó anyagcsere-folyamatok során bekövetkező változás, vagyis hogy a növényben megtalálható polifenol formák nem közvetlenül fejtik ki jótékony hatásaikat, mégis nagyon fontos a megfelelő mennyiségű bevitel. Az is bebizonyosodni látszik, hogy a vitaminok étrend-kiegészítőkénti szervezetbe juttatása nem elegendő, mivel számos típusuk polifenolokkal együtt tudja hatását kifejteni. A felszívódást befolyásolja, hogy milyen élelmiszerrel visszük be az adott vegyületet, s milyen annak biológiai hozzáférhetősége. A biológiai hozzáférhetőség azt írja le, hogy mennyire képes az adott anyag az emberi szervezet különféle transzport-és anyagcsere-folyamataiban részt venni.

A polifenolok családjába tartoznak a flavonoidok, nem-flavonoid típusú fenolok, lignánok, fenolsavak és stilbének. (phenol-explorer.eu) Jelen dolgozatban különféle flavonoidok és fenolsavak analitikai vizsgálatát szeretném bemutatni. A flavonoidok 15 szénatomot tartalmazó vegyületek, melyek legismertebb típusai, az antocianinok, a gyümölcsök és zöldségek színét adják a

karotinoidokkal együtt. A színnek az élővilágban fontos szerepe van. A virágok élénksége vonzza a méheket, melyek biztosítják szaporodásukat. Ezek a vegyületek a növényekben a másodlagos anyagcsere során képződnek, azaz nem az élő szervezet felépítésében van szerepük. Nem csak a szín az, ami miatt mégis hasznosak a termelő szervezetek számára. Részt vesznek ugyanis a növény védelmében (sugárzás, kórokozók, vírusok) és szabályozási folyamatokban is, sőt, vízmegtartó képességüket is növelik. (Crozier et al. 2006)

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Polifenolokról általában

A polifenolokra jellemző, hogy legalább egy aromás gyűrűvel rendelkeznek, melyhez egy vagy több hidroxil csoport kapcsolódik. Szigorú értelemben akkor beszélünk „poli"-fenolokról, ha legalább két hidroxil csoport található a molekulában. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a polifenolok elnevezése nem minden esetben a kémiai logikát követi, ezért nagyon sokszor a polifenolokhoz sorolnak olyan molekulákat is, amelyek kémiai értelemben nem volnának oda tartozók, ugyanakkor keletkezésük, előfordulásuk alapján tárgyalásuk e csoportban értelmezhető a legjobban (pl.: p-kumársav). A polifenolok nagyon változatos molekulacsalád, eddig több mint 8000 különféle struktúrát írtak le. A polifenolok két nagyobb csoportra bonthatók: a flavonoidokra és a nem flavonoid jellegű polifenolokra.(Crozier et al. 2006)

2.1.1. Flavonoidok

A flavonoidok vízoldható vegyületek, melyekre általánosan jellemző a C6-C3-C6 szerkezet. Két aromás gyűrűt tartalmaznak, melyek között egy három szénatomos rövid lánc található. Ezekhez természetesen számos más funkciós csoport is kapcsolódhat, melyek befolyásolják tulajdonságaikat. A növényekben elsősorban a levelek számítanak gazdag forrásnak, a gyümölcsökben, zöldségekben pedig a héjban fordulnak elő nagyobb mennyiségben. Sok flavonoidra jellemző, hogy a természetben cukormolekulával kapcsolódva, glikozid formában vannak jelen. (phytochemicals.info)
Főbb csoportjaik a flavonok, flavonolok, flavan-3-olok, izoflavonok, flavanonok és antocianidinek. (Crozier et al. 2006)

Az általam használt típusaik a következők voltak:

- daidzein
- cianidin-glikozid
- cianidin-rutinozid
- rutin
- kvercetin-glikozid
- kaempferol-rutinozid
- katechin
- klorogénsav

Daidzein

Az izoflavonok csoportjába tartozó vegyületre szintén jellemző a C6-C3-C6 szerkezet. Az izoflavonok rendelkeznek némi ergoszterin aktivitással, ebből adódóan fitoergoszterinnek is szokták nevezni ezt a csoportot. Az ergoszterin a növényekben található anyag, amely UV sugárzás hatására D vitaminná alakul. Egyik legjobb forrása a szója, amelyben glikozid (daidzin) formában található meg. Az anyagcsere-folyamatok révén szabadul föl belőlük a cukor nélküli forma, a daidzein. Ezen kívül fellehető a kudzuban (ázsiai kúszónövény) és a réti herében is.

Legtöbbször hozzájuk társított élettani hatások:

Erős antioxidáns, melyből fakadóan antikarcinogén, segít a koleszterin-szint szabályozásában és a csontritkulás megelőzésében is. Az emlőrák kezelése és megelőzése érdekében onkológiai kísérletekre is volt már példa. Azt vizsgálták, hogy a betegség előfordulásában régiónként mutatkozó nagy eltérések oka visszavezethető-e az étkezési szokásokra. Ez a fajta daganatos megbetegedés ugyanis az ázsiai országokban jellemző legkevésbé. A tanulmányban kifejtik, hogy a szójafogyasztás igen jelentős ezen országokban, viszont máshol kevésbé gyakori. A szójában számos flavonoid található, mint a daidzein és a glicitein, melyeknek már számos jótékony hatására derült fény. A szójaalapú étrend nagy valószínűséggel valóban hozzájárul az emlőrák megelőzéséhez. (He F. J. – Chen J-Q. 2013)

A csontszövet megújítását az úgynevezett osteoblastok végzik, ezeket a daidzein képes stimulálni. Ezáltal a csontszövet gyorsabban fejlődik és pótlódik, a csontritkulás folyamata lassítható vagy elkerülhető.

A hagyományos kínai orvoslásban fontos szerepet tölt be a kudzu (*Radix Puerariae*) nevű növény. Akkor még nem tudták, hogy jótékony hatása a magas daidzein tartalomnak köszönhető, mégis hatékonyan kezeltek vele alkoholfüggő betegeket, illetve az alkoholmérgezés tüneteinek

enyhítésére is kiválónak bizonyult. Ma a kísérletek laboratóriumi körülmények között rágcsálókkal zajlanak. (phytochemicals.info)

A cianidinek

A cianidinek vízoldható tulajdonságú anyagok, növényekben komplex formában vannak jelen. A cianidinekhez glikozidos kötéssel egy vagy több cukormolekula is kapcsolódhat. A cukor lehet glükóz, de xilóz, ramnóz és galaktóz is. Színe a kémhatás függvénye, erősen lúgos tartományban (kb pH=11 fölötti értékeknél) színtelen kalkonokká alakulnak. Színe a pH 6-7 tartományban jellemzően kékes színű, a pH 3-6 tartományban lilás, míg savas közegben (kb pH=3 alatt) élénkpiros. Számos gyümölcsben föllelhető, mint az alma, körte, barack és szilva. Gazdag cianidin források a bogyós gyümölcsök, mint a bodza, fekete ribizli, málna, áfonya, szeder, galagonya és a cseresznye is. Érdemes a héjukkal együtt fogyasztani őket, mivel a legtöbb antocianin ott halmozódik föl. A természetben több mint 600 típusuk fordul elő.(Ge Q., Ma X. 2013)

<u>Legtöbbször hozzájuk társított élettani hatások:</u>

- Anti-toxikus hatás: Különösen a mikotoxinok elleni védő szerepe jelentős. A penészgombák (Aspergillus sp., Penicillium verrucosum) által termelt B1-es típusú aflatoxin és ochratoxin A az élelmiszeriparban is sok problémát okozott, mivel az emberi szervezetre veszélyes. Felszívódva karcinogén hatású, valamint a DNS-ben oxidatív károkat okoz (mutagén). Az ochratoxin ráadásul neurotoxikus és immunszupresszív hatással is bír. A cianidinek képesek a negatív hatások egy részét csökkenteni vagy kivédeni az oxidatív folyamatok akadályozásával.
- Cukorbetegség: A cianidinek csökkentik a vércukorszintet, valamint serkentik az inzulintermelést.
- Rákmegelőző: Elősegítik a természetes sejthalál lefolyását az egyébként folyamatosan osztódó rákos sejteknél, továbbá gátolják a kóros sejtszaporodást. Csökkentik a tüdő, prosztata, bőr, vastagbél rákos megbetegedéseinek és a leukémiának az előfordulását. Antioxidáns hatása révén a DNS oxidatív károsodását is csökkenti a mutációs folyamatok során.
- Gyulladáscsökkentő: Az oxidációs folyamatok egyik melléktermék a malonaldehid, szintjének ellenőrzése az oxidatív stressz igazolására szolgál. A cianidinek képesek

csökkentetni a malonaldehid szintet a vérben, s az ízületi gyulladások enyhítésére is alkalmasak.

- A bőr védelme: A minket folyamatosan érő UV sugárzás következtében bőrünkben káros folyamatok indulhatnak meg. Az oxidatív stressz fokozatosan károsodáshoz, sejthalálhoz vagy bőrrákhoz vezethet. A cianidinek a tumorsejtek kialakulását gátolják, s az oxidatív stresszt is enyhítik.
- Isémia: Veszélyes betegség, mely során a keringés zavara miatt egy szerv bizonyos részén átmenetileg nem megfelelő a vérellátás. Ez idő alatt szöveti károsodás léphet föl, melyet a cianidinek képesek csökkentetni.
- Szívbetegségek: A szív megfelelő működéséhez szükséges enzimek egy részének stimulációjára képes. (phytochemicals.info)

A cianidin-glikozid és a cianidin-rutinozid egyaránt az antocianidinek csoportjába tartozó flavonoidok. A 15 szénatomot tartalmazó molekulák kettő benzolgyűrűből és egy rövid szénláncból állnak. Vízoldható anyagok, élénk színt biztosítanak a növények leveleinek, virágainak, gyümölcseinek. Föllelhetőek továbbá a szövetekben, gyökerekben és a növény egyéb részeiben is. Színük jellemzően piros, lila vagy kék árnyalatokban fordul elő. A szövetek számára az UV sugárzás miatt fontosak, meggátolják annak károsító hatását. Stabilitásuk viszonylag kicsi, ebből adódóan elfogyasztva sem túl nagy a felszívódási arányuk a fellépő degradáció következtében. Laboratóriumi körülmények között erős antioxidáns hatásuk jobban érvényesíthető. A természetben általában glikozid formában fordulnak elő. (Crozier et al. 2006)

Kvercetin

Az élelmiszerekben cukorhoz kötött formában fordul elő (kvercetin-glikozid, rutin). Más flavonoidok építőköveként is ismert. Legnagyobb mennyiségben az almában, káposztában, csonthéjasokban, hagymában, bogyós gyümölcsökben és teákban találkozhatunk vele, de előfordul borban, sörben, kakaótartalmú élelmiszerekben is. A flavonolok közé tartozik.

<u>Legtöbbször hozzájuk társított élettani hatások:</u>

Főként az enzimrendszerre gyakorolt hatása miatt effektív. (Duenas et al. 2010)
Enzimek expresszióját szabályozza, gátolja a lipoxigenázokat, mely révén gyulladáscsökkentő. Segít a kardiovaszkuláris megbetegedések megelőzésében, anti-allergén és anti-toxikus jelleget is mutat. A természetes sejthalál megfelelő működésében is van szerepe. Ebből adódóan számos szerv rákos megbetegedésének előfordulását csökkentheti, mint a mell, méhnyak, prosztata, és gyomor.

Kimutatták, hogy a sok almát fogyasztó emberek körében a tüdőfunkció jelentősen jobb, valamint szignifikánsan kisebb a tüdőbetegségek előfordulása is (asztma, hörghurut). A vércukorszintre is jótékony hatással van a fokozott bevitel. A szívbetegségek terén hatása úgy nyilvánul meg, hogy csökkenti a vérnyomást, gátolja az LDL koleszterin oxidációs folyamatait, ezáltal az infarktus valószínűsége is csökken.

Érdekes „mellékhatásként" megfigyelték, hogy teljesítményfokozó hatással is bír. Ezt a mitokondriumokra kifejtett stimuláló hatással magyarázzák. (phytochemicals.info)

Rutin

A kvercetin és a rutinóz nevű diszacharid építi föl ezt a sárga vagy sárgászöld színű flavonoidot. Széles körben föllehető a növényvilágban, megtalálható az almában, teákban, citrusfélékben.

Legtöbbször hozzájuk társított élettani hatások:

Az oxidált LDL koleszterin szintjét csökkentve gátolja annak citotoxikus hatását, ezáltal védi az érrendszert, a szívet. Az érfalakat erősítve a vérzékenység kezelésében is hasznos lehet, valamint segít a visszeres tágulatok megelőzésében is. Szintén rendelkezik gyulladáscsökkentő és gyógyulássegítő hatással. Kimutatták, hogy az aszkorbinsav és a rutin együttes fogyasztása során az aszkorbinsav hatása erősödik. Bár a mechanizmus még nem teljesen tisztázott, valószínűleg stabilizálja azt. (phytochemicals.info)

Kaempferol-rutinozid

Tiszta formában sárga színű, porszerű anyag, mely a flavonolok csoportjába tartozik. Fellelhető az almában, vörösborban, citrusfélékben, szőlőben, hagymában, diófélékben, hüvelyes termésekben és a ginko biloba növényben is. (phenol-explorer.eu)

Legtöbbször hozzá társított élettani hatások:

Gátolja a rákos sejtek létrejöttét, valamint kiemelkedő szerepe van a szív-és érrendszer védelmében is. Gátolja az MPC-1 fehérje képződését, amely plakkot képez az erek falain. Az alacsony denzitású lipoproteinek oxidációs folyamatainak gátlásával védi az érfalat.

A rákkutatásban zajló kísérletek során rájöttek, hogy a kaempferol és a kvercetin a rákos sejtek sokszorozódásakor szinergistaként viselkedik. Együttes alkalmazásukkal nagyobb hatékonyság érhető el. Onkológiai gyógyszerekkel kombinálva csökkenti a rákos sejtek ellenállását azokkal szemben. (phytochemicals.info)

Katechin

A katechint széles körben használják fiatalító ápolószerekben, mivel antioxidáns jellegéből adódóan a szabad gyököket semlegesíti, ezen túlmenően erős antifungiális és antimikrobás hatással is bír. A tumorsejtek növekedését képes gátolni, valamint csökkenti az LDL koleszterin szintet is. (Duenas et al. 2010)

Legtöbbször hozzá társított élettani hatások:

Egy tanulmány során szájon keresztül bejuttatott katechin hatását vizsgálták patkányok vérében. Az adagolást követően megfigyelték, hogy csökkent a vérben a hidrogén-peroxid, és nőtt a Hem mennyisége. (Cueno et al. 2013)

A klórpirifosz egy rovarirtó szer, melyet a mezőgazdaságban kezdtek alkalmazni, nagy mennyiségben felhalmozódva az emberi szervezetre is veszélyt jelent. Ebből adódóan vizsgálni kezdték patkányokban, hogy flavonoidokkal különböző kombinációkban bejuttatva milyen hatások figyelhetők meg. A katechinnel és kvercetinnel együtt bejuttatott klórpirifosz a sima klórpirifosszal kezelt egyedekhez képest csökkent malonaldehid, kataláz és szuperoxid-dimutáz szintet mutatott. (Kalender et al. 2012.)

2.1.2 Fenolsavak

A fenolsavak a nem flavonoid jellegű polifenolok csoportjába tartozó vegyületek.
A fenolsavak közé tartoznak a hidroxi-fahéjsavak, ebbe a kategóriába sorolható a kávésav, a ferulasav és a klorogénsav is. A flavoniodokon belül az egyszerűbb felépítésűek közé tartoznak, fenil-alaninból jönnek létre. Széles körben megtalálhatók a növényekben, kávéban, teában. (Crozier et al. 2006)

Kávésav és klorogénsav

Mivel ez a két vegyület hasonló tulajdonságokat mutat, előfordul, hogy együttesen alkalmazzák a kísérletek során. A klorogénsav a kávésav és a kinasav észtere, s a kávésavval együtt nagy mennyiségben jelen van a kávéban.

Legtöbbször hozzájuk társított élettani hatások:

Segítenek a szív és erek egészségének megőrzésében, az elhízás megelőzésében, kísérletek bizonyítják, hogy képesek csökkenteni az idegsejtek pusztulását és a hegszövetek kialakulását agyi traumák során. Egy kísérletben a két fenolsav felszívódását vizsgálták ileosztómával rendelkező embereken. (Olthof; Hollmann 2001) Ebből adódóan ellenőrizhetővé vált, hogy a vastagbélbe jutás előtt a bejuttatott vegyületek hány százaléka szívódik föl, s hány százaléka ürül a vizelettel illetve széklettel. Eredményeik azt mutatják, hogy a kávésav igen nagy arányban a vékonybélből képes fölszívódni, a klorogénsavnak viszont nagy része kiürül a szervezetből.

Elhízott, inzulin rezisztens patkányokon azt vizsgálták, hogy a klorogénsavval dúsított étrend hatására hogyan változik a vércukorszint, a koleszterinszint és egy zsírsav (triacil-glicerin) szintje a vérben és a májban. 3 hét kezelés után szignifikáns csökkenést mutattak ki a két csoport között, ez a különbség esetenként elérte az 50%-os átlagértéket is. (Rodriguez et al. 2002)

A polifenolok valós élettani hatásai

A polifenolok jótékony élettani hatásairól temérdek irodalom és információ található (lásd korábbi fejezetek). Ennek ellenére ma már tudományos körökben egyre inkább elfogadott, hogy a különböző polifenolokhoz társított és (főként) a korábbi irodalmakban leírt számos jótékony élettani hatást a legtöbb esetben fenntartással kell kezelni. Ennek oka, hogy a legtöbb kísérletet a növényekben csak elenyésző mértékben előforduló szabad formákkal (aglikonok) végzik. Az is megfigyelhető, hogy általában e molekulák tenyésztett sejtvonalakra gyakorolt jótékony biológiai hatásait vetítik ki úgy, minta az igazolt volna a teljes emberi szervezet esetén. Ez azért kétséges, mert például a növényekben glikozid formában jelen levő flavonoidok a lebontó anyagcsere folyamatokat követően a legtöbb esetben aglikonként (szabad formaként) közvetlenül nem jutnak el a biológiai hatás céljaként tekintett sejtekig. A növények elfogyasztásával bevitt polifenolok sokszor összetett anyagcsere utakon keresztül, különböző katabolitok formájában jutnak el a sejtekhez. Mindezeken túl e katabolitok messze alacsonyabb koncentrációban lesznek jelen a célsejteknél, mint a legtöbb kísérlet esetén az irreleváns molekulából alkalmazott mM nagyságrendű koncentráció.

Mindezek még inkább lendületet és jelentőséget adhatnak a polifenolok valós élettani szempontból is megalapozott jótékony hatásainak vizsgálatára, mely vizsgálatokhoz alapvető

fontosságú a megfelelő analitikai módszerek megléte. (Crozier et al. 2010. Del Rio et al. 2013.; Holst et al. 2008.)

2.2. Polifenolok mérési módszerei

Mivel a polifenolok csoportja rendkívül sokszínű, az analitikai meghatározásuk sem egyszerű. A számos vegyület eltérő tulajdonságokkal bír, amely megmutatkozik a kémiai szerkezetben, molekulatömegben, polaritásban. Ebből adódóan más és más mérési módszerek tekinthetők ideálisnak egyes típusaikhoz. Azonban azt mondhatjuk, hogy általánosságban alkalmazható a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és a tömegspektrometria (MS), mivel ezeknél speciális módszereket fejleszthetünk ki a különféle tulajdonságok kihasználására, legyen szó minta-előkészítésről, megfelelő oszlopválasztásról vagy a megfelelő eluensek kiválasztásáról. Alkalmazzák még az UV tartományú spektrofotometriás mérési módszert és a VRK-t (vékonyréteg kromatográfia) is, de ez nem minden típusnál reprodukálható vagy kivitelezhető.

2.2.1. HPLC-UV

A kromatográfia, akárcsak az extrakció, a fázisok közötti megoszláson alapuló elválasztástechnikai módszerek közé tartozik. Azonban míg az extrakció célja az alkotók kivonása, addig a kromatográfia során azok elválasztására törekszünk. Nagyfokú elválasztási képességének oka a folyamat során lejátszódó többszöri oda-vissza megoszlás. Mindig van egy mozgó és egy álló fázis, melyek határfelületén jön létre az elválasztás.

Felépítését tekintve minden berendezés rendelkezik eluenstartóval, amely a szükséges vegyszerek biztonságos tárolását teszi lehetővé. Az üvegekbe csatlakozó, szűrővel ellátott csöveken át jutnak be a folyadékok a gáztalanítóba, mely biztosítja a buborékmentes továbbhaladást. A pumpa teszi lehetővé az áramlást, megadhatjuk az áramlási sebességet és a pontos keverési arányt. Az injektor biztosítja a minta pillanatszerű bejuttatását a folyadékáramba, majd az oszlopra. Az injektor és mintatartó tér a fejlettebb eszközökben hűthető. Az oszlopot általában hőmérséklet tekintetében szabályozható egységbe köthetjük be. A detektor teszi lehetővé az áramló folyadékban fellehető anyagok mérését. Ma a legfejlettebb detektorok az ún. diódasoros (DAD-UV/VIS) típusba tartoznak. Ennek előnye, hogy a megvilágító fény teljes spektrumában képes adatokat rögzíteni. Ennél fogva nagyon részletes eredményeket kaphatunk. Frakciószedőt is kapcsolhatunk az eddigi

elemekhez, vagy elvezethetjük a lecsöpögő folyadékot. A HPLC-UV a legelterjedtebb analitikai kapcsolt rendszer. A kapcsolt rendszer önagában is működőképes műszerek összekapcsolásával hozható létre. Ilyen a HPLC-MS is. Mivel a kapcsolt rendszerek költségesek, általában a különböző részeket külön-külön is beszerezhetjük, ezáltal biztosítva a bővíthetőséget. A HPLC-UV/VIS elterjedésének legfőbb okai, hogy rendkívül sok vegyület közvetlen mérésre alkalmas, és számos további vegyület származékképzéssel alkalmassá tehető erre. A HPLC-UV/VIS kombináció hátránya, hogy az azonos kromofór csoporttal rendelkező, különböző polifenolokat nem lehet megkülönböztetni. (Kremmer; Torkos, 2010).

A polifenolok sok, eltérő szerkezetű variációja miatt nem lehet olyan hullámhossz tartományt találni, amelyen mindegyik optimálisan mérhető. A 280 nm-en történő detektálás igen gyakori, de a különféle csoportokra megállapítottak általánosan megfelelő hullámhosszt. Flavonok esetén ez 290 nm, katechineknél 210 vagy 280, flavonok és flavonolok mérésekor 270 vagy 330 és 365 közötti értékek javasoltak, izoflavonoknál 236 nm, anticianinoknál pedig 502 vagy 520 nm. (Andersen; Markham, 2006.)

A HPLC-nél szilikagél alapú oszlopok (C18, RP 18, ODS, C8) széles skálájával zajlottak az optimálási kísérletek. Leginkább a C18-as szilikagél alapú töltetek használata jellemző, a C8-as típus egyre ritkább. A C18-as oszlopoknál a több hidroxil-csoporttal rendelkező komponensek eluálódnak előbb, valamint a flavonoid glikozidok az aglikonok előtt. A gardiens elúció gyakori, lényege, hogy a hatékonyabb elválasztás érdekében előre meghatározott program szerint, időben változó összetételű mobilfázis-összetételt alkalmazunk. Az eluensek általában egy vizes és egy (vízzel elegyedő) szerves oldószeres (acetonitril, metanol, izopropanol, tetrahidrofurán) elegyből állnak, melyekben kis mennyiségben sav is jelen lehet. Erre polifenolok esetén azért van szükség, mert a savas közeg visszaszorítja az ionizációt, szebb kromatogramot kapunk. A fordított fázisú elválasztás sokkal gyakoribb, mint a normál fázisú. A normál fázis alkalmazása csak nagyon apoláros flavonoidok esetén jellemző. Az antocianinok meghatározásához ideális a C18-as fordított fázis, de figyelembe kell venni, hogy szerkezetük a mátrix kémhatásától függően változik. Mivel nem csak ennél a csoportnál jelentkezhetnek speciális igények, azt mondhatjuk, hogy nem lehet olyan módszert kifejleszteni, amely minden polifenol meghatározását lehetővé teszi. Születtek azonban jó eredmények az erre irányuló kísérletek során, melyeknek a nagy részét szintén a C18-as oszlopokkal, gradiens elúcióval végezték el. A legjobbnak bizonyuló oszlopparaméterek a következők voltak: A belső átmérő 2-5 mm-ig változott, a hossz 100-300 mm-ig, a pórusméret pedig 3-10µm között. (Andersen; Markman, 2006.)

2.2.2. HPLC-MS

A nagyműszeres analitika terén a HPLC-MS kapcsolt rendszer kialakítása nagy áttörést jelentett. Kihasználhatjuk a HPLC előnyeit az elválasztás terén, míg az azonosításban az MS az egyik legnagyobb érzékenységgel bíró műszer. Nagyfokú elterjedése annak köszönhető, hogy az egyre szélesebb körű alkalmazhatóság mellett az ára és mérete csökkenést mutat. A tömegspektrometirás analízis szerkezeti információt szolgáltat, meghatározhatjuk a molekulatömeget, ezáltal minőségi azonosításra ad lehetőséget. Így a HPLC-vel kombinálva hatékony és gyors azonosítási lehetőséget kapunk olyan mintáknál is, melyek több flavonoidot is tartalmaznak. A klasszikus MS és a tandem (MS/MS) is nagy szerepet kap a polifenolok vizsgálatában. (Andersen; Markham, 2006.)

2.2.3. VRK

A vékonyréteg kromatográfia a planáris folyadékkromatográfiai eljárások közé tartozik. Lényege, hogy az álló fázis egy vékony üveg, alumínium vagy műanyag lapra fölvitt réteg. Ez gyakran szilikagél, szemcsemérete 5-15 µm. Egyre gyakrabban alkalmaznak módosított szilikagélt is (C8, C18), melyeknek ára is magasabb. Az álló fázis vastagsága 0,1-0,2 mm. Erre vihetjük föl a mintát meghatározott mennyiségben és módon, majd a folyadék fázissal érintkezésbe lépve fölfuttatjuk azt. A módszer előnye, hogy az elválasztási idő rövid, egyszerre több mintát is fölvihetünk egy lapra, minőségi és mennyiségi analízisre egyaránt alkalmazható. A flavonoidok elválasztásában is gyakori a használatuk.

Az aglikonok esetében (pl: kvercetin) apoláris oldószerrel kell végeznünk az elválasztást, mint például kloroform-metanol elegy. A rutin vizsgálatához etil-metil-keton használata javasolt. A kvercetin meghatározható diizopropil-éter-hangyasav eleggyel.

A kiértékeléshez vagy láthatóvá kell tennünk a vizsgálni kívánt komponenseket, vagy fluoreszcencia jelenséget mutató alkotókat tartalmazó szilikagélt kell használnunk. Utóbbi esetnél 254 nm-es megvilágításnál a komponensek nem mutatnak elnyelést, sötét foltként jelennek meg a világító háttérben. Ennél azonban sokkal szelektívebb meghatározást érhetünk el származékképzéssel. Ehhez olyan segédanyagot kell alkalmaznunk, mely az általunk vizsgált polifenolokkal komplexet képezve adott hullámhosszon detektálható. Kiválóan alkalmazható segédanyagként a difenilbórsav-β-etilamino-észter 1%-os metanolos oldata, vagy polietilén-glikol 5%-os etanolos oldata. Utóbbi csökkenti a detektálási határt 10µg-ról 2,5 µg-ra. (Andersen; Markman, 2006.; Dr Hoffmann, 2013)

2.3. A szilárd fázisú extrakció

2.3.1. A minta-előkészítés szerepe

A fejlett, nagyműszeres analitikai eszközök használatakor figyelembe kell vennünk azok korlátait is. Általában a vizsgálandó minták korántsem alkalmasak a közvetlen mérésre, a minta-előkészítés legtöbbször nélkülözhetetlen lépés. Célja, hogy a mérési módszerrel és a műszerrel is kompatibilis formába hozzuk a mintát. Ebbe beletartozik a megfelelő koncentráció, halmazállapot, homogenitás, injektálhatóság, a műszerre nézve károsító hatással nem bíró állapot.

A nagyszámú mérési lehetőség nagyszámú minta-előkészítési lehetőséget eredményezett, melyeket az egyszerű és összetett módszerek csoportjába sorolhatjuk. Az egyszerű módszerek közé tartozik az extrakció mellett a különféle fizikai megoldások csoportja (szárítás, centrifugálás, szűrés, stb.). Összetett minta-előkészítésnek tekinthető az elektroforézis, ultracentrifugálás és kromatográfia. (Kremmer; Torkos, 2010)

2.3.2. Az extrakció és az SPE jellemzői

Az extrakció célja a meghatározandó komponensek kinyerése a mintából. Használható minta-előkészítési módszerként a zavaró alkotók eltávolítására, dúsításra. Az extrakció során kinyerésre használt közeget extrahálószernek, a kinyert frakciót pedig extraktumnak nevezzük.
Típusai:

- Folyadék-folyadék extrakció (megosztás): folyadék mintából folyadékkal nyerjük ki a mérendő alkotót
- Szilárd-folyadék extrakció (kioldás): szilárd mintából folyadék extrahálószerrel nyerjük ki a mérendő alkotót
- Folyadék-szilárd extrakció (szorpciós extrakció): folyadék mintából szilárd extrahálószerrel nyerjük ki a mérendő alkotót

A szorpciós extrakció

A szilárd fázisú extrakció is a szorpciós extrakciós technikák közé tartozik. A szilárd fázisú extrakció során a fölvitt minta komponenseinek elválasztása a szilárd fázis pórusokkal megnövelt felületén való megkötődés, illetve a felületen megtalálható folyadékfilmben történő megoszlás által

következik be. A folyékony mintában található komponensek egy része megkötődik a szilárd fázison vagy fázisban. Amennyiben felületi megkötődésre kerül sor, adszorpcióról beszélünk, ha pedig a komponensek a másik fázisba behatolva kötődnek meg, abszorpciónak nevezzük. Az alkalmazott szorbens minősége határozza meg a domináns szorpciós folyamatot. Adszorpció jellemző a porózus szemcsékből álló szilikagél használatakor, míg apoláris folyadékfilm bevonatot tartalmazó szorbenseknél abszorpciós folyamat jön létre.

A szilárd fázisú extrakció során a fölvitt minta komponenseinek kémiai elválasztása a szilárd fázis pórusokkal megnövelt felületén való megkötődés által következik be. Szelektív oldószeres mosással kinyerhetjük a számunkra fontos megkötött alkotókat. Az SPE célja a minta előkészítése további analitikai elemzéshez.
Számos egyéb minta-előkészítési módszer létezik, mégis a szilárd fázisú extrakció rendelkezik néhány vitathatatlanul nagy előnnyel a többihez képest.

3 fő előnye:

1. Összetett mátrix esetén is egyszerűen kinyerhető a fontos komponens

Számos esetben előfordul, hogy olyan mintával van dolgunk, amely a számunkra fontos alkotó mellett sok más komponenst is tartalmaz. Ez azért probléma, mert a többi komponenst zavarhatja a mérést azáltal, hogy jelet ad a detektálás során. Ezt a jelenséget analitikai interferenciának nevezzük. Ha tisztítás nélkül visszük föl a mintát mondjuk HPLC oszlopra, akkor könnyen lehet hogy az adott detektálási hullámhosszon, amin a mérni kívánt alkotónak van elnyelése, néhány egyéb alkotónak is lesz. Ilyenkor összetett, sok csúcsból álló kromatogramot fogunk eredményül kapni, amely megnehezíti az azonosítást és értékelést.

Azzal is számolnunk kell, hogy az ismeretlen, interferenciát okozó alkotók a műszerben is kárt tehetnek azáltal, hogy az injektálások során például lerakódnak, rétegeket képeznek. Ezek miatt fontos a minta-előkészítés során a lehető legtöbb zavaró tényezőt kizárni.

2. A minta frakcionálhatósága

Ha sok komponensből álló mintaoldatunknál nem ismerjük az alkotókat, keresnünk kell olyan tulajdonságokat, amelyek alapján csoportokat képezhetünk belőlük. Fejleszthetünk olyan SPE módszert, mely segítségével adott tulajdonságok alapján az alkotók elválaszthatók, például polaritásuk alapján. A külön gyűjtött frakciók további elemzése egyszerűbb, mivel a frakciók alkotói hasonló tulajdonságokat mutatnak.

3. Igen alacsony koncentráció esetén is dúsítást érhetünk el vele

Előfordul, hogy olyan mintával kell dolgoznunk, melyekben a kimutatni kívánt alkotók koncentrációja kicsi, esetleg nem éri el a kimutatási határt. Ilyen esetekben az SPE a legjobb minta-előkészítési módszer, ami szóba jöhet.

További előnyös jellemzői közé tartozik, hogy kimerítő extrakciót érhetünk el vele, azaz az oszlopról minden komponenst el lehet távolítani. Viszont méretezni és optimálni kell, ami esetenként hosszú folyamat. A folyadék-folyadék extrakcióhoz képest oldószerfogyasztása kisebb mértékű, valamint az emulzióképződés is kevésbé jelent problémát az SPE alkalmazásakor. Tiszta folyadékok esetén közvetlenül is alkalmazható, s egyéb esetekben sem igényel speciális előkészítési lépéseket.

2.3.3. Az SPE típusai, felépítése

Típusai

Akárcsak a folyadékkromatográfiában, az SPE-ben is megtalálhatók különféle elválasztási technikák.

Legfőbb típusai:

- Polaritáson alapuló
- Elektromos töltésen alapuló (ioncserés)
- Affinitáson alapuló

Polaritáson alapuló elválasztás

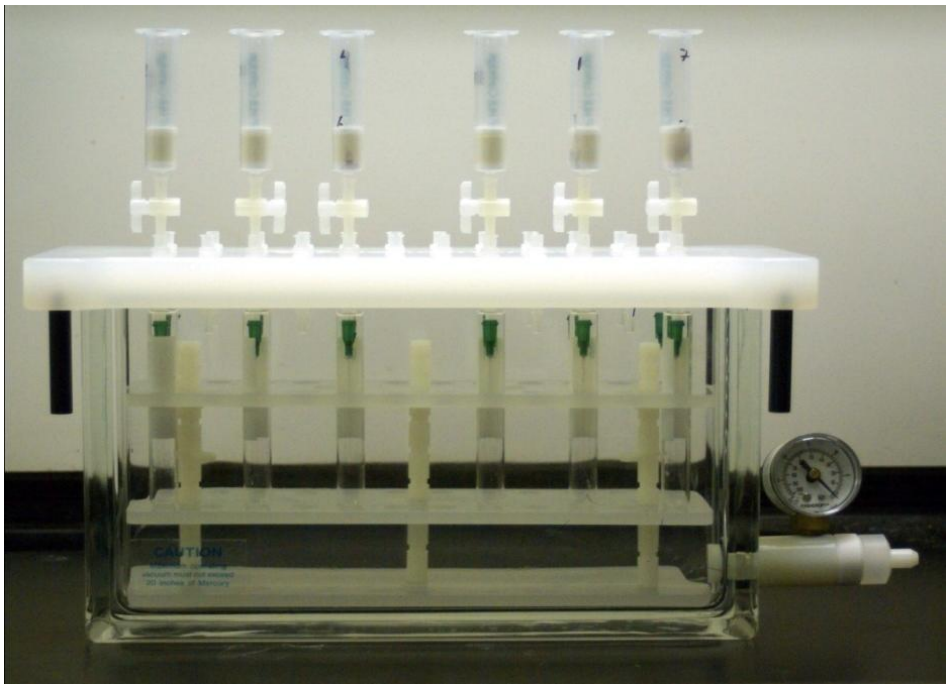
A molekulák polaritása függ az alkotó atomok elektronegativitása közti eltéréstől, a nemkötő elektronpároktól és a molekula alakjától. Ennél a módszernél a mérendő alkotók poláris vagy apoláris mivoltára alapozhatjuk az elválasztást. Érvényesül a hasonló a hasonlóval elv, vagyis a hasonló polaritású molekulák vonzzák egymást, a kevésbé hasonlóak között pedig nagyon gyenge, vagy semmilyen kötődés nem alakul ki. Ebből adódóan az álló és a mozgó fázis polaritása eltérő kell, hogy legyen, de az erősség szabályozható. Az erősség értelmezésénél érdemes megjegyezni, hogy normál fázis alkalmazásakor a víz is erősnek számít, mivel polaritásából adódóan képes az analitokat leszorítani a töltetről. Ha a mintában több, eltérő polaritású analit van jelen, akkor a stacioner fázissal megegyező polaritású alkotók később fognak eluálódni, mivel erősebben kötődnek. Ennél a technikánál is alkalmazhatunk normál és fordított fázist. Normál fázisról beszélünk poláris töltet esetén, fordítottról pedig apoláris töltet esetén.

Felépítése

Az SPE a kevésbé költséges minta-előkészítési módszerek közé tartozik, felépítése sem túl bonyolult. Az általam használt berendezés főbb részeit képezte a vákuumgenerátor, egy üvegkád, benne mintatartó állványzat, csőcsonkok, a csőcsonkokat lezáró kupakok.
Az egyik kulcsfontosságú tényező a folyadék áramlásának biztosítása.
Ennek főbb módjai:

- Gravitáció
- Nyomás
- Vákuum

A vákuum alkalmazása igen gyakori, jól szabályozható, egyszerű felépítésű berendezéseket tesz lehetővé. Az üvegkád jobb alsó sarkába csatlakozik a vákuum pumpa és itt található egy szabályozó szelep is. A benne lévő állványzat állítható magasságú, szükség esetén el is távolítható. Kialakításának köszönhetően számos gyűjtőedény közül választhatunk. A kád tetején található a 16 csőcsonk, melyek belül pár cm-es csőben folytatódnak. Ez vezeti bele az oszlopon átfolyt folyadékot a mintatartó edénybe. A csőcsonkok egyenként zárhatóak, így ha nem is mérünk egyszerre minden kivezetésnél, akkor is biztosítható a megfelelő erősségű vákuum. A csonkhoz csatlakoztathatjuk az oszlopot, melyre a mintát pipettával vihetjük föl.



1. ábra – Szilárd fázisú extraktor

2.3.4. Lépései

Természetesen módszerenként változó lehet a lépések száma és minősége, de általánosságban azt mondhatjuk, hogy a legtöbb szilárd fázisú extrakciós művelet során az alábbi fő lépések különíthetők el:

1. A minta előkezelése
2. Az oszlop kondicionálása
3. Az oszlop ekvilibrálása
4. A minta fölvitele
5. A zavaró komponensek lemosása
6. A mérendő komponensek elúciója
7. Szárítás és regenerálás

1. A minta előkezelése

Nem minden esetben szükséges lépés, de esetemben az alábbiak voltak jellemzőek:

a) Ha a minta szilárd halmazállapotú: Megfelelő oldószerben feloldjuk, szükség szerinti hígítást végzünk.
b) Ha az alkotó ionizálható és ioncserés kromatográfiát végzünk: az ionos állapothoz szükséges pH-t be kell állítani.
c) A megfelelő mennyiségek eléréséhez belső standard használata szükséges lehet.

2. Az oszlop kondicionálása

A kondicionálási lépés céljának megértéséhez meg kell ismernünk az oszlop felépítését. Az oszlopban lévő szilárd fázis a töltet. A töltet lényege, hogy sok pórust tartalmaz, ezáltal nagy felületet biztosít a két fázis érintkezéséhez, és növeli az elválasztás hatékonyságát. Ahhoz, hogy kémiai reakció kialakulhasson, a mintának be kell tudni jutni a pórusokba. A minta pórusokba jutásának biztosításához meg kell nedvesíteni a pórusok felületét. Ha fordított fázist alkalmazunk, akkor a töltet (pl C8 és C18) hidrofób. Mivel a minta legtöbbször vizes fázisban van, a hidrofób pórusokba nem tudna bejutni, nem jönnének létre a kémiai kötések. Ennél a módszernél így mindig a kondicionálással kell kezdeni.

Normál fázisok esetében viszont általában nem szükséges kondicionálást végezni. Ennek oka, hogy a minta általában szerves oldószerben van jelen, így ez önmagában is elég nedvesedést biztosít.

Általánosságban azt mondhatjuk, hogy ehhez a művelethez érdemes szerves oldószert használni, mint a metanol, acetonitril vagy izopropanol, mennyiségét pedig az oszlop típusától függően határozhatjuk meg.

3. Az oszlop ekvilibrálása

A megfelelő nedvesedés elérése után a vizes minta befogadására kell alkalmassá tenni az oszlopot. Ez a lépés azért fontos, mert csak így használhatjuk ki teljes mértékben az oszlop megkötő képességét. Oldatunk mennyiségének megállapításakor figyelembe kell venni, hogy az oszlopban mennyi szilárd töltet van.

Ha fordított fázissal dolgozunk, akkor a minta általában vizes fázisú. A megelőző lépésben bejuttatott szerves oldószer a pórusokat kitöltve megnedvesítette az oszlopot, de kötődést még nem biztosít. Ehhez vizet, vagy gyenge oldószert kell átfolyatnunk rajta. Ezeket bejuttatva ugyanis kiszoríthatjuk a szerves oldószer egy részét, mivel az képes vízzel elegyedni. Ezt követően a mintát is fölvihetjük, hiszen a hidrofób töltet felületén így is lesz már vizes fázis.
Normál fázis esetén az ekvilibrálásra ugyanazt a szerves oldószert szokás alkalmazni, ami a minta mátrixát is képezi.

Fontos megjegyezni, hogy az előkészítő lépések elvégzését követően nem szabad hagyni, hogy a töltet kiszáradjon. Ha valamelyik lépést nem megfelelően végeztük el, akkor az alkotók egyszerűen átfolynak az oszlopon, a kötődés nem jön létre. Viszont itt még nem kell olyan szigorúan venni az áramlási sebesség szabályozását, mint a későbbiekben.

4. A minta fölvitele

A minta fölvitele kulcsfontosságú lépés, több tényezőre kell nagyobb figyelmet fordítanunk. Meg kell határozni a mintamennyiséget, ki kell alakítanunk a megfelelő koncentrációt. A mennyiség függ az oszlop típusától, a töltet mennyiségétől, a mátrixtól és az egyéb alkalmazott vegyszerek minőségétől is. A koncentráció ismerete azért fontos, mert ennek tudatában később kiszámíthatjuk a hatékonyságot (visszatartást). Továbbá itt már figyelnünk kell az áramlási sebességre is. A minta fölvitelekor lejátszódó reakciót elősegíti a töltet nagy belső felülete, de számít az érintkezési idő is. Így az optimális eredmény eléréshez az alacsonyabb áramlási sebességre kell törekednünk. Minél több időt töltenek az alkotók a pórusok között, annál nagyobb valószínűséggel kötődnek meg rajta. Méréssel is követhetjük a sebesség változását, de megfigyeléssel is megfelelő eredményt érhetünk el. Ha a minta csöpögve távozik az oszlopról, akkor az megközelítőleg 1-5 ml/perces sebességgel mozog. Ha a távozó folyadék összefüggő

áramban mozog, akkor a sebesség nem megfelelő (kivéve, ha korábbi kísérletek során bebizonyosodott, hogy nincs hatással az elválasztásra).

Fontos megjegyezni, hogy az áramlási sebesség is függ az oszlop belső átmérőjétől, így ha több féle oszloppal dolgozunk, ezt figyelembe kell vennünk.

5. A zavaró komponensek lemosása

Egy átlagos mátrixban nem csak a számunkra fontos, mérendő komponens van jelen, hanem számos más olyan alkotó is, melyek zavaró hatást, interferenciát fejthetnek ki. Ez a szilárd fázisú extrakció során abban nyilvánul meg, hogy a mérendő alkotók mellett zavaró alkotók is megkötődnek az oszlopon a minta fölvitelekor. Ezek kötődhetnek erősebben vagy gyengébben, de ha nem távolítjuk el őket, akkor a minta-előkészítés nem lesz sikeres. A lépés célja az, hogy megfelelő vegyületek alkalmazásával lemossuk a töltetről ezeket az alkotókat úgy, hogy a számunkra fontos alkotó az oszlopon maradjon.

Ha a zavaró alkotók gyengébben kötődnek, mint a mérendő alkotó, akkor annyi a dolgunk, hogy olyan erősségű oldószert válasszunk, ami lemossa a zavaró komponenseket, de a mérendők kötéseit nem bontja meg. Ez úgy valósul meg, ha a zavaró komponensek az oldatunkhoz erősebben kötődnek, mint az oszlopunk pórusaihoz. Előfordulhat, hogy többszöri mosási lépésre is szükség van.

Meg kell jegyezni, hogy a mosási lépés elvben nem különbözik az elúciótól. Mindkét lépés lényege az, hogy az oszlopról eltávolítunk valamilyen komponenseket. Amennyiben a leválasztott alkotókat tartalmazó frakcióval a továbbiakban nem végzünk mérést, akkor ez mosásnak tekinthető. Viszont ha a mérendő alkotó a lemosott frakcióban van, akkor ez a lépés elúciónak tekinthető.

6. A mérendő komponens elúciója

Ha a mosási lépés(ek) során eltávolítottuk a szennyezőket, de a minta még mindig az oszlopon van, akkor az elúció során távolíthatjuk el róla. Ennek lényege, hogy a kapott frakciót további elemzésnek vetjük alá. A használt oldószert eluensnek, a kapott frakciót eluátumnak nevezzük. Olyan eluenst kell választanunk, amelyhez a mérendő komponensek erősebben kötődnek, mint a pórusokhoz.

Néhány esetben olyan szennyezők is lehetnek az oszlopon, melyek a mérendő komponenseknél erősebben kötődnek. Ilyenkor elvégezzük az elúciót, lemossuk a fontos komponenseket, a szennyezőket pedig az oszlopon hagyjuk.

Ha a mátrix nagyon összetett, akkor alkalmazhatjuk a frakcionálás módszerét is. Ennek lényege, hogy valamely tulajdonság alapján képzett csoportokra bontjuk a mátrix elemeit. Olyan

tulajdonságot válasszunk, amely könnyen mérhető, elemezhető, azonosítható. Ilyenkor több egymást követő elúciós lépést kell alkalmazni, így gradiens elúciónak is tekinthető.

7. Szárítás és regenerálás

A lépés szükségességét a további mérési módszerek igényei határozzák meg. Az egyszerűbb esetekben az eluátum akár közvetlenül, vagy némi hígítást, szűrést követően műszerre vihető.
Amennyiben szükséges, szárítással kell kezdeni. Ennek során gázt (nitrogént) áramoltatunk át az oszlopon, ez eltávolítja az oszlopról a szerves oldószer maradékait. Az oszlopon maradó komponenseket ezután gyengébb oldószerrel eltávolíthatjuk, ezt hívják regenerálásnak.

Mint látható, számos tényező befolyásolja a módszerünk lépéseinek számát. Át kell gondolnunk, hogy mi a célunk, mennyire komplex a mátrix amivel dolgozunk kell, milyen típusú extrakciót szeretnénk kivitelezni és főként, hogy milyen analitikai méréshez végzünk minta-előkészítést. (Arsenault, Waters Corp., 2012)

2.4. Célkitűzések a munka során

Célunk olyan módszer fejlesztése volt, amellyel akár több polifenol együttes és viszonylag gyors, rutinszerű mérése lehetővé válik gyümölcsmintákból. A kitűzött célt HPLC elválasztást követő UV detektálást alkalmazó módszerrel kívántuk megvalósítani.
Ez eddig körülbelül 50-80 perc hosszú elválasztási módszert igényelt UV detektorral, rövidebb kromatográfia esetén pedig a tömegspektrométer szelektivitására volt szükség. Az 50-80 perc hosszú, hagyományosan alkalmazott módszer helyett jelen munkában egy hallgatótársam által kifejlesztett 20 perces, gyorsabb kromatográfiás módszer alkalmazása volt a feladat. E módszer alkalmazása esetén azonban, az előzetes adatok alapján látható volt, hogy további mintatisztítási lépések kidolgozása szükséges. Erre a célra a szilárd fázisú extrakciós technikát választottuk.
Célunk tehát olyan szilárd fázisú extrakciós technika kifejlesztése, amely segítségével:

- egyszerre több komponens is meghatározható
- a zavaró komponensek egy részét vagy egészét eltávolíthatjuk
- ezáltal a mérési időt jelentősen lecsökkenthetjük HPLC-n is.

A fenolsavak vizsgálata során azt tartottuk szem előtt, hogy szerkezetükből adódóan (savak) a kémhatás módosítása következtében a polaritásuk megváltoztatható. Hipotézisünk szerint anionos

formában ezek a komponensek anioncserélő SPE oszloppal szelektíven visszatarthatók. Ezt a méréssorozatot a tanszék további mérések keretében vizeletmintákból történő polifenol-kimutatáshoz tervezte fölhasználni. Ebből kifolyólag figyelembe vettük a vizsgált fenolsavak szervezetben lejátszódó anyagcsere-folyamatai során létrejövő egyes komponenseket, s ez alapján válogattuk össze a standard típusokat, melyekre az SPE kísérleteket elvégeztük.
Mérési eredményeink alapján azonban bebizonyosodott, hogy az anionos előkészítés során szükségszerűen alkalmazandó lúgos közegben a komponensek bomlást szenvednek, ezért ez a módszer így nem alkalmazható. Alacsonyabb pH értéken (6.5 - 9 között) pedig nem elegendő a visszatartás. Ez a módszer tehát nem alkalmas ilyen célú mintatisztításra. Ebből adódóan az anionos SPE módszerrel végzett kísérletek eredményeit jelen munkában nem közlöm.

A másik logikus megközelítés a fordított fázis alkalmazása volt. Ehhez 8 különböző polifenolt vizsgáltunk és az SPE módszer optimálását ezek segítségével kívántuk elvégezni. Hipotézisünk szerint ezeket a komponenseket fordított fázisú SPE oszloppal szelektíven visszatarthatjuk, a valódi mintákban (gyümölcsmintákban, biológiai mintákban) megtalálható potenciálisan zavaró alkotóktól (pl.: cukrok, sók). Ennek igazolásához első körben standardokkal végeztem az optimálási kísérleteket. Bár zavaró komponensekkel itt nem kell számolni, de meg kell állapítani a maximális, még biztonságosan alkalmazható mosófolyadék mennyiséget. Ennél többet akkor sem alkalmazhatunk, ha a zavarás csökkentését nem találjuk kielégítőnek, mivel ekkor már a mérni kívánt alkotók veszteségét kockáztatnánk. Szintén optimálni kívántam a minimálisan szükséges elúciós oldat mennyiségét is. Ezáltal információhoz jutunk arra vonatkozóan, hogy az alkalmazott SPE módszerrel milyen mértékű dúsítás valósítható meg.

3. Anyag és módszer

3.1. Használt standardok, vegyszerek

A flavonoidokkal végzett kísérlet sorozat során használt kristályos standardokat (daidzein, cianidin-glikozid, cianidin-rutinozid, kaempferol-rutinozid, kvercetin-glikozid, klorogénsav, katechin, epikatechin, vitexin) a Sigmától és az Extrasynthese-től szereztük be.
A HPLC tisztaságú metanolt, acetonitrilt, hangyasavat a VWR szállította. A mérések során használt nagy tisztaságú vizet az Alkalmazott Kémia Tanszéken található Millipore MilliQ víztisztító rendszerrel állítottuk elő.

A fenolsavakkal végzett kísérletsorozat során használt kristályos standardokat (ferulasav, kávésav, klorogénsav, 3-hidroxyfenilecetsav) a Sigmától szereztük be. A HPLC tisztaságú metanolt, acetonitrilt, hangyasavat, ammónium-hidroxidot a VWR szállította. A lúgos sókat (kálium-foszfát és kálium-hidrogén-foszfát) a Reanaltól vásároltuk.

3.2. Használt berendezések

3.2.1. SPE

A mintaelőkészítés megvalósításához Thermo Hypersep 16 helyes szilárd fázisú extraktort használtunk. A folyadékáramlást vákuumgenerátorral biztosítottuk. A készüléket és a C18-as fordított fázisú (Sola RP) és anioncserélő töltetet tartalmazó oszlopokat (Sola AX) a Thermo Scientific-től szereztük be.

3.2.2. HPLC

A nagy hatékonyságú folyadékkromatográf Agilent 1200-as típusú volt. A berendezés részei: eluenstartó, gáztalanító, pumpa, injektor, termosztát, detektor. A detektor UV-VIS tartományban működtethető változtatható hullámhosszú detektor volt (variable waveleght detector, VWD).

3.3. Alkalmazott módszerek

A mintaelőkészítés során a kristályos standardokat metanol-1% hangyasav oldatban feloldottam. A töltet kondicionálásához szintén metanol-1% hangyasav oldatot használtam, az ekvilibráláshoz pedig víz-1% hangyasav elegyet. A mosóoldat 5, illetve 10% metanol, 1% hangyasav-víz elegyből állt. Az elúciót metanol 1% hangyasav oldattal végeztem. Ezen paraméterek kiválasztása az SPE oszlopok beszerzésekor kapott útmutató alapján történt.

A HPLC méréshez használt eluensek a következők voltak:

- „a” - vizes: 0,5% hangyasav-víz
- „b” - erős: 0,5% hangyasav-acetonitril
- a mérések végén a kolonna átmosásához használt „c” eluens pedig: acetonitril-víz 1:1 arányú elegye.

A mérésekhez használt oszlop végig az Agilent XDB-C18-as, 1,8 µm-es szemcseátmérőjű, 4,6 × 50 mm-es típus volt. A mérés előtt az eluensek gáztalanítása céljából 5 ml/perc áramlási sebességgel

ún. purge programot futtattam. Ennél az eluensek aránya 33% „a”, 33% „b” és 33% „c” volt. A mérés során gardiens elúciót alkalmaztam.

A programot az alábbi táblázatban ismertetem:

Idő (perc)	% „a” eluens	% „b” eluens	Áramlási sebesség (ml/perc)
0	95	5	0,5
6	92	8	0,5
15	70	30	0,5
16	0	100	0,5
17	0	100	0,5
17,1	95	5	0,5

1. táblázat - 1. gradiens program

Az injektált mennyiség 10 µl volt, a termosztátot 40 °C fokra állítottuk. A hullámhossz változását az alábbi táblázatban ismertetem:

Idő (perc)	Hullámhossz (nm)
0	280
8,20	520
12	330
18,50	330

2. táblázat - 1. program hullámhossz változása

A hullámhosszok megválasztásánál figyelembe vettük a komponensek elúciós sorrendjét, valamint abszorpciós maximumát.

A mérési idő 18,50 perc volt, ezt pedig a kezdeti eluens-összetétellel végrehajtott 10 perces mosási fázis követte.

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1. Tesztelés standard oldatokkal

Magát a módszer-optimálást standardok segítségével végeztem el. A későbbi extrakciós technikák - melyeket szőlőmag-kivonatokkal és vékonyréteg-kromatográfiával megfuttatott polifenol komponensekkel végeztem – körülményei ugyanis így modellezhetők leghatékonyabban. Igyekeztünk olyan komponenseket választani a méréshez, amelyek megfelelően reprezentálják a flavonoidok csoportjait.

A daidzeint azért vettük be az optimáláshoz felhasznált alkotók közé, mert a későbbiekben belső standardként kívántuk alkalmazni. A belső standard feladata esetemben a módszer megfelelő működésének ellenőrzése és az esetleges veszteségek nyomon követése. A belső standardnak két feltételnek kell megfelelnie. Az első, hogy a többi vizsgált komponenshez hasonlóan viselkedjen. Ez azért teljesül, mert a daidzein maga is a polifenolok csoportjába tartozik, szerkezetileg nagyon hasonló a többi 7, általunk vizsgált típushoz. A másik az, hogy a valódi mintánkban ne legyen jelen. Mi a kész módszert szőlőből származó mintákon szeretnénk tesztelni, melyek korábbi mérések alapján nem tartalmaznak daidzeint.

A klorogénsav a fenolsavak csoportjába tartozik, a gyümölcsökben nagy mennyiségben van jelen. A katechin a flavon-3-olok közé tartozik, aglikon formában van jelen a gyümölcsökben, s az epikatechinnel együtt a szőlő fő polifenol komponensei. A cianidin-glikozid és a cianidin-rutinozid az antocianinok csoportját képviseli, a kvercetin és a kaempferol a flavonolok közé sorolható. A rutin az egyik leggyakrabban vizsgált flavonoid, a meggy és a kajszibarack is nagy mennyiségben tartalmazza.

4.1.1. Flavonoidok

Első lépésben a kristályos standardokból egykomponenses törzsoldatokat készítettem. Analitikai mérleg segítségével kimértem a szükséges mennyiséget, majd pipettával rámértem a szükséges oldószer-mennyiséget. Az alkalmazott oldószer metanol - 1% hangyasavas oldat volt. Az értékeket pontosan följegyezve kiszámítottam a koncentrációt. Ennek eredményeit az alábbi táblázatban foglaltam össze:

Név	Bemért tömeg (mg)	Oldószer tömeg (g)	Oldószer térfogat (ml)	Koncentráció (µg/ml)
Katechin	3,3	2,4785	3,134	1053
Klorogénsav	3,1	2,4432	3,088	1004
Rutin	3,2	2,4567	3,105	1031
Kaempferol-rutinozid	3,1	2,4511	3,100	1000

3. táblázat- Törzsoldatok készítése

A többi komponensből nem állt rendelkezésre elegendő mennyiségű kristályos forma, így korábbi kész törzsoldatokkal dolgoztam.

Ezek koncentrációja:

Név	Koncentráció (µg/ml)
Kvercetin-glüközid	1003
Cianidin-glikozid	1004
Cianidin-rutinozid	983
Daidzein	1001

4. táblázat- Törzsoldatok készítése II.

Az oldószer térfogatát a következő képlet alapján számoltam ki: $V = \frac{m}{\rho}$.

A metanol sűrűsége (a hangyasav-tartalomból adódó sűrűségváltozást nem vettük figyelembe) 0,791 g/ cm^3, így katechin esetében:

$$V1 = \frac{2{,}4785\ ml}{0{,}791 g/ml} = 3{,}134\ ml$$

A koncentráció kiszámítását aránypárok segítségével végeztem.

Katechin esetében 3,3 mg kristályos anyagot oldottam föl 3,143 ml-nyi oldószerben.

3,3 mg – 3,134ml

x mg – 1ml

x × 3,134 = 1 × 3,3

x = 1,05296 mg/ml = 1053µg/ml

A kész egykomponenses törzsoldatokból ezt követően 25 ml, 8 komponensből álló, 10 µg/ml-es mintaoldatot készítettem. Első lépésként kiszámítottam a törzsoldatokból kipipettázandó mennyiségeket.

Katechin esetében:

$$\frac{10}{1053} \times 25 = 237\ \mu l$$

A szükséges mennyiségek:

Név	Mennyiség (µl)
Katechin	237
Klorogénsav	249
Rutin	242
Kaempferol-rutinozid	250
Kvercetin-glikozid	245
Cianidin-glikozid	249
Cianidin-rutinozid	249
Daidzein	249

5. táblázat- Mintaoldat készítése

A kiszámolt mennyiségeket 25 ml-es mérőlombikba pipettáztam, majd jelre töltöttem 15% MeOH, 1% HCOOH –víz eleggyel.

4.1.1.1 Mosási körülmények optimálása

A mintaelőkészítés lépései a következők voltak:

- kondícionálás
- ekvilibrálás
- minta fölvitele
- mosási lépés
- elúciós lépés

A módszerfejlesztés első lépéseként a mosási fázis optimálását tűztem ki célul. A kondicionálást és az ekvilibrálást az Anyag és módszer c. fejezetben ismertetett oldatok 500 µl-évl végeztem el.

Ezt követően a kiszáradást megelőzendő rögtön fölvittem a minta 500 µl-ét, a töltetről távozó folyadékot egy üres Eppendorf-csőbe gyűjtöttem (mosási fázis). Két különböző mosófolyadékot próbáltam ki. Az egyik 5% MeOH-t, 1% HCOOH-t és vizet tartalmazott. A másik 10 % MeOH-t és 1% HCOOH-t tartalmazott vizes elegyben. Mindkét típussal két ismétlésben végeztem el a méréssorozatot, s közben a mosóoldat térfogatát 100-600 µl-ig változtattam. Az alkalmazott mosófolyadék térfogatától függetlenül, az Eppendorf-csőben összegyűjtött mennyiséget 2 ml térfogatra jelre töltöttem. Ebből kromatográfiás vizsgálattal meghatároztam ez egyes alkotók koncentrációját. A mérés célja az, hogy minél több mosóoldatot alkalmazva is nagy visszatartást érjünk el a mérendő alkotókra. Ez azért fontos, mert a nagyobb térfogatú mosófolyadék több zavaró komponenst képes eltávolítani.

A mérési eredményeket táblázatokban foglaltam össze.

- 5 %-os mosóoldat - 500µl eluáló oldat:

Mosási frakció (µl)	**Katec. (µg/ml)**	**Kloro. (µg/ml)**	**Cia.g. (µg/ml)**	**Cia.-r. (µg/ml)**	**Rutin (µg/ml)**	**Kve.-g. (µg/ml)**	**Kae.-r (µg/ml)**	**Daidz. (µg/ml)**
100	0	0,107	0,788	0,531	0	0	0	0
200	0,455	0,092	0,994	0,706	0	0	0	0
300	0,277	0,094	0,764	0,444	0	0	0	0
400	0,454	0,114	1,005	0,662	0	0	0	0
500	0,482	0,032	1,155	0,702	0	0	0	0
600	0,713	0,053	1,262	0,837	0	0	0	0

6. táblázat- Mosási frakció koncentrációinak átlagértékei 5%-os mosóoldat esetén (áttörés)

Az adatok alapján elmondhatjuk, hogy a polárisabb komponensek visszatartása kisebb mértékű volt, áttörést tapasztaltunk. A cianidin-glikozid és cianidin-rutinozid esetében a cukor nélküli alapmolekula a cianidin, amely kationos formát képez. A kation okozta töltés nagy polaritást okoz, melyet a hozzá kapcsolódó cukormolekulák sem javítják. A klorogénsav disszociációja vissza van szorítva, mivel alacsony pH értéken dolgoztunk, azonban a polaritása így is túl nagynak bizonyult. A rutin, a kaempferol-rutinozid és a kvercetin-glikozid esetében a cukrok okozta polaritást ellensúlyozza az aglikon apolaritása, a daidzein apolaritását pedig nem rontja hozzá

kapcsolódó cukormolekula. Ennek köszönhető, hogy ezen alkotók esetében nem tapasztaltunk áttörést még 600 µl mosófolyadék alkalmazása esetén is.

Az összegyűjtött, majd az aktuális mosófolyadékkal 2 ml-re jelre töltött mosófolyadékokban mért koncentrációk alapján kiszámoltam a mosás során áttört anyagmennyiségeket. Ezeket az értékeket az 500 µl térfogatban felvitt 5 µg mennyiséghez viszonyítva a 8-9 táblázatokban összefoglaltam az 5% MeOH tartalmú mosófolyadék esetén mért áttört, illetve visszatartott anyaghányadokat.

Mosási frakció (µl)	**Katec. (%)**	**Kloro. (%)**	**Cia.-g. (%)**	**Cia.-r. (%)**	**Rutin (%)**	**Kve.-g. (%)**	**Kae.-r (%)**	**Daidz. (µg/ml)**
100	0	4	32	21	0	0	0	0
200	18	4	40	28	0	0	0	0
300	11	4	31	18	0	0	0	0
400	18	5	40	26	0	0	0	0
500	19	1	46	28	0	0	0	0
600	29	2	50	33	0	0	0	0

7. táblázat- Áttörés százalékos értékei 5%-os mosófolyadék alkalmazása esetén

Eluátum	**Katec. (%)**	**Kloro. (%)**	**Cia. -g. (%)**	**Cia.-r. (%)**	**Rutin (%)**	**Kve.-g. (%)**	**Kae.-r (%)**	**Daidz. (µg/ml)**
100*	74	11	64	73	95	93	95	95
200	64	7	57	68	97	95	98	97
300	68	9	61	73	91	89	92	91
400	64	10	56	67	97	94	97	97
500	65	15	50	67	97	95	99	99
600	54	18	44	59	95	93	95	95

8. táblázat- Visszatartás százalékos értékei 5%-os mosófolyadék alkalmazása esetén

A kísérleteket megismételtem 10 %- os mosóoldat esetén, 100– 500 µl eluáló oldat alkalmazásával. Az eredményeket a 9-10. táblázatban foglaltam össze.

Mosási frakció (µl)	Katec. (%)	Kloro. (%)	Cia.-g. (%)	Cia.-r. (%)	Rutin (%)	Kve.-g. (%)	Kae.-r (%)	Daidz. (µg/ml)
100	6	0	27	17	2	3	1	0
200	17	0	35	25	0	0	0	0
300	18	0	37	25	1	0	0	0
400	27	2	45	33	2	0	0	0
500	25	1	42	29	1	1	0	0
600	7	4	20	12	0	0	0	0

9. táblázat- áttörés százalékos értékei 10%-os mosóoldat használata esetén

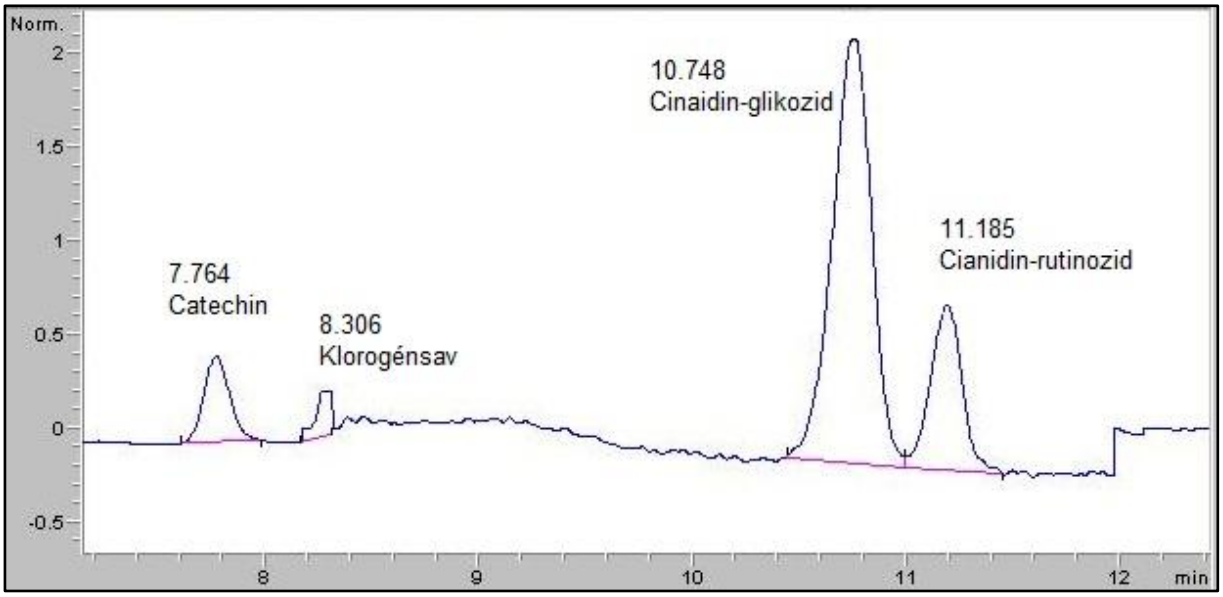
Itt tapasztalható kismértékű áttörés az apolárisabb komponensek esetén is, még ez is igen jó eredménynek tekinthető.

Eluátum	Katec. (%)	Kloro. (%)	Cia.-g. (%)	Cia.-r. (%)	Rutin (%)	Kve.-g. (%)	Kae.-r (%)	Daidz. (µg/ml)
100	84	4	70	78	96	94	97	96
200	78	4	65	73	98	96	98	98
300	76	1	60	70	96	95	97	98
400	33	0	53	61	97	95	98	98
500	70	4	57	67	98	97	99	99
600	80	91	125	193	90	94	93	118

10. táblázat- visszatartás százalékos értékei 10%-os mosófolyadék alkalmazása esetén

Az elúciót minden esetben 500 µl-nyi oldattal végeztem el, s ezt a frakciót is külön Eppendorf csőbe gyűjtöttem. Az eluátumot 1% HCOOH-víz elegyel szintén 2 ml-re jelre töltöttem. Megfelelő keverést követően mintatartókba töltöttem és HPLC segítségével megmértem.

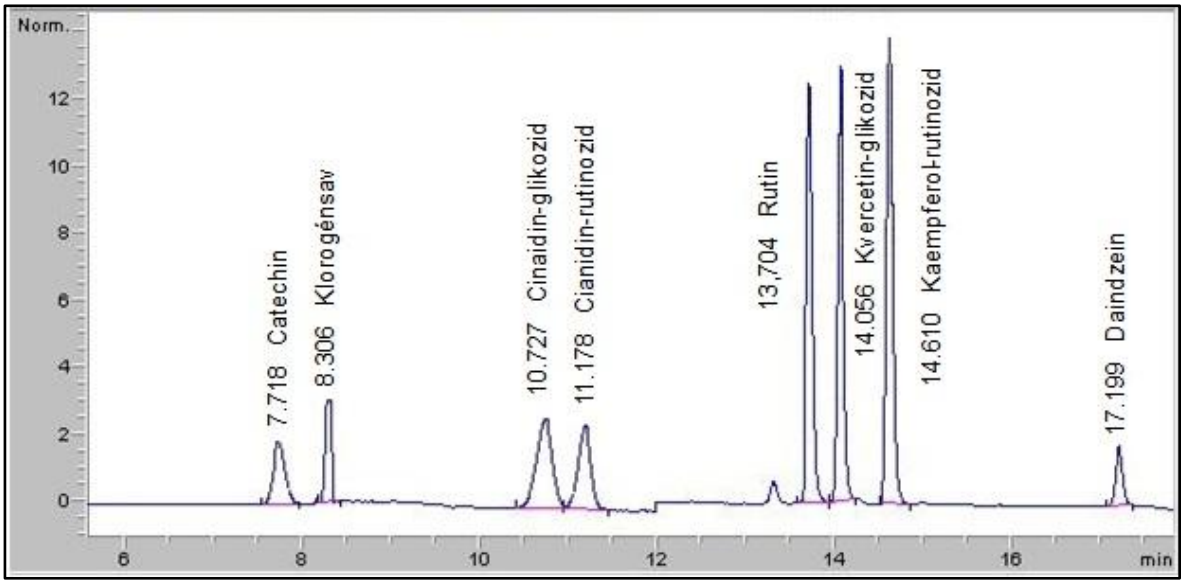
Az alábbi két ábrán (1-2 ábra) egy mosófolyadék és egy eluátum tipikus kromatogramját mutatom be. A kromatográfiás paraméterek bemutatása az „Anyag és módszer” részben található.



2. ábra– 500 µl mosófolyadék alkalmazását követően, a mosófolyadék mérésekor kapott jellegzetes kromatogram részlete

A kromatogramon látható (2. ábra), amit a táblázatokban összefoglaltam, azaz a 4 komponens kismértékű áttörése. Alapvonal-eltolódást is észlelhetünk az ábrán, ám ez a hullámhossz-tartomány változásának tudható be. Szintúgy a klorogénsav levágott csúcsa, mivel pont a detektálás közben következett be a hullámhossz-váltás, így erre a komponensre nem tudunk megfelelő adatokat szolgáltatni.

A 3. ábrán látható eluátum kromatogramja jól mutatja a 8 komponenst. A klorogénsav csúcsa itt sem teljes a fönt említett okból kifolyólag, azonban a rutin, kvercetin-glikozid, kaempferol-rutinozid és daidzein esetében csúcsszélesedés nem rontja a kromatogramot. Ezen komponensek abszorbancia maximuma 330 nm, így a hullámhossz-váltást ez esetben jól időzítettük. A cianidinek ideális detektálási hullámhossza ezzel szemben 520 nm, amit túlságosan koraira időzítettünk.



3. ábra - 500 µl mosófolyadék alkalmazása – eluátum

Az optimális térfogat megállapításakor analitikai szempontokra hagyatkoztam. Az elvégzett ismétlésszám statisztikai analízist nem tesz lehetővé, de további ismétlések elvégzése nem indokolt. Ennek oka egyrészt az, hogy az eredményeket 90% fölötti visszatartás esetén kiválónak mondhatjuk, és mivel az elvégzett ismétlések során ebben nem mutatkozott jelentős ingadozás, igen kicsi a valószínűsége, hogy ez csak véletlen. Másrészt az alkalmazott vegyszerek és oszlopok egyszer használhatóak, viszont igen költségesek.

A mosási lépés célja a zavaró komponensek eltávolítása oly módon, hogy a mérendő alkotók az oszlopon maradjanak. Az alkalmazott mosófolyadék-mennyiség arányos a lemosódott zavaró komponensek mennyiségével. Így a lehető legtöbb, még biztonságosan használható mosófolyadék mennyiség meghatározása volt a cél. A 10% MeOH tartalmú oldat esetén már áttöréseket tapasztaltunk kisebb mennyiség esetén is, míg az 5 % MeOH tartalmú oldat esetén még a 600 µl-nyi is biztonságosan alkalmazható volt. Viszont az adatok alapján a legjobb visszatartást, azaz a legkevesebb veszteséget 500 µl mosófolyadékkal értük el, így ezt ítéltem meg optimális mennyiségnek.

4.1.1.2 Elúció körülményeinek optimálása

Az elúció körülményeinek optimálásakor az ekvilibráláshoz és kondicionáláshoz használt oldatok az előzőekben leírtakkal megegyeztek, s a korábban ideálisnak ítélt 500 µl mosófolyadékot alkalmaztam. Az eluens mennyiségét 100-600 µl-ig változtattam. Az eluens összetétele itt is 1% HCOOH - MeOH volt. Viszont itt már csak azokból a komponensekből készítettem mintaoldatot, melyek az előző kísérletsorozatban megfelelőnek bizonyultak ehhez az eljáráshoz, azaz az áttörés

kismértékű volt, vagy a vizsgált mintatípus szempontjából fontosnak bizonyult. Kaempferol-rutinozid standard a továbbiakban nem állt rendelkezésemre, így ezt a komponenst kihagytam az új oldatból. Ennek összetétele a következő volt: katechin, rutin, kvercetin-glikozid, daidzein.
Az eredményeket táblázatban foglaltam össze:

Eluátum (µg)	Katec. (µg/ml)	Rutin (µg/ml)	Kvercein-glikozid (µg/ml)	Daidzein (µg/ml)
100	1,1393	1,2902	1,3758	0,6964
200	2,2184	2,6640	2,8881	1,9339
300	1,8674	2,3729	2,6121	1,9872
400	2,0224	2,3458	2,5747	2,0129
500	1,8545	2,2857	2,5084	1,6363
600	1,9018	2,4387	2,6618	1,4008

11. táblázat – Az eluátum koncentrációinak átlagértékei

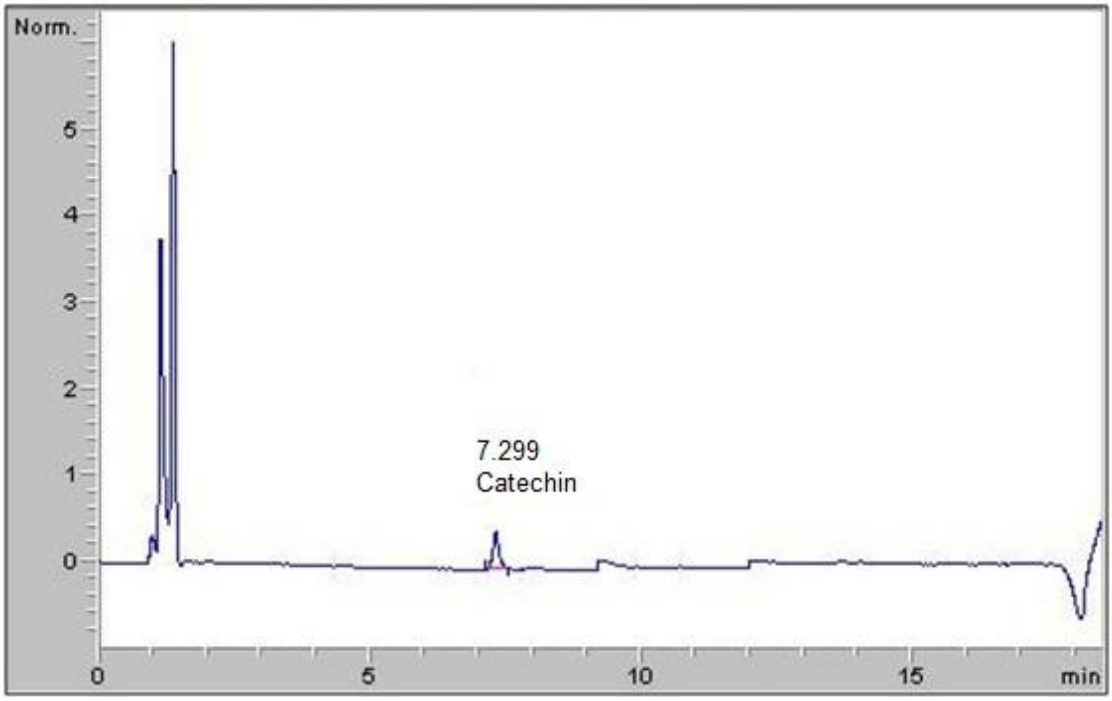
A katechin kismértékű áttörése itt is megfigyelhető, viszont a visszatartás kielégítő. Az adatok helyenkénti irreális, 5 µg fölötti értékei is megfigyelhetők (pl.: kvercetin-glikozid) melyek vélhetően adódhatnak kalibrációs hibából. Ugyanakkor az analitikailag még legtöbbször elfogadott 120% fölötti visszanyerés sehol sem adódott.

Eluátum (µg)	Katec. (%)	Rutin (%)	Kvercein-glikozid (%)	Daidzein (%)
100	46	52	55	28
200	89	107	116	77
300	75	95	104	79
400	81	94	103	81
500	74	91	100	65
600	76	98	106	56

12. táblázat – A visszatartás százalékos értékei

Az optimális elúciós térfogat megállapításakor a legfőbb szempont a komponensek kismértékű veszteségének biztosítása. Legtöbbször azonban számolnunk kell némi veszteséggel, a

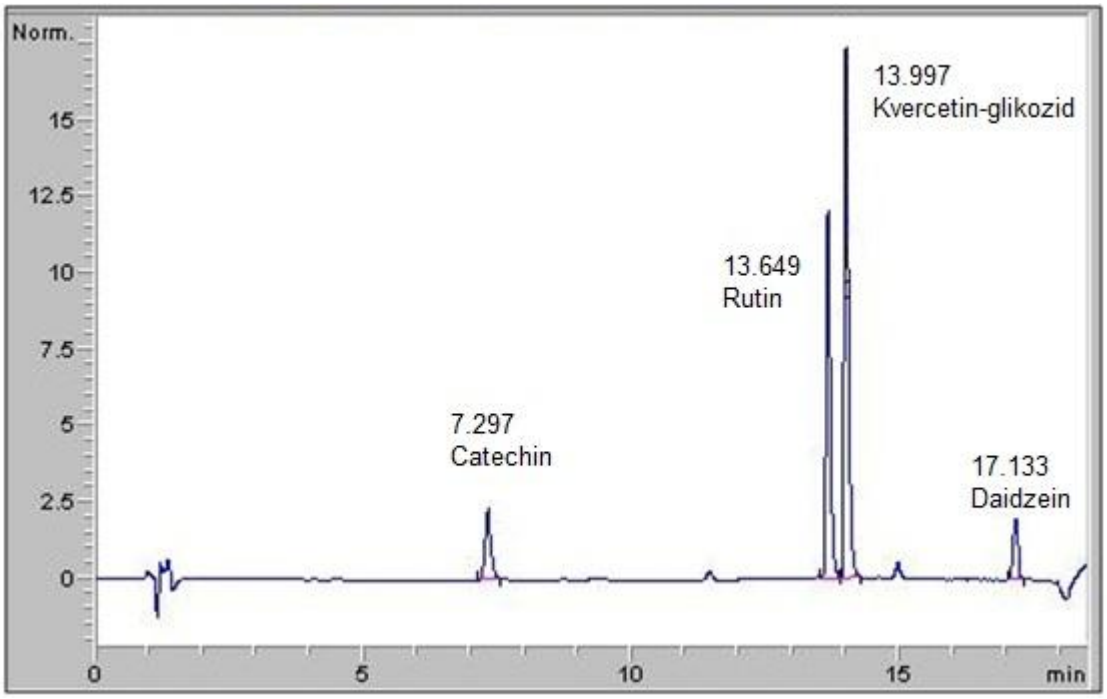
komponensek egy része a tölteten maradhat. Az adatokból kiolvasható, hogy már 200 µl elúciós oldat alkalmazása is minden komponens esetében kielégítő elúció eredményezett. A visszanyerés minden esetben 77-116 % között volt. A százalékos értékek kifejezik, hogy az oszlopra vitt alkotók mekkora hányadát tudtuk tisztítás után lemosni. További szempont az oldószer mennyiség, fontos szem előtt tartani a dúsítási tényezőt is. Célunk tehát a lehető legjobb elúció a lehető legkevesebb eluenssel. Az adatok alapján ideálisnak a 200 µl-nyi eluens mennyiséget ítéltem meg.



4. ábra – Mosási frakció kromatogramja

Itt látható a mosási frakció kromatogramja (4. ábra), a vártnak megfelelően itt már csak a katechin mutatott némi áttörést. Az alapvonal-eltolódások itt is a hullámhossz-váltás jelzik. Ezeknél a fázisoknál egy teljes kromatogramot illesztettem be, ezen bemutatva a mérés szakaszait. Az elején látható nagy csúcsok az oszlopon maradt szennyezőanyagokat jelzik, a végén lévő negatív csúcs pedig a 10 perces post-time mosás kezdetét.

Az eluátum kromatogramja (5. ábra) rávilágított, hogy a komponensek elúciója sikeres volt, a koncentrációk megfelelőek voltak.



5. ábra – Eluátum kromatogramja

4.2. Tesztelés gyümölcsmintákkal

4.2.1. Szőlőmag-kivonatok vizsgálata

Három féle szőlőmag őrleménnyel végeztem kísérleteket a munka során. Ezek fehér, piros és változó színű Góhérszőlőkből származó minták voltak. A mintákat a Pécsi Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Növényi Biológia Tanszék és a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia tanszék közös projektből származtak. A mintaelőkészítés során 200 mg-ot mértem be analitikai mérleg segítségével mindhárom típusból külön-külön centrifugacsövekbe. Mindegyik mintához adtam 100 µl 1000 ppm-es daidzein oldatot, melyet belső standardként alkalmaztam. Készítettem egy extraháló oldatot, amely 60:39:1 arányban tartalmazott metanolt, desztillált vizet és hangyasavat. Ebből az oldatból mindegyik mintához 10 ml-t pipettáztam, majd fél órára ultrahangos fürdőbe helyeztem. Erre azért volt szükség, hogy a kioldódást elősegítsük és felgyorsítsuk. Az idő lejártával a mintákat 5 percen át 6000 rpm-en centrifugáltam, kiülepítve ezzel a szilárd részecskéket. A felülúszóból 2,5 ml-t pipettáztam egy 10 ml-es lombikba, majd vízzel jelre töltöttem. Az oldatot egy másik centrifugacsőbe 0,2 µm pórusátmérőjű PTFE membránnal rendelkező szűrőfej és fecskendő segítségével leszűrtem.

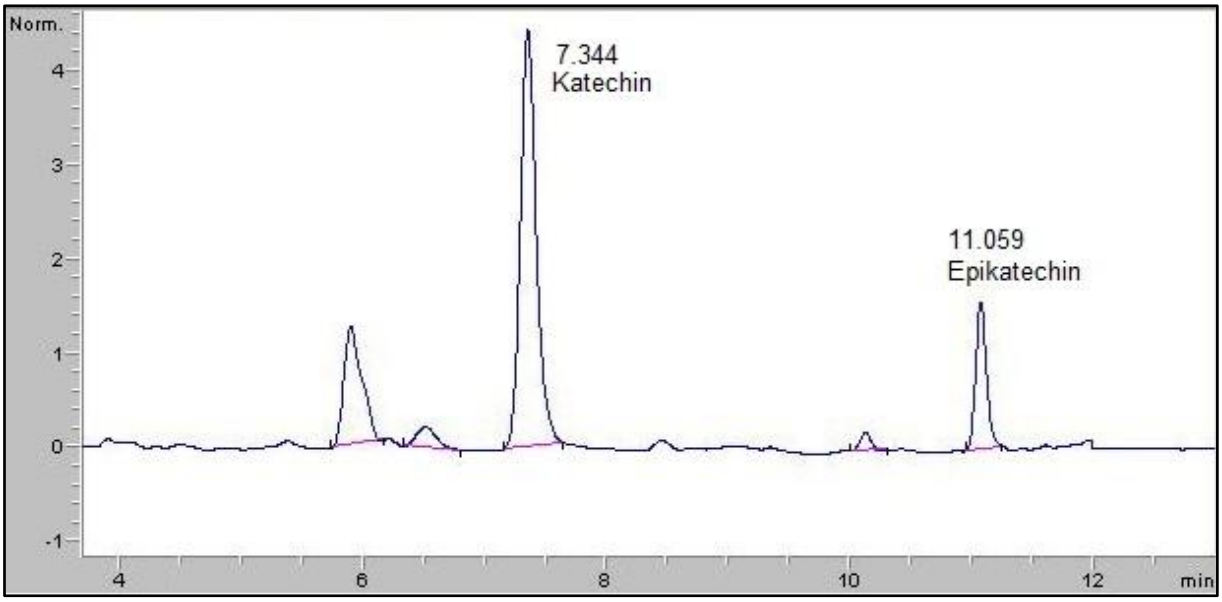
A mintákból 10-10 µl-t közvetlenül HPLC-re vittem, 500-500 µl-t pedig SPE oszlopra az optimálisnak ítélt mennyiségek alkalmazásával.

Az optimálás célja a minták SPE-vel való tisztításának megoldása volt. Mindezt oly módon kívántuk megoldani, hogy a vizsgált polifenolokra nézve a módszer megfelelő legyen. Egyrészt ne legyen jelentős áttörés, ugyanakkor a mosási lépéshez maximális térfogatú és minél nagyobb mennyiségű szerves oldószert alkalmazzunk.

Név	Mosási frakció koncentrációja (µg/ml)	Eluátum koncentrációja (µg/ml)
Fehér szőlőmag		
Katechin	4,08	71,8
Epikatechin	0,58	25,2
Klorogénsav	0	2,0
Piros szőlőmag		
Katechin	1,17	56,8
Epikatechin	0,14	24,2
Klorogénsav	0	0
Változó szőlőmag		
Katechin	1,67	59,6
Epikatechin	0,11	19
Klorogénsav	0	1,0

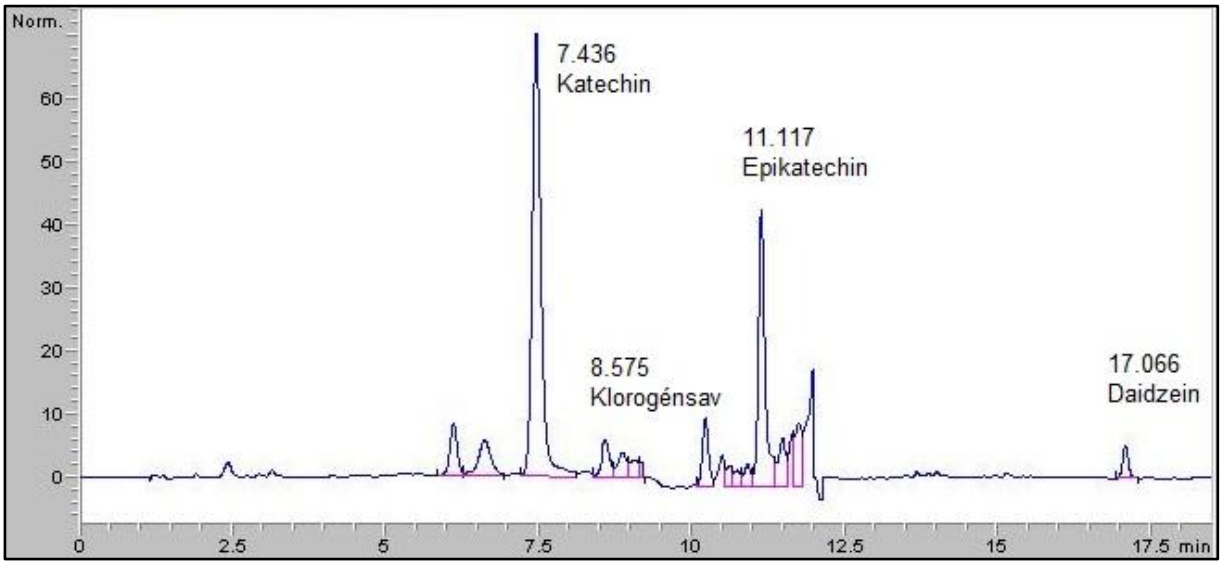
13. táblázat – Szőlőminták polifenoljainak megoszlása a mosási fázis és az eluátum között

A katechin nagy mennyiségben van jelen a szőlőmagban, annak fő polifenol komponense. A vizsgált polifenolok közül a módszerrel még epikatechin és klorogénsav volt kimutatható. Ezek viszont kis mennyiségben találhatók meg benne. Láthatjuk, hogy a mosási frakcióban igen kis mennyiségű katechin és epikatechin jelent meg, klorogénsav pedig egyáltalán nem (13. táblázat). Ezzel szemben az eluátumokban sikeresen kimutattuk valamennyi komponenst, méghozzá a mosáshoz képest nagy mennyiségben. Az egyetlen kivétel a piros szőlőmag-kivonat volt, melyben a jelek szerint nem volt kimutatható mennyiségű klorogénsav. Azonban nem zárhatjuk ki, hogy a módszer erre az alkotóra is megfelelően működik, hiszen jelenlegi adataink ezt támasztják alá. A nem megfelelő hullámhossz-váltás miatt azonban ennek bizonyítására további mérések szükségesek.



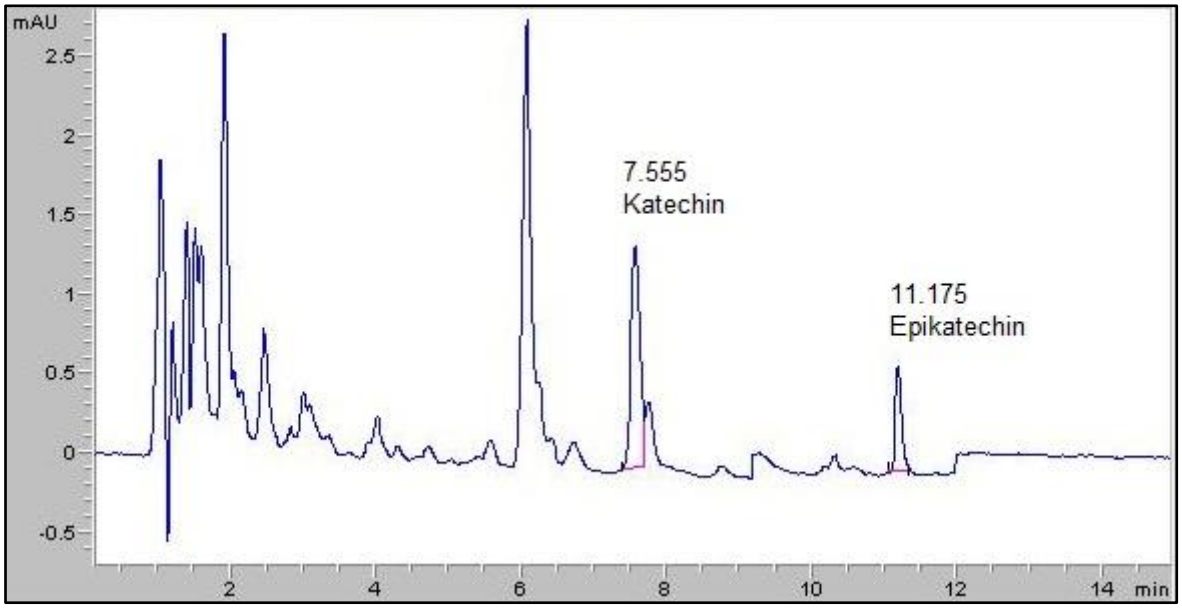
6. ábra – Fehér szőlőmag mosási frakciója

A mosófolyadék kromatogramján látható csúcsok a zavaró komponenseket, illetve az áttört katechint és epikatechint jelölik.



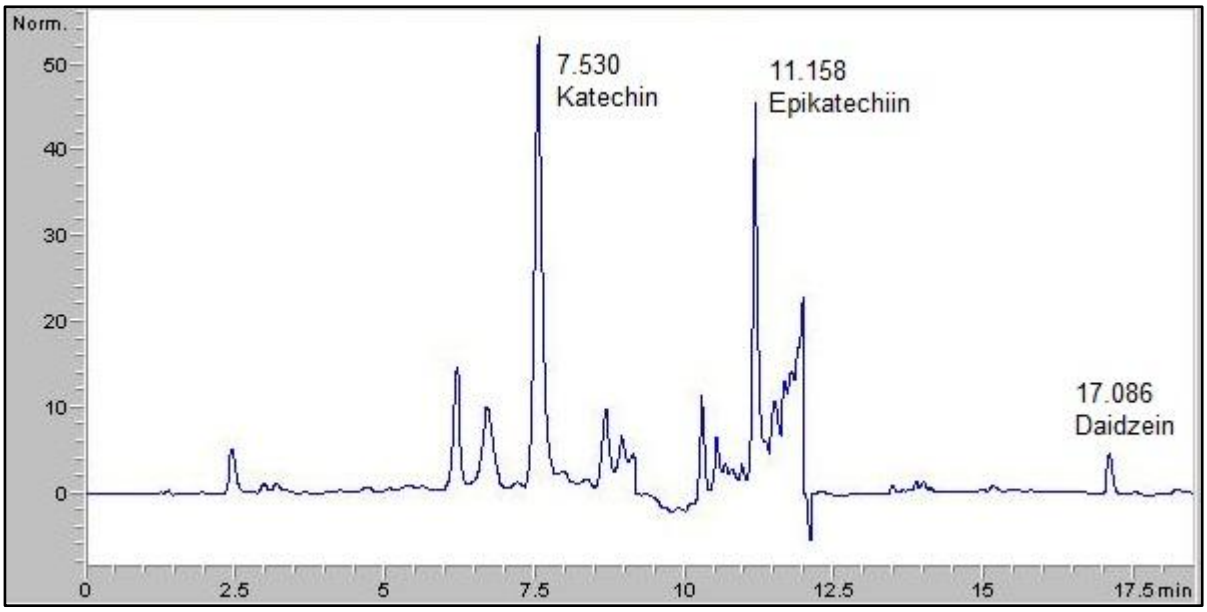
7. ábra– Fehér szőlőminta eluátuma

Bár zavaró komponensek így is maradtak az oldatban, a mérendő főkomponens (katechnin) csúcsa jól látható (7. ábra). A katechin teljesen elkülönülve jelenik meg. A klorogénsav kis mennyisége miatt kevésbé tűnik ki a háttérből, az epikatechin esetében a csúcs szintén nem tiszta.

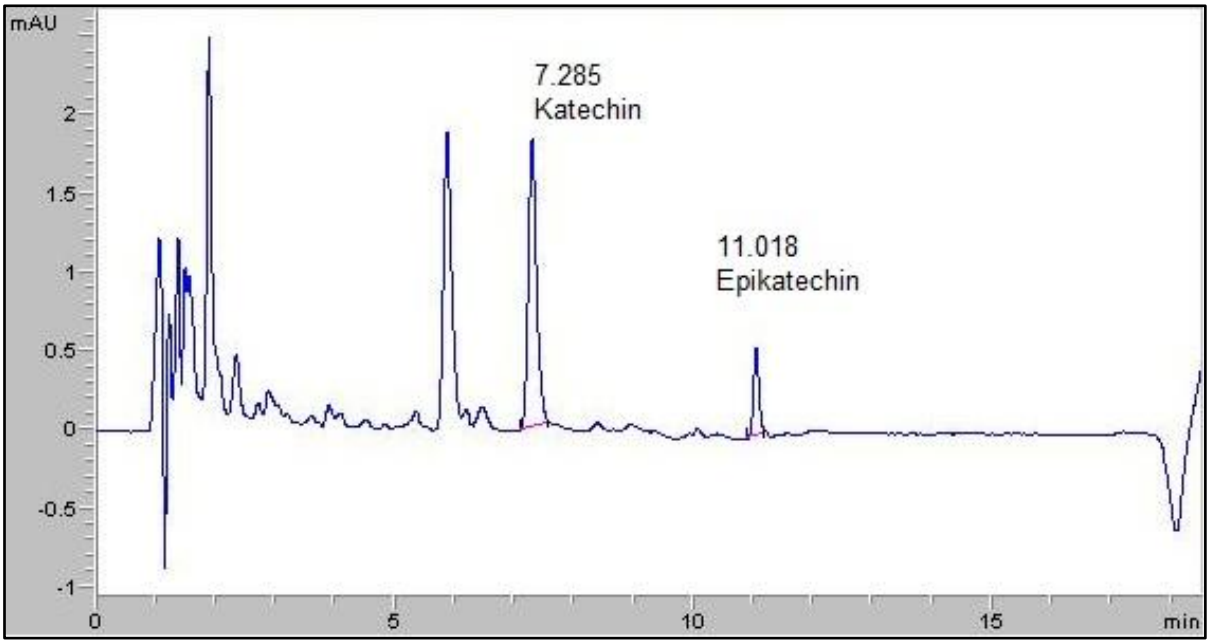


8. ábra – Piros szőlőminta mosási frakciója

A piros szőlőminta mosási frakciójában (8. ábra) is feltűnik a katechin és az epikatechin, de láthatóan sokkal több más komponenst is sikerült eltávolítani az oszlopról az extrakció során. Megfigyelhető, hogy elsősorban a kisebb retenciós idejű (polárisabb) komponenseket tudtuk lemosni a töltetről, míg a kevésbé polárisak nagyobb mennyiségben maradtak az oszlopon.

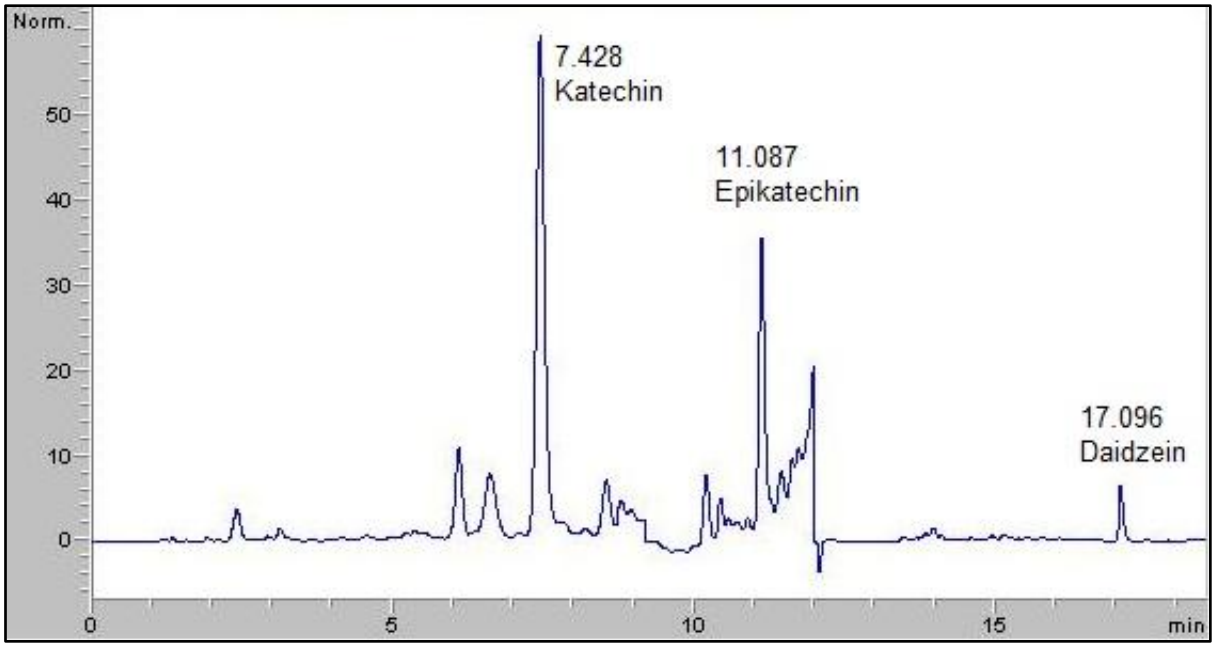


9. ábra– Piros szőlőminta eluátuma



10. ábra– Változó szőlőminta mosási frakciója

Hasonló a helyzet a változó minta esetében is. Tisztulást csak a kisebb retenciós idejű komponenseknél érhetünk el.



11 .ábra – Változó szőlőminta eluátuma

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a módszer az adott szőlőmag-mintákból kiválóan alkalmas volt katechin és epikatechin kimutatására, valamint alkalmas katechin mennyiségi meghatározására is. A mintatisztítás viszont kevésbé eredményes olyan komponensek esetén, melyek nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak az általunk detektálni kívánt komponensekkel.

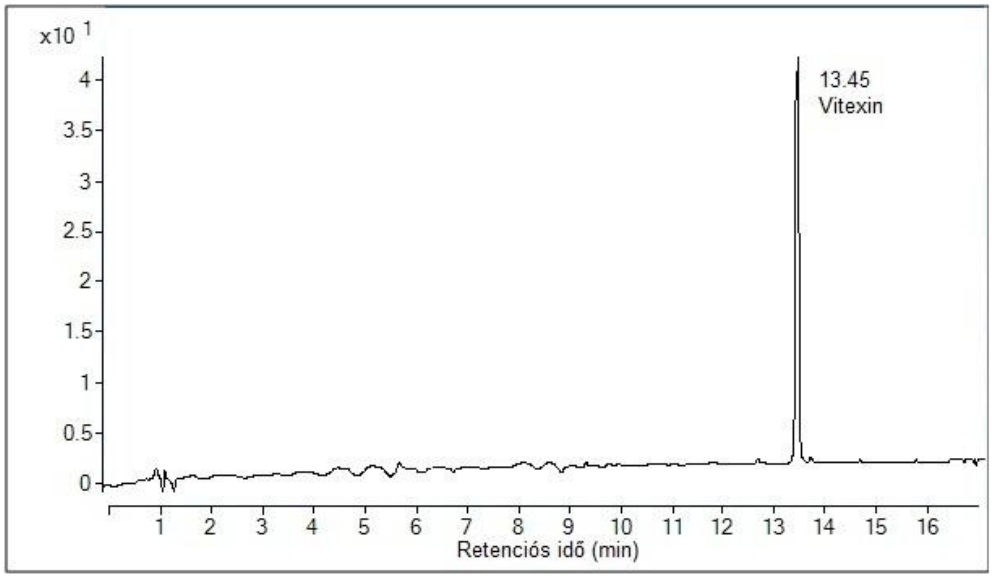
4.2.2. Vékonyréteg-kromatográfiás preparátumok vizsgálata

A korábban említett projekt keretében a tanszékünkre több, vékonyréteg-kromatográfiával megfuttatott szőlőlevél-minta érkezett további vizsgálatok céljából. A kísérlet során különböző természeti körülmények között növekedett, azonos (Góhér) szőlőmintákat futtattak föl. Az egyik típust az árnyékos, a másikat a napos oldalon növő szőlők adták. A vékonyréteg kromatográfiás eredményeik azt mutatták, hogy a napos oldalon termesztett minták tartalmaznak egy flavonoid komponenst, mely tippjük szerint vitexin lehet. Ezt a feltevést arra alapozták, hogy a napos oldalon termesztett szőlőben megjelenő sáv a vitexin standarddal hasonló módon futott föl.

A vékonyréteg-kromatográfiás mérés elemzése céljából a szilikagél érintett részét lekapartuk, majd 1 ml metanollal extraháltuk, majd centrifugáltuk. A felülúszóból 150 µl-t kipipettáztam, és 850 µl desztillált vízzel feltöltöttem. Ezt az eljárást a napos és az árnyékos oldalról származó szőlőmintával is elvégeztem. Ezen túlmenően kristályos vitexin standard oldatra is szükség volt a vitexin szőlőben való jelenlétének igazolása vagy cáfolása érdekében, így ebből is készítettem 10 µg/ml koncentrációjú egykomponenses törzsoldatot. Ez 15% metanolt és 1% hangyasavat tartalmazott. Készítettem további két mixet, melyben 300-300 µl standard oldat és a vékonyréteg-kromatográfiából származó mintaoldat egyike található.

Az összes mintát fordított fázisú SPE oszloppal extraháltam az optimális mennyiségeket alkalmazva. Korábbi mérések tanulsága alapján a 200 µl-nyi eluens 2 ml-re történő hígítása túlzott mértékű hígulást eredményez, amely nehezítené a meghatározást. Viszont tömény metanol az általam használt RP-HPLC módszer esetén nem injektálható, így bepároltuk a mintákat. Ehhez nitrogén gázt áramoltattunk az eluátumot tartalmazó csövekbe, majd a metanol elpárolgását követően 200 µl-re töltöttük vissza a csöveket a kezdeti eluenssel megegyező eleggyel. Ez 95% „a” - 5% „b” arányt jelent.

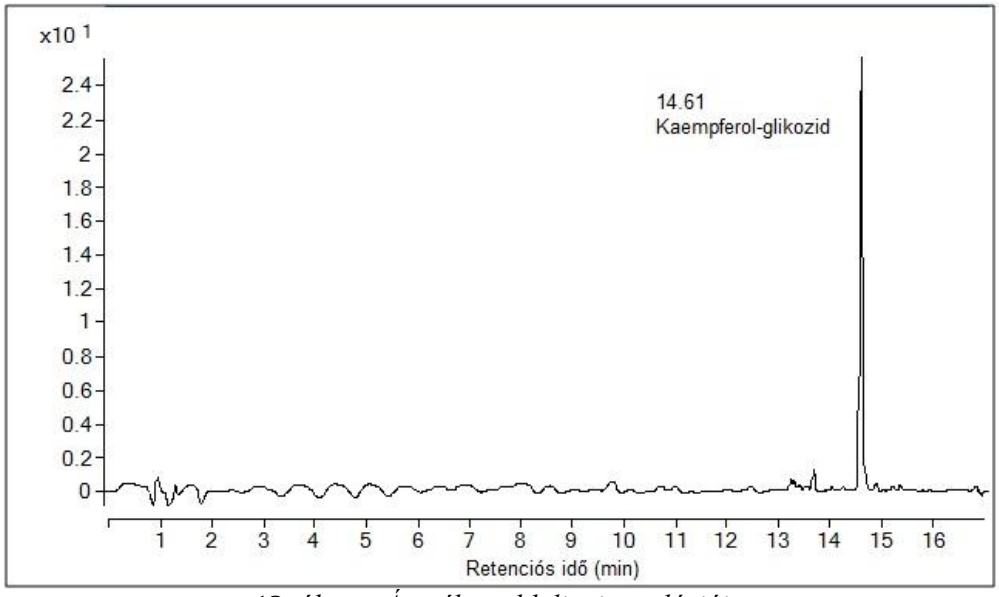
A mintákat HPLC-UV-TOFMS segítségével megmértem. Az alábbi kromatogramok a HPLC-UV-TOFMS készülék 330 nm-en rögzített adatait mutatják.



12. ábra– Vitexin standard oldat elúciója

Első lépésként a vitexin standard oldatot mértem meg, hiszen szükségem volt a vitexin retenciós idejére a minőségi azonosítás lehetővé tételéhez. Az ábráról (12. ábra) látszik, hogy a vitexin 13,45 percnél hagyta el az oszlopot.

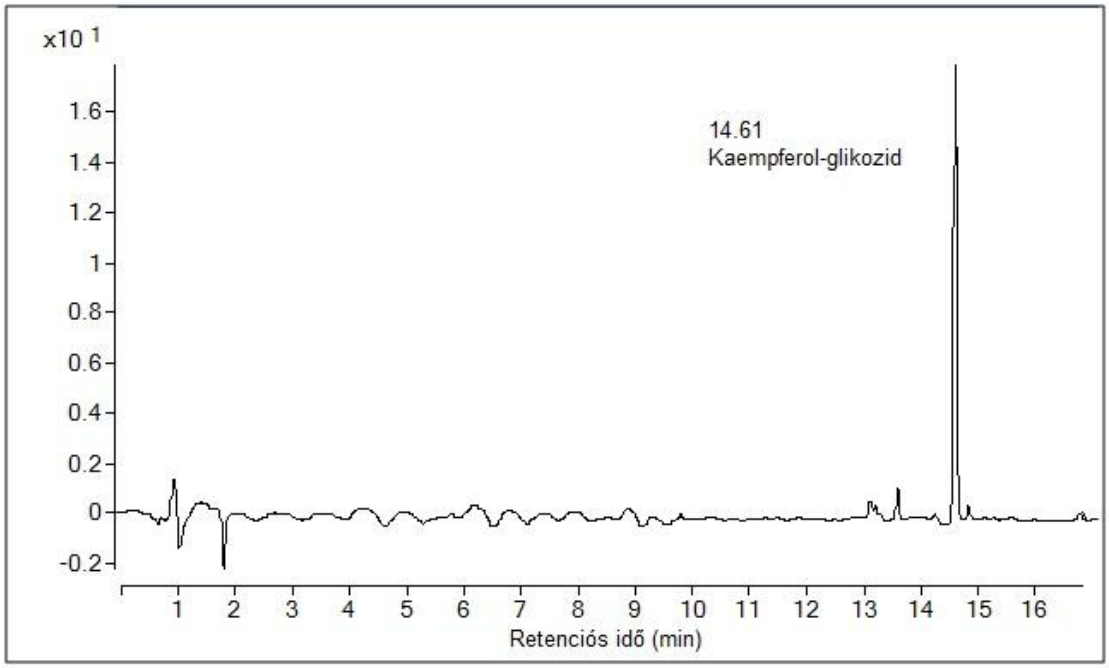
Ennek tudatában az oszlopra vittem az árnyékos és napos oldali mintákat, valamint a mixeket is. Az árnyékos oldali minta kromatogramján (13. ábra) látható csúcs minden bizonnyal a kérdéses flavonoid, azonban a retenciós idejéből egyértelműen látható, hogy nem a vitexinről van szó. Ezt alátámasztják a tömegspektrometriai adatok is, s a molekulatömeg és a fragmentációs sajátságok alapján megállapítható, hogy a komponens vélhetően egy kaempferol-glikozid.



13. ábra – Árnyékos oldali minta elúciója

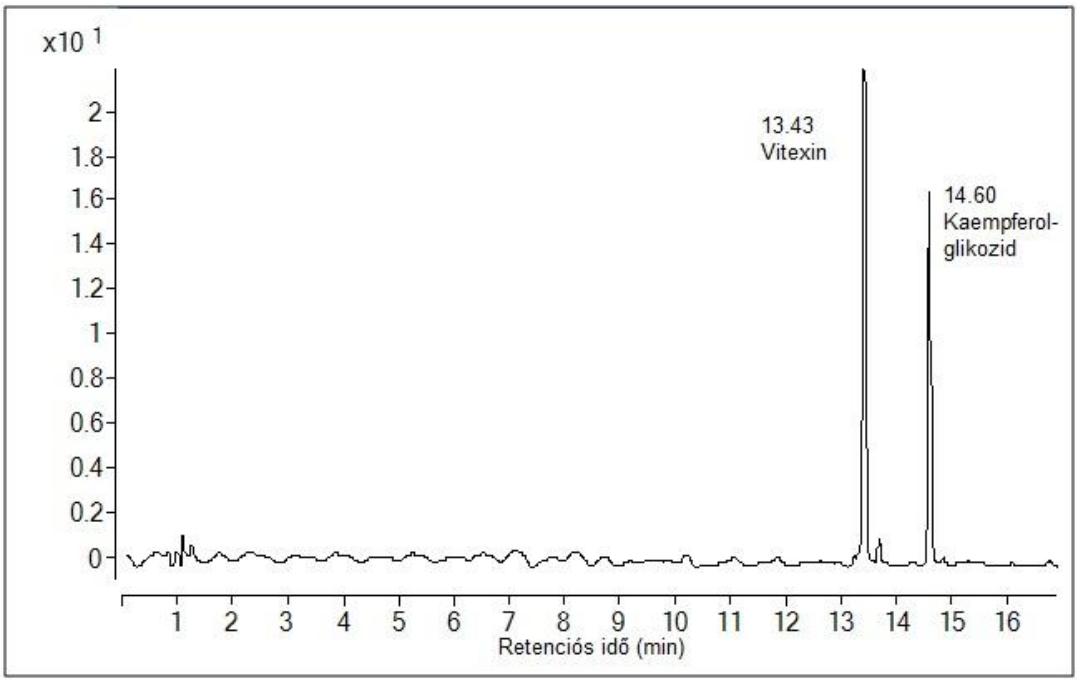
A napos oldalon növő szőlőből származó mintában ugyanezt figyelhetjük meg (14. ábra). A kérdéses flavonoid itt is feltűnik, s retenciós ideje két tizedesjegy pontossággal megegyezik az

árnyékos oldali mintában föllelhető kaempferol-glikozid retenciós idejével. A molekulatömeg adatai szintén ezt támasztják alá.

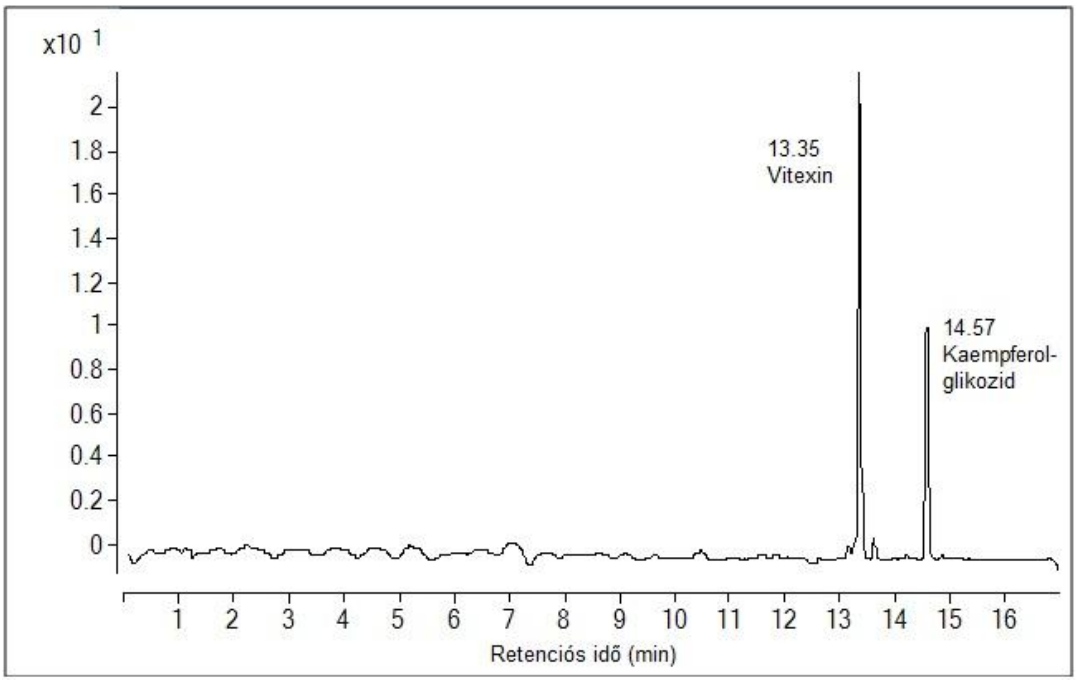


14. ábra – Napos oldali minta elúciója

A mixek elkészítésére azért volt szükség, hogy ha kevésbé egyértelmű eredményeket kapnánk a többi mintából, ez egyértelműen eldöntheti a kérdéses komponens vitexinnel való azonosságát. A mix standard formájában tartalmazta a vitexint, a szőlőlevél-mintában pedig a kérdéses komponens volt jelen. A kettő keverékének kromatogramján jól látható a két elkülönülő csúcs mind az árnyékos, mind a napos minták esetén (15. és 16. ábra).



15. ábra– Árnyékos oldali mix elúciója



16. ábra– Napos oldali mix elúciója

Az adatok és kromatogramok ismeretében egyértelműen kijelenthető, hogy a kérdéses komponens nem vitexin volt. Nagy valószínűséggel állítható, hogy kaempferol-glikozidról van szó, mely a vitexinnel koelúcióban futott a vékonyréteg-kromatográfia alkalmazása során.

A mintaelőkészítés hatékonyságát mutatják a tiszta csúcsok, szép kromatogramok. A vékonyréteg-kromatográfia szelektivitása sokkal kisebb, mint a DAD-UV detektoros HPLC készüléké, így valószínűsíthető, hogy a vizsgált VRK frakcióban nem kizárólag a kaempferol-rutinozid volt jelen. Viszont az eluátum vizsgálatakor zavaró komponenseket nem észleltünk.

Irodalomjegyzék:

1. Andersen, M. O.; Markham, R. K. 2006. FLAVONOIDS - Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press, BocaRaton

2. Arsenault, Joseph C. Waters Corporation 2012. Beginners Guide to Solid Phase Extraction, USA

3. Cueno, Marni E.;Tamura, Muneaki; Imai Kenichi; Ochai Kuniyasu. 2013. Orally supplemented catechin increases heme amounts and catalase activities in rat heart blood mitochondria: A comparison between middle-aged and young rats, Experimental Gerontology, 48: 1319-1322

4. Crozier, A. ; Clifford, M. N. ; Ashihara, H. 2006. Plant Secondary Metabolites, Blackwell Publishing Ltd. Oxford

5. Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. Molecular Aspects of Medicine, 31(6), 446-467.

6. Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. Antioxidants & Redox Signaling, 18 (14), 1818-1892.

7. Duenas, M.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C. 2010. Antioxidant evaluation of *O*-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51:443-449

8. Ge, Q.; Ma, X.2013. Composition and antioxidant activity of anthocyanins isolated from Yunnan edible rose, Food Science and Human Wellness 2: 68-74

9. He, F. J.;Chen, J.-Q. ; Consumption of Soybean, Soy Foods, Soy Isoflavones and breast

cancer incidence: Differences between Chinese Women and Women in Western Countries and possible mechanisms, Food Science and Human Wellness (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.002

10. Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. Current Opinionin Biotechnology, 19(2), 73-82.

11. Kalender, Yusuf; Kaya, Sinan; Durak, Dilek ,Uzun, Fatma, G.; Demir, F. 2012. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats, Environmental Toxicology and Pharmacology, 33: 141-148

12. Kremmer Tibor; Torkos Kornél 2010. Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata, Akadémiai Kiadó Zrt. Budapest

13. Olthof, Margreet R.;Hollman Peter C. H.; Katan, B. Martijn. 2001. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans, Human Nutrition and Metabolism, The Journal of Nutrition. 131: 66–71

14. Rak, Gábor 2010. Polifenolok és származékaik feltérképezése hármas - kvadrupol tömegspektrometriás módszerrel

15. Rodriguez de Sotillo, Delcy V.; Hadley, M. 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa)* Zucker rats, Journal of Nutritional Biochemistry 13: 717-726

Internetes hivatkozások:

1. Dr. Hoffmann Tamás, 2013. Analitikai kémiai módszerek és alkalmazásuk a faanyagkémiában http://cheminst.emk.nyme.hu/kemia2/04Fakemia.pdf (2013.09.30.)

2. http://www.phytochemicals.info/phytochemicals.php (2013.09.30.)

3. http://www.phenol-explorer.eu (2013.09.30)

4. A polifenolok szerepe a táplálkozásban- Patika magazin, 2010.
http://www.patikamagazin.hu/cikk/index/14829/a-polifenolok-szerepe-a-taplalkozasban.html (2013.09.30.)

5. http://en.wikipedia.org/wiki/File:SPE_Manifold.jpg (2013.10.18)