

Debreceni Egyetem
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és
Környezetgazdálkodási Kar

Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet
Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszék
Intézetigazgató: Prof. Dr. Babinszky László

A magyarországi meggyfajták melatonin tartalmának
összehasonlító elemzése

Készítette:

Asbóth Georgina
Élelmiszerbiztonsági és –minőségi mérnök jelölt

Konzulensek:

Dr. Remenyik Judit
egyetemi adjunktus
Homoki Judit Rita
PhD hallgató

Debrecen

2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés.....	4
Témafelvetés	6
1. Irodalmi áttekintés.....	7
1.1. A melatonin története	7
1.2. A melatonin elterjedése az élővilágban:	8
1.3. A melatonin bioszintézise.....	11
1.4. A melatonin fiziológiás hatásai a humán szervezetre:	11
2. Anyag és módszer.....	15
2.1. Vizsgált fajták.....	15
2.2. Minták előkészítés szárazanyag tartalom mérésre:	17
2.3. Minták előkészítés HPLC analízisre:	18
2.4. Melatonin kivonása metanollal tisztítása szilárd fázisú extrakcióval:	19
2.4.1. Kondicionálás.....	20
2.4.2. Mintafelvitel	20
2.4.3. Mosás	20
2.5. Műszeres mérési technikák	21
2.5.1. Kromatográfiás módszerek.....	21
2.5.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia.....	22
2.5.3. Fordított fázisú kromatográfia.....	23
2.5.4. MALDI TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry).....	25
3. Mérési eredmények	26
3.1. Szárazanyag tartalom meghatározás	26
3.2. A melatonin maximális elnyelésének meghatározása:	28
3.3. Adott koncentrációjú kalibrációs oldat csúcs alatti területeinek meghatározása	29
4. Következtetések és javaslatok.....	35
Összefoglalás.....	36
Irodalom jegyzék.....	38
Mellékletek.....	45

Rövidítések jegyzéke

AFMK: N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykinuramin

AMK: N-acetyl-5-methoxykinuramin

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

GABA: Gamma-amino-vajsav

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)

IAA: Indol-3-ecetsav

MALDI TOF-MS :Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF tömegspektrometria)

MT₁: Melatonin receptor 1

MT₂: Melatonin receptor 2

NMR spektroszkópia – Nuclear magnetic resonance spectroscopy (Nukleáris mágneses rezonancia spektroszkópia)

NP-HPLC: Normál fázisú folyadékkromatográfia

RP-HPLC: Fordított fázisú folyadékkromatográfia

SCN: Suprachiasmaticus mag (Suprachiasmatic nuclei)

SPE: Szilárd fázisú extrakció

VRK: Vékonyrétegekromatográfia

DW: (Dry weight) Száraz tömegre vonatkoztatott érték

FW: (Fresh weight) Friss tömegre vonatkoztatott érték

Bevezetés

Az elmúlt években egyre fokozódott az igény az életminőség javítását befolyásoló anyagok (pl. az antioxidánsok) megismerésére, vizsgálatára és felhasználására. Az egyre fokozódó, stresszel teli életmódunk megkívánja, hogy figyeljünk szervezetünk egyensúlyának megtartására. Ehhez azonban sokszor nem elegendő a hagyományos táplálkozással a szervezetünkbe juttatott tápanyagok mennyisége és minősége. Ahhoz, hogy a szervezetünkre jellemző biokémiai folyamatok végbe menjenek, teljes értékű táplálékot kell fogyasztanunk, amelyek természetes formában tartalmazzák az élethez nélkülözhetetlen bioaktív komponenseket. Lehetőségünk van arra, hogy megismerjük és kiválasszuk azokat a természetes forrásokat, melyeket felhasználva meg tudjuk őrizni a szervezetünk egyensúlyát. Az elmúlt években a magyar köztudatba is bekerült a funkcionális élelmiszer fogalma. Funkcionális élelmiszernek nevezzük az olyan táplálékokat, amelyek egészségvédő vagy betegségség-megelőző jellemzőkkel rendelkeznek, valamint az olyan feldolgozott élelmiszereket, amelyek tápláló jellegük mellett élettanilag kedvező hatású komponenseket tartalmaznak: erősítik a szervezet védekező mechanizmusait, hozzájárulnak betegségek kockázatának csökkentéséhez, javítják a fizikai állapotot és lassítják az öregedést. A nemzetközi irodalomban a melatonin nem ismeretlen molekula, több mint 50 éve vizsgálják az N-acetil-5-metoxi-triptamin hatását a humán szervezetre. A kutatások során kiderült, hogy a melatonin élettani hatása sokkal szélesebb spektrumú annál, mint ahogy azt korábban gyanították. Folyamatos kutatásoknak köszönhetően a melatoninról elmondható, hogy lényegében egy belső, általános szabályozó molekula, úgynevezett „összszervező” hormon. Vizsgálatunk alanyának azért a magyarországi meggyfajtákat választottuk, mert hazánk földrajzi, éghajlati adottságainak és a hazai évtizedes nemesítő munkának köszönhetően kimagasló beltartalmi paraméterekkel rendelkező fajták jöttek létre. A hazai meggytermesztésnek évszázados múltja van, az alma mellett a legnagyobb mennyiségben termesztett gyümölcsünk (16 %). Fő termőkörzete az Észak-alföldi régió (34,1 %). A világon egyedülálló fajta szortimenttel rendelkezünk. Legnagyobb mennyiségben Magyarország észak-keleti régiójából szelektált fajtákat termesztjük (57%-ban), így az Újfehértói fürtöst (23 %) illetve Érdi bőtermőt (33%). A magyar meggyfajták egyedülállósága, hogy friss fogyasztásra és feldolgozásra egyaránt alkalmasak. Célunk a fent említett hormonhatású molekula, a melatonin kimutatása a magyarországi meggyfajtákból. Azért választottuk kutatásunk tárgyaként ezt a molekulát, mert az irodalomban nem jelent meg a magyarországi

meggyfajták melatonin tartalmára vonatkozó dolgozat. Másrésről a fokozódik a társadalmi igény az életminőség javítását segítő molekulák megismerésére és felhasználására. Célunk bebizonyítani, hogy a magyarországi meggyfajták a kimagasló beltartalmi paraméterek miatt alkalmasak funkcionális élelmiszer előállításra.

Témafelvetés

Magyarországon a meggy az egyik legnagyobb mennyiségben termesztett gyümölcs, így gazdasági szempontból igen fontos növény. Tudományos jelentősége abban rejlik, hogy rendkívül gazdag antioxidánsokban (vitaminok, színyanyagok) és egyéb bioaktív komponensekben. Jelen dolgozatunk célja, hogy a magyarországi meggyfajtákban megvizsgáljuk a melatonin jelenlétét.

Ezen belül a következő feladatokat kívántuk megvalósítani:

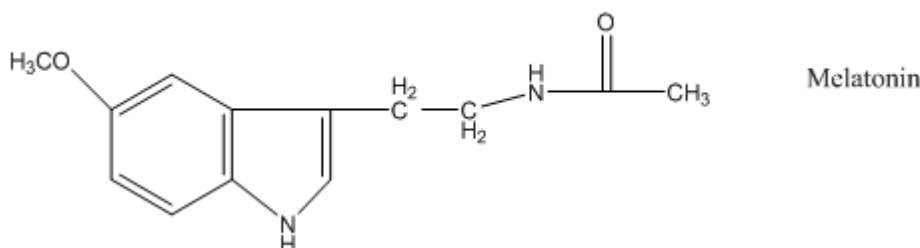
1. A triptofán metabolikus útvonalon szintetizálódó melatonin, irodalmi feldolgozása.
2. Melatonin előfordulása a prokarióta és eukarióta szervezetekben.
3. Megfelelő módszer kiválasztása a melatonin detektálására a vizsgált meggyfajtákban, valamint mennyiségi meghatározása nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiás eljárással.
4. A melatonin molekula jelenlétének igazolása MALDI TOF-MS technikával és NMR analízissel.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A melatonin története

A múlt században nagyon sok tanulmány jelent meg, mely a melatonin és az alvás ébrenlét kapcsolatával, valamint a szervezet biológiai ritmusával foglalkozik. Az elmúlt évtizedekben a melatonin kutatás kiszélesedett, több mint 6250 cikk foglalkozik a melatonin élettani hatásaival és klinikai vizsgálataival. Pergamon (i.sz. 130-200) 2000 évvel ezelőtt leírta a melatonint termelő tobozmirigyet, a glandula pinealist, mely a közti-, és középagy határán a középagy felső ikertestei között fekvő kb.: 0,5 cm hosszú és néhány milliméter széles belső elválasztású mirigy (SZENTÁGOTHAIRÉTHELYI, 1994). Az általa termelt melatonint csak 1958-ban sikerült azonosítani, miután Lernet és munkatársai izolálták szarvasmarha tobozmirigy szövetből származó hormont, amely fő kiválasztási terméke a mirigynek az emlősökben (LERNET et al., 1958., LERNET et al., 1959.). 1995-ig a kutatók úgy gondolták, hogy a melatonin egy kizárólag gerincesekben megtalálható hormon, melynek feladata az alvás ébrenlét ciklus szabályozása. Az elmúlt évtizedekben ezt a hormonhatású vegyületet megtalálták magasabb rendű növényekben, rovarokban, fonalférgekben és gombákban is (TAN et al., 2007., STEHLE et al., 2011., MIGLIORI et al., 2012.). Sikerült kimutatni a melatonint a fotoszintetizáló *Rhodospirillum rubrum* nevű prokariótában is (MANCHESTER et al., 1995). A N-acetil-5-metoxi-triptamin molekula szintézis útvonala erősen konzerválódott. A melatonin molekula eredete becslések szerint 2,5 milliárd évvel ezelőttre vezethető vissza. Feltételezések szerint a melatonin abban az időben fejlődhetett ki, amikor az élő szervezetek megkezdték az átmenetet az anaerob anyagcseréről aerob anyagcsere. Ebből az következik, hogy a melatonin eredeti és elsődleges funkciója az élő szervezetekben az, hogy antioxidánsként szolgáljon, tehát az aerob anyagcsere során keletkezett szabad gyökök eliminálásáért felelős molekula (TAN et al., 2010., HARDELAND et al., 2012., BLASK et al. 2011., MOTILVA et al., 2011.).

A melatonin molekula amfoter tulajdonságokkal rendelkező vegyület. A molekula egy poláris és egy apoláris részből áll. Ez teszi lehetővé, hogy a melatonin poláros és apoláros közegben is jól oldódik, azaz képes transzlokálódni a sejtmembránon és bejutni a sejtekbe és sejtorganellekbe.



1. ábra: Melatonin szerkezeti képlete

1.2. A melatonin elterjedése az élővilágban:

Az N-acetil-5-metoxi-triptaminról sokáig úgy gondolták, hogy egy endogén módon keletkező molekula, amely kizárólag a gerincesekben található meg. Az utóbbi években azonban a melatonint megtalálták ősi prokariótákban (MENCHESTER et. al., 1995.), eukarióta egysejtűekben, valamint rovarokban is. Ezen kutatási eredmények után a melatonin keresése a növényekben elkerülhetetlen volt. Körülbelül egy évtizeddel ezelőtt a melatonint megtalálták a fotoszintetikus dinoflagellate-ban (*Gonyaulax polyedra*). Ezekben a fajokban a melatonin élettani szintje lényeges az antioxidáns védelem szempontjából (POEGGELER et. al., 1994.). A vizsgálatok sikeresen kimutatták, hogy a melatonin a növényvilágban is megtalálható (REITER et. al., 2001.). Ezen eukariótáknál a melatonin bioszintézise a kloroplasztisban valamint mitokondriumban megy végbe (TAN et. al., 2013.). Legújabb kutatások szerint a magasabb rendű növények is termelik az N-acetil-5-metoxi-triptamint, főként a levélben, termésben és a magban halmozódik fel. Növények esetében a melatonin az oxidatív stressztől védi az élőlényt. A melatonin kémiai struktúráját tekintve egy indolamin, szintézise az L-triptofánból indul ki, mely egy esszenciális aminosav, ebből keletkezik a szerotonin, mely egy neurotranszmitter, és keletkezik indol-3-ecetsav (IAA), amely az auxinok családjába tartozik. A melatonin és az IAA hasonlósága néhány kutatót arra ösztönzött, hogy megvizsgálja az exogén melatonin hatását a növekedésre. Sikerült igazolni, hogy a melatonin hatásos növekedési faktor (HERNANDEZ-RUIZ et al., 2004.). Nemrégiben bebizonyosodott, hogy a melatonin serkenti az etiolált csillagfürt sziklevek növekedését (HERNANDEZ-RUIZ-ARNAO, 2008.) és szerepe van a fitoremediációban is (TAN et al., 2007. b, c.). Különböző stressz hatások, mint például intenzív UV sugárzás, akut

hőmérsékletváltozás vagy bizonyos kémiai ágensek eredményeként, néhány antioxidáns vegyület magasabb mennyisége mutatható ki (CANTOS et al., 2000.; ROGGERO-GARCIA-PARRILLA, 1995.). A melatonin szint növekedése kapcsolatban lehet a védelmi mechanizmussal, ami segít megküzdeni ezekkel a stressz hatásokkal. Sőt, azok az alpesi és mediterrán növények, amelyek intenzív UV sugárzásnak vannak kitéve, magasabb melatonin koncentrációval rendelkeznek (CONTI et al., 2002.). Nagy intenzitású UV-B sugárzást alkalmaztak *Guralensis* gyökéren, kétszeresére növekedett a melatonin tartalom, mint alacsony intenzitású UV-B sugárzás esetén. Egyes szerzők úgy vélik, hogy a növények antioxidáns szintetizálásával védik meg magukat a sugárzás ellen (REITER et al., 2007.).

A növények nagy mennyiségű melatonint tartalmaznak. Nagy részét a növény maga szintetizálja, e folyamathoz szükséges valamennyi enzimet ismerjük. Egy kisebb hányadát a melatoninnak, a talajból felszívás során veszik fel a növények vízben oldott állapotban (TAN et al., 2007.). A melatonin antioxidáns hatását az első védelmi vonalon fejt ki. Az élőlényekre jellemző biokémiai folyamatok során a melatonin a kloroplasztisz és a mitokondrium védelmét látja el úgy, hogy detoxifikálja, azaz eliminálja a szabad gyököket. Figyelembe véve a mitokondrium és kloroplasztisz evolúciós eredetét úgy tűnik, hogy ezek az intracelluláris organellek jól képesek szintetizálni a melatonint minden sejtben. Összefoglalva, a mitokondrium és a kloroplasztisz képes a melatonin termelésre (PARK et al., 2013., WANG et al., 2012., REITER et al., 2002., OZTURK et al., 2012., ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2011., SONG et al., 2012.). Számos tanulmány van arra vonatkozóan, hogy a melatonin képes megakadályozni a klorofill bomlását, ezáltal megőrzi a kloroplasztisz fiziológiai hatását, valamint védi a kloroplasztisz integritását és elősegíti a fotoszintézis folyamatát (TAN et al., 2012., ZHANG et al., 2013.). A melatonin gátolhatja a gyümölcs idő előtti lehullását. A mai napig csak kevés növénynek vizsgálták meg a melatonin tartalmát. A melatonin koncentrációja rendkívül különböző a növényekben, valamint nem egyenlően oszlik meg a növényi részekben. Növényi szöveteken belül, a melatonint megtalálták gyökerekben, szárukban, levelekben, gyümölcsökben és a magvakban. A legtöbb elemzett növény ehető. A megvizsgált kevés gyümölcs között melatonint találtak a Montmorency meggyben (16-18 ng/g) (BURKHARDT, TAN, REITER, 2001.). A meggy érettségi foka nem korrelál a mért melatonin szinttel (REITER et al., 2001.). Egy 2000-ben készült tanulmány során a szerzők számos növényfajtnak megvizsgálták a melatonin tartalmát. A publikációkból kiderült, hogy a különböző növényi részek eltérő mennyiségben tartalmazzák a melatonint. Általában elmondható, hogy a növényi magvakban alacsony koncentrációban van jelen a molekula, kb.: 7-29 ng/g száraz

tömegre vonatkoztatva, (MANCHESTER, et. al., 2000.) míg a zöld növényi részekben és a termésekben nagyobb, egyes növényeknél viszont kiugróan magas melatonin koncentrációt detektáltak, kb.: 30-700 ng/g száraz tömegre vonatkoztatva.

Az Amerikai Egyesült Államokban a meggykutatások a „Montmorency” (*Prunus cerasus*) valamint az 1984 óta honosított termesztésbe vont „Balaton” névre átnevezett „Újfehértói fürtös” fajtára terjedt ki (VERES-FÁRI) Texasi kutatók a táblázatba feltüntetett meggyfajták melatonin tartalmát is meghatározták (BURKHARET, TAN, REITER, 2001.). Az alábbi táblázatban összefoglaltuk a tanulmányokban megjelent, eltérő gyümölcshúsokban vizsgált, különböző extrakcióval, valamint detektálási módokkal meghatározott melatonin mennyiségeket.

1. táblázat: Melatonin koncentráció különböző gyümölcs húsokban

Vizsgált növény	Extrakció	Módszer	Koncentráció
Paradicsom (<i>Solanum lycoperscum</i> L.)	aceton-metanol	ELISA	2,5 ± 0,5 ng/g FW ¹
Paradicsom (<i>Solanum lycoperscum</i> esculentum)	éter	ELISA	982 pg/g ²
Szeder (<i>Rubus chingii</i>)	metanol-víz	SPE, HPLC_FD	387 ng/g DW ³
Eper (<i>F. ananassa festival</i>)	aceton	SPE, LC-MS	2,1 ng/g DW ⁴
Meggy (Balaton)	kloroform	HPLC	2,06± 0,17 ng/g ⁵
Meggy (Montorency)	kloroform	HPLC	13,46± 1,10 ng/g ⁵

1

(MASATERU - HIROSHI, 2009.)

2

(PAPE - LUENING, 2006.)

3

(CHEN. et al.,2003.)

4

(STÜRTZ et al., 2011.)

5

(BURKHARET.et a.,2001)

A melatonin elemzése élelmiszerekben némi nehézséggel jár. Először is, néhány növény melatonin tartalma ng/g tartományban található, de más növényeknél még alacsonyabb. Így olyan analitikai módszert kell választani, amely ebben a tartományban is képes a pontos detektálásra. A molekula amfipatikus jellemzője miatt nehéz kiválasztani azt az oldószert, amely a leghatékonyabban képes kioldani a melatonint és a növényi mátrix egyéb komponenseihez kisebb affinitást mutat. A melatonin egy erős antioxidáns (TAN et al., 1993, 2007.a.), amely gyorsan reagál más élelmiszer-összetevőkkel, így a minta óvatos kezelése előfeltétel. Az alkalmazott analitikai módszernél figyelembe kell venni annak érzékenységét és specifikitását növényi mátrixokra (GARCIA-PARRILLA et al., 2009.).

1.3. A melatonin bioszintézise

A melatonin prekursora a triptofán, mely egy esszenciális aminosav, a humán szervezet számára, ami azt jelenti, hogy csak a táplálékkal jut a szervezetünkbe, így az élelmiszereknek eltérő triptofán tartalma okozhatja a melatonin szint ingadozását a humán szervezetben (DOPFEL et. al. 2007.). A szintézis triptofánból indul ki és a triptofán-hidroxiláz enzim segítségével 5-hidroxi-triptofán keletkezik. Ezután dekarboxiláz enzim hatására 5-hidroxi-triptamin, ismertebb nevén szerotonin keletkezik. A következő lépésben N-acetil transzferáz segítségével N-acetil-szerotoninná alakul, majd a legvégén hidrox-indol-O-metil-transzferáz enzim alakítja melatoninná. Az előzőekben levezetett szintézis útvonal jellemző valamennyi élőlénynél, az emlősöknél, gombáknál, baktériumoknál és a növényeknél is (SALISBURY-ROSS, 1992., YU HS-REITER, 1993., BLAZER-HARDELAND 1996.).

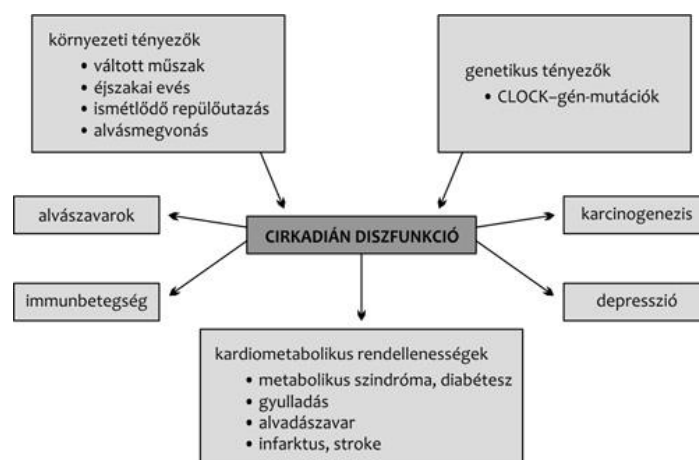


2. ábra: A melatonin bioszintézis útvonala.

1.4. A melatonin fiziológiás hatásai a humán szervezetre:

Melatonin szerepe a cirkadián ritmusban: A tobozmirigy (glandula pineale) melatonin szekréciójának fontos szerepe van a cirkadián ritmus kialakulásában. Ellentétben a klasszikus

endokrin mirigyekkel, a tobozmirigyet nem befolyásolják más belső elválasztású mirigyek, vagy az azokból származó hormonok. A melatonin termelés fő szabályozója a fény. A tobozmirigy éjszaka folyamán bőségesen termel melatonint (REITER, 1993.). A cirkadián ritmus kialakításában fontos szerepet játszanak kiterjedt idegrendszeri területek, úgy, mint a SCN vagy más néven a szuprakiazmatikus mag, amely vezérli a melatonin szekréciót. A mag az agyalapon helyezkedik el és körülbelül 10 000 neuronból áll. A mag neuronjaiban endogén ritmusgenerálás mutatható ki. Ide futnak a retinából jövő nem vizuális rostok is. Ez a retina-hypothalamus összeköttetés. Amennyiben ezek a neuronok bármilyen károsodást szenvednek, az élőlény napi ritmusa felborul. A napfelkeltevel növekszik a retina fotoreceptorai által érzékelt fény intenzitása, amely az agyba jutva csökkenti az SCN-n keresztül a tobozmirigy aktivitását, ezzel elősegítve a szervezet ébredését. A szervezet a délután folyamán éri el a legalacsonyabb melatonin szintet. Nagyon jó példa a cirkadián ritmus megzavarására az úgy nevezett „jet-lag” jelenség. Ez azt jelenti, hogy ha valaki repülőgéppel több időzónát is átrepül, akkor az utazásokat követően több napba is telhet az egyéni alvás alkalmazkodása a helyi időkhöz. Melatonin tartalmú készítmények szedésével az alkalmazkodás mértéke javítható (FONYÓ et al. 2007.). Az alábbi ábrán látható a cirkadián ritmus nem megfelelő működésének okai és következményei:



3. ábra: A cirkadián ritmus diszfunkció okai és következményei (I₁)

A melatonin nagyon hatásos szabad gyök megkötő vegyület, sokkal hatékonyabb, mint a referenciának számító E-vitamin (CLAUSTRAT et al, 2005.). A humán szervezetekben a biotranszformáció során más biogén aminosavakká alakul pl. kinuraminok. A szervezetben a melatonin biotranszformációja két lépésben történik.

Az első lépésben a melatonin direkt oxidáció során N-acetil-N-formil-5-metoxi-kinuraminná alakul. (Ezt in vitro kísérletben igazolták. Teljes kinetikai és szerkezetvizsgálatokkal írták le. A kísérletekben vizsgálták a melatonin és a H₂O₂ reakcióját.)

Második lépésben az AFMK-t a kataláz enzim átalakítja N-acetil-5-metoxi-kinuraminná. Ezt a származékot a plazmából is sikerült kimutatni. Leírták egyes biokémiai folyamatokban a szerepét, így pl. az AMK gátolja a prosztaglandinok bioszintézisét, vagy képes hozzákapcsolódni a GABA receptorokhoz (ZUROWSK et al.,2012).

Az N-acetil-5-metoxi-triptamin adagolása gátolja a daganatok növekedését ezért preventív hatása van. Megelőző szerepe nagyban függ az ember életmódjától és az étkezési szokásaitól is. A melatonin prekursora a triptofán, így az élelmiszereknek eltérő triptofán tartalma okozhatja a melatonin szint ingadozását a humán szervezetben (DOPFEL et. al. 2007.). Az infarktusban szenvedő betegeknek a melatonin szintje alacsony. A melatonin antioxidáns hatása segít megelőzni a reaktív oxigénformák okozta kóros folyamatok kialakulását, amelyek sokszor vezetnek szív- és érrendszeri elváltozásokhoz. A melatoninnak vérnyomás szabályozó szerepe is ismert. Egy patkányokon végzett tanulmány arról számol be, hogy az állat tobozmirigyének eltávolítása magas vérnyomást okozott (CLAUSTRAT et al, 2005.). Számos ideggyógyászati esetben bizonyították, hogy egyes kórfolyamatokban, úgy, mint az epilepszia, a stroke és a migrén esetében a betegeknek mindig kevesebb volt a melatonin szintjük a fiziológiához viszonyítva. Melatonin bejuttatása a szervezetbe megoldás lehet e páciensek kezelésében (CLAUSTRAT et al, 2005.). Ezen kívül szerepe van immunfunkcióban, retina élettanában, tumor gátlásban és nemrég antioxidánsként is azonosították (MALPAUX et al., 2001., REITER et al.,1993., GUERRERO et al.,2002., DUBOCOVICH et al.,1999., BLASK et al. 2002., REITER et al., 2002., TAN et al.,2002.). Ezt igazolja az a tény is, hogy kétféle melatonin receptort identifikáltak a humán szervezetben: MT₁ és MT₂ receptorokat. Több szervben is megtalálták ezeket a receptorokat, például az agyban, retinában, keringési rendszerben, májban, vesében, immunsejtekben, bőrben, prosztatában és mellkasi sejtekben (EKMEKCIOGLU et al., 2006.). Tulajdonképpen kijelenthető, hogy ezek a receptorok a fontos szervek valamennyi sejt felszínén előfordulnak. Melatonin receptorok már magzati életben is találhatók (MACCHI et al., 2004.) és a 26. héttől kezdve az embrióban melatonin szintézis is zajlik. A magzat az anyaméhben is kapcsolatba kerül a melatoninnal, mert a méhlepényen átjutva az embrió bioritmusát is szabályozza. A születést követő 2-3 hónapban a melatonin szint nem mutat cirkadián ingadozást. A gyermek fejlődése során a melatonin termelés csúcspontja 3-6 éves korban van, majd a melatonin szintézis 80%-ra csökken, amíg az egyén eléri a felnőtt kort (MACCHI et al., 2004.). Bár a tobozmirigy egy belső elválasztású mirigy, de nem képes tárolni a termékét ezért az a termelődést követően a véráramba kerül, és a keringéssel eljut a különböző szervekbe, ahol gyorsan kiválasztódik. Az N-acetil-5-metoxi-triptamin víz-, és

lipid-oldékony molekula, ez a tulajdonsága azért érdekes, mert így a molekula könnyen átjut a sejtmembránon keresztül. A keringésbe jutva a melatonin kiválasztódik a nyálba, vizeletbe, bekerül az anyatejbe, valamint a gerincfolyadékba. Ez a hormon a hajnali órákban három és négy óra között található meg a felsorolt testnedvekben (CLAUSTRAT et al., 2005.). Az 1990-es évek közepén terjedt el a melatonin tartalmú készítmények szedése, főleg az álmatlanságban szenvedőknél kezdték el használni. A készítményeket alapvetően két forrásból állítják elő. Növényi- és állati kivonatokból, amelyeket az adott élőlény tobozmirigy kivonatát tartalmazzák. Ez a kivonat állatok esetében tartalmazhat vírusokat és olyan fehérjéket melyek antitestképződést generálnak az emberi szervezetben, azaz potenciálisan allergének lehetnek. Ezért a szakemberek azt tanácsolják, hogy amennyiben lehetséges ne ezeket a készítményeket alkalmazzuk. A másik forrás a szintetikus melatonint tartalmazó termékek. A medicina valamint a farmakológia is e formának a felhasználását támogatja. A melatonin szedését tanácsos elkerülni gyermekeknek és terhes nőknek hisz a méhlepényben kiválasztódik és bejut az embrió szervezetébe is. A melatonin nem szedhető együtt drogokkal és alkohollal (GYÓGYSZER KOMPENDIUM 2005).

2. Anyag és módszer

2.1. Vizsgált fajták

A vizsgált meggyfajtákat 2012-ben az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A minták biológiai érettség állapotában kerültek szedésre, majd hűtött körülmények között szállították a Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszékre, ahol feldolgozásig -20°C-on, sötét helyen tárolták.

2. táblázat: Vizsgált fajták tulajdonságai

Cigánymeggyek (Convarietas acida)		
Fajta	Eredete	Jellemzői
Cigánymeggy7	Brózik Sándor szelektálta 1952-ben.	Június végén érik. Gyümölcse gömbölyded, átlagtömege 3,1g. Héja sötétpiros. Sötétpiros húsa lédús. Festőlevű. Íze igen savas. Gépi rázással is szüretelhető. Gyümölcse főként feldolgozásra alkalmas (dzsem, íz, lé).
Cigánymeggy59	Tájfajta kutatás során Brózik S. szelektálta.	Június végén érik. Gyümölcse 3,3g átlagtömegű. Héja sötétpiros. Sötétpiros húsa lédús, festőlevű. Íze igen savas. Gyümölcse főként feldolgozásra alkalmas (dzsem, íz, lé).

Maraszka meggyek (Convarietas vulgaris – provarietas maraska)		
Fajta	Eredete	Jellemzői
VN1 VN4	A Bosnyák meggy fajtakörből szelektált változat.	Gyümölcsei egyszerre érnek a fán, teljes érésben kocsányuk szárazon válik. Érési ideje június harmadik fele. Gyümölcs kicsi vagy közepes (3,5-5,0g). Alakja kissé megnyúlt gömb, héja középvastag, sötét kárpintpiros színű. Fő értékét a betegségekkel (blumeriella, monília) szembeni nagyfokú ellenállósága adja, így a környezetbarát technológia alkalmazására kiválóan megfelel. Gyümölcse frissen fogyasztható. Antioxidáns tartalma nagy.

Üvegmeggyek (Convarietas vulgaris – provarietas vulgaris)		
Fajta	Eredete	Jellemzői
Pándy 279	A Kertészeti Egyetem kamaraerdei törzsgyűjteményéből Brózik Sándor szelektálta.	Érés ideje: június vége-július eleje. Gyümölcsének átlagtömege 6,3g. Gyümölcse felülről nyomott gömbölyded. Erős héja sötétbordó. Szívós húsa piros, lédús, erősen savas, jellegzetes zamatú. Virágrügyei és virágai fagyűrők. Géppel szüretelhető.
Érdi jubileum	Apostol János és Maliga Pál. szelektálta	Június 12.-én kezd érni, és majd három hétig minőség csökkenés nélkül eltartható a fán. Gyümölcse megközelítőleg 21-23mm átmérőjű, tömege hozzávetőleg 4,7-5,9 gramm. Héja az érés kezdetétől a teljes érettségig a sötét kármínpirosból feketés bordópirossá alakul. Hússzíne az érettség kezdeti szakaszában piros, majd az érés folyamán bordópirossá válik. Savanykás-édes ízű fajta.
(A, E, M)¹ 1 Az A, E, M, fajták a Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft. szóbeli közlése alapján Újfehértói Fürtösre szelektált fajták.	Nemesítők: Szabó Tibor és Pethő Ferenc. Újfehértó környékén végzett tájszelekcióból származik.	Július elején érik, érése elhúzódó. Gyümölcse jellemzően 5-6 g tömegű, átlagosan 22-24 mm átmérőjű, lapított gömb alakú. Héjszíne fénylő bordópiros, húsa közepesen kemény, vérpiros, közepesen festőlevű

A táblázatban szereplő meggy fajták jellemzői (SOLTÉSZ 2005 (I₂) és FALUBA és munkatársai 1982 nyomán valamint, APOSTOL J. 2003.)

2.2. Minták előkészítés szárazanyag tartalom mérésre:

A minta előkészítés során a meggy húst apró kockákra vágtuk, ezt -80 °C-on előfagyasztottuk két órán keresztül. Ezután liofilizálás előtt -18 °C-on tároltuk az előkészített mintát. A

liofilizálást, CHRIST ALPHA 1-4 LSC típusú berendezéssel végeztük (3. sz. melléklet). A fagyasztva szárítás -20 °C-on történt. A polc hőmérséklet +20°C, 1,030 mbar nyomáson. A szárítás időtartama 12 óra volt. A liofilizálás lépését háromszor ismételtük. A kapott mintát porítottuk (2. sz. melléklet) és a pontos tömeg ismeretében aránypárral kiszámoltuk az egyes fajták szárazanyag tartalmát.

2.3. Minták előkészítés HPLC analízisre:

A vizsgált meggyfajtákat feldolgozásig fagyasztva tároltuk, annak érdekében, hogy a meggy gyümölcs ne sérüljön, azaz enzimatis folyamatok leálljanak. Erre azért van szükség, mert a bioaktív komponenseket így tudjuk megőrizni. A minták felolvasztása után a meggy magot eltávolítottuk, ezt követően megkezdjük a meggy gyümölcs feltárását. A homogenizálást Braun Multiprimer (300 Watt) készülékkel végeztük. Ezt követi az extrakció folyamata.

Ahhoz, hogy az extrakció eredményes legyen, a kivonó közegnek be kell jutnia a sejtek belsejébe és oldania kell a sejt tartalmat. Ez a folyamat a sérült sejtekben akadálytalanul végbemegy, és a sejt tartalom kioldódik, ezért a kivonás első és igen fontos lépése a sejtek feltörése. A kioldás tulajdonképpen a diffúzió folyamatával jellemezhető. A diffúzió lehet szabad diffúzió, amikor a tömény oldat szabadon diffundál az oldószerrel, ill. lehet gátolt diffúzió, amikor a kivonó folyadéknak a sejt falon be kell jutnia és oldania kell a sejt tartalmat, valamint ennek a tömény oldatnak ki kell jutnia a sejtből. Ez a folyamat duzzasztással meggyorsítható. A kivonásra jellemző, hogy egyensúlyra vezető folyamat. A sejt lé koncentrációja nagy, a töltő lé koncentrációja nulla. A diffúziós folyamat egyre csökkenő sebességgel mindaddig tart, míg az egyensúly be nem áll, azaz a sejt lé és a töltő lé koncentrációja egyenlő nem lesz (RÁCZ – SELMECZI, 1991.). A kioldást különböző tényezők befolyásolják, pl.: ha nő a sérült sejtek aránya, akkor szabad diffúzió aránya is nő ez által az extrakció hatékonyabb lesz. Ezért a vizsgálatban szereplő valamennyi mintánál a homogenizálást Braun Multiprimer (300 Watt) készülékkel végeztük. A másik fontos tényező, hogy a sejt lé és a töltő lé közötti koncentráció különbséget fenn kell tartani. Ez több módon is történhet, pl.: növeljük a töltő lé mennyiségét vagy a töltő lét megújítjuk, ez lehet szakaszos vagy folyamatos. A melatonin kioldáshoz mi nagy mennyiségű töltő lét alkalmaztunk melyeknél a kioldás folyamatos volt, azaz a töltő lét nem cseréltük a kivonás során. A kivonás hatékonysága szempontjából fontos még a hőmérséklet szerepe. Köztudott, hogy a hőmérséklet növelésével nő a szabad és gátolt diffúzió sebessége (Dr. RÁCZ-Dr. SELMECZI, 1991.). Mi a kivonást szobahőmérsékleten végeztük, mert töltő lére és a vizsgálni kívánt hatóanyagra is igaz, hogy nem termotabilisak. Töltő lének a kloroformot választottuk. Erre az

oldószerre jellemző, hogy vízzel nem elegyedik így a diffúzió sebessége és annak hatékonysága is csökkenhet. A kivonás módszerei közül az áztatást választottuk, mely folyamatos volt. A kloroform több szempontból jónak bizonyult, mert megfelel a töltőlével szembeni követelményeknek, azaz oldja a hatóanyagot és nem lép azzal reakcióba. Annak érdekében, hogy a koncentráció különbség megmaradjon és a diffúzió sebessége ne csökkenjen a töltőlé háromszorosát adtuk az egyes meggyfajták tömegéhez. Az extrakciót állandó kevertetéssel tettük még hatékonyabbá. Az áztatás előnye, hogy a munkabefektetés igen csekély, valamint azonos kiindulási anyagok esetén azonos hatóanyag-tartalmú kivonat nyerhető. 200 g szobahőmérsékleten felolvasztott magozott meggy pulp-hoz 600 ml kloroformot és 300 µl Na₂HPO₄-ot adunk, majd 40 percig szobahőmérsékleten mágneses keverővel kevertettük. A melatonin fényérzékenysége miatt a kevertetés sötétben történt (4. sz. melléklet) (REITER RJ., et. al. 2005, Remenyik által módosítva 2012). A következő lépés a szűrés folyamata. Első lépésként durva szűrést alkalmaztunk gézen át. A szűrletképzés során nagyon fontos a préselés folyamata, mert ebben az esetben a sejtekben lévő oldat egy jelentős részét is kinyerjük. Ezután választótölcséren elválasztjuk a két fázist (5. sz. melléklet). Ezt követően a szerves fázishoz 2 kanál szárított magnézium-szulfátot adagoltunk. Abban az esetben, ha a vizes fázist nem sikerült maradéktalanul eltávolítani megismételjük a szárított magnézium-szulfát hozzáadását és finom szűrést végzünk szűrőpapírral. Ezt követően a szerves fázist bepároltuk, Büchi Rotavapor R-210/215 (Switzerland) vákuumbepárlóval. A bepárlás 40 °C –os vízfürdőn történt 180, 150, 100, 80, 65, 45 mBar nyomáson (6. sz. melléklet). Az oldatot szárazra pároltuk (7. sz. melléklet). A minta tömegét visszamértük és ezzel a lépéssel az extraktumot előkészítettük HPLC analízisre. A melatonin azonosításához és az egyes fajtákban előforduló melatonin mennyiségi jellemzéséhez Melatonin 99+% Alfa Aesar (Germany) standardot használtunk.

2.4. Melatonin kivonása metanollal tisztítása szilárd fázisú extrakcióval:

Az irodalomban leggyakrabban alkalmazott, szilárd fázisú extrakciós eljárást kiviteleztek a vizsgálni kívánt meggyfajtáknál. A kloroformos kivonásnál említett minta előkészítést lépései megegyeznek. Az előkészített meggy pulp (Biosan MSH300) mágneses keverővel háromszor két órán át kb.: 150 cm³ metanollal kevertettük mindhárom alkalommal tiszta metanolt alkalmaztunk annak érdekében, hogy a macerációs folyamat hatásfokát növelni tudjuk. Ezt követően a szűrés és a centrifugálás megegyezik a kloroformos extrakciónál elvégzett műveletekkel. Ezt követően (BUCHI Vacuum Controller R-210) rotációs

vákuumbepárlón 40 °C-on 65, 55, 40 mbar nyomáson 10-15 cm³-re pároltuk, hogy a még benne maradó gyümölcsrostokat eltávolítsuk centrifugálással. A felülúszóval dolgoztunk tovább. A minták feldolgozása során az alkalmazott módszerek közül a szilárd fázisú extrakciót választottuk (CHEN et al., 2003.), melynek lépései a következők (Elválasztástechnika Laboratóriumi gyakorlat jegyzet):

2.4.1. Kondicionálás

A kondicionálás az a folyamat, mely során a kolonnát (Supelclean ENVI-18 SP0920D) közepes polaritású szerves oldószerrel nedvesítjük. Ezáltal a szorbens szemcséi közötti térből a levegőt eltávolítjuk, illetve megtörténik, az aktív ligandumok solvatációja. Az oszlop aktiválásához első lépésben 3 ml metanolt alkalmaztunk. Majd ezt követi az egyensúly beállítása, amit többnyire egy olyan oldószerkelet biztosít, ami a szerves oldószer tartalmát, pH-ját és ionerősségét tekintve hasonlít a mintamátrixra. A vizsgálatainkhoz mi 3 ml bidesztillált vizet (Milli-Q plus system) használtunk. Ez után a mintát felvittük az oszlopra úgy, hogy a lépések során a töltet ne száradjon ki.

2.4.2. Mintafelvitel

A minta tisztítása az oszlop (Supelclean ENVI-18 SP0920D) segítségével történik. 1 ml vizsgálandó mintát pipettával gondosan felvittünk a fordított fázisú oszlopra mialatt az egyes komponensek különböző erősséggel tapadnak meg a fordított fázisú oszlop töltetén. A mintát megfelelő sebességgel áramoltattuk át, a kolonnán azért, hogy a megfelelő kölcsönhatások kialakulásához elegendő idő álljon rendelkezésre.

2.4.3. Mosás

Az első lépés a gyengén kötődő komponensek eltávolítására szolgál. A lemosáshoz használt oldószert úgy választottuk meg, hogy a minta felvitelénél erősebb, de az elúciós oldószernél gyengébb legyen, és lehetőleg jól elegyedjen azokkal, ez azért fontos, mert így el tudjuk kerülni a kolonna teljes kiszáradását, ami az elválasztás szempontjából kedvezőtlen lenne. A vizsgálatainkhoz első lépésben 15%-os metanolt alkalmaztunk, ahol a fordított fázisú oszlophoz gyengén kötődő komponenseket mossuk le a különböző cukrokat mono- és diszacharidokat pl.: glükóz, fruktóz, szacharóz. Ezután 85%-os metanolos-oldatot használtunk ezzel az oldószer eleggyel az egyéb fenolos komponenseket mossuk le a kolonnáról. Ez azért fontos lépés, mert a fenolos vegyületek pl.: az antocianinok egy jó része színes, összetevők melyek jelenlétükkel meggátolják a melatonin detektálását. Az elúció utolsó lépéseként erős oldószert a diklórmétánt alkalmaztunk ezzel lehetőségünk volt arra,

hogy a triptofán metabolitokat pl.: IAA-t, szerotonint melatonint, lemoszuk az oszlopról. A triptofán metabolitot tartalmazó frakciót 40 °C-on rotációs vákuumbepárló segítségével szárazra pároltuk, majd ezt a mintát 1000 µl metanolba felvettük ezt követően nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) eljárással detektálni próbáltuk a meggyben előforduló triptofán származékot.

2.5. Műszeres mérési technikák

Kvalitatív és kvantitatív mérésekre volt szükség a melatonin identifikálásához.

Műszeres mérési technikák közül a következőket választottuk:

1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC): Detektálni tudjuk a vizsgálni kívánt meggy minták melatonin tartalmát, és mennyiségét.
2. MALDI TOF-MS: Az extraktumból izolált anyag molekulatömegének meghatározása.
3. NMR analízis segítségével a tisztított vegyület szerkezetét igazoljuk.

2.5.1. Kromatográfiás módszerek

A kémia két fő területre osztható, a szintézisre és az analízisre. A két terület szorosan összefügg egymással, a szintézis nem képzelhető el analízis nélkül. Ha a vizsgálandó minta több komponensből áll és/vagy a rendelkezésünkre álló analitikai módszer nem specifikus, akkor a mérés előtt elválasztásra is szükség van. Az elválasztási eljárások összessége az elválasztástechnika, melynek egyik széles körben elterjedten alkalmazott módszere a kromatográfia. A kromatográfiás eljárásokat alapvetően két csoportba sorolhatjuk az elválasztás céljától függően: preparatív és analitikai kromatográfia. Preparatív kromatográfia esetén cél az elválasztás, a detektálás ebben csak segédeszköz, ellentétben az analitikai kromatográfiával, ahol a detektálás, vagyis a mérés a cél. Ehhez segédeszközként használjuk az elválasztást.

A folyadékkromatográfiát akkor választjuk, ha:

- a minta illékony, és megfelelően detektálható,
- a VRK nem elegendő érzékenységgű, pontosságú és szelektivitású
- HPLC áll rendelkezésre (8. sz. melléklet).

A kromatográfia erőteljes szorpciós-deszorpciós folyamatokon alapuló nagy hatékonyságú elválasztási módszer. A vizsgálandó minta ún. vivő, fluid fázis segítségével áramlik keresztül egy megfelelően választott állófázison. A minta komponensei egyenlőtlenül oszlanak meg a mozgó és az álló fázis között, a két eltérő fázishoz való affinitásuk, vagy a fázisban való

diffúziós lehetőségük alapján. Az álló fázis mentén a két fázis között beálló egyensúlyi állapotok eredményeként különböző sebességgel haladó komponensek elválnak egymástól, illetve az álló fázist időben elkülönítve hagyják el (BARCZA-BUVÁRI, 2008.). Az elválasztott alkotók vizuálisan, vagy valamilyen fizikai vagy kémiai tulajdonságuk, sajátos tulajdonságuk mérése alapján megkülönböztethetők egymástól és mennyiségük meghatározható. Méréseink során a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszert használtunk fel.

2.5.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Alkalmazási területei közül fontos szerepe van gyógyszer analitikai vizsgálatokban, élelmiszeripari vizsgálatokban (vegyszermaradványok: peszticidek, színezékek, különböző hatóanyagok: polifenolok, zsír- és vízdékony vitaminok meghatározásában), környezetanalitikai mérésekben (növényvédőszer maradványok, toxikus vegyületek analízisében), toxikológiai vizsgálatokban (droganalízisben, gyógyszer hatóanyag minőségi és mennyiségi elemzésében), valamint egyre több szerepe van kutató laboratóriumok elválasztástechnikai vizsgálatainak megoldásában. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography), olyan oszlopkromatográfiás módszer, ahol a folyadék mozgófázist kisméretű tölteten nagy nyomással (30-400 bar) áramoltatjuk keresztül (BOROSS, 2003.). Szervetlen és szerves vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására alkalmas technika, amelyben kis szemcseméretű, meghatározott típusú álló fázissal töltött kromatográfiás oszlopon (kolonnán) az oldószer (mozgófázis) áramlását nagynyomású, pulzálásmentes pumpa biztosítja. A kolonnán elválasztott komponenseket különböző típusú detektorral folyamatosan észleljük. Az így nyert kromatogramon a retencióra vonatkozó adatok az anyag azonosítására, a görbe alatti terület pedig mennyiségi meghatározására alkalmas. Az elválasztás hatékonyságát, szelektivitását és érzékenységét az álló- és mozgó fázis megfelelő változtatásával jelentősen befolyásolhatjuk. A kromatográfiás módszereket legegyszerűbben az alkalmazott állófázis szerint csoportosíthatjuk. Történelmi okokból a poláris állófázison (szilika) apoláris oldószer eleggyel végzett elválasztás kapta a „normál fázisú” kromatográfia elnevezést (NP-HPLC), míg az apoláris állófázis alkalmazását poláris oldószerkevergekkel a fordított polaritási viszonyok miatt, fordított fázisú kromatográfiának (RP-HPLC, RPC) nevezték. Mechanikailag stabil adszorbens, amelynek alkalmazhatósága széleskörű, ezen tulajdonsága birtokában használata jobban elterjedté vált az állófázisok körében. Másrészt a szilika fázis mellett számos egyéb poláris fázist fejlesztettek ki, így Alpert 1990-ben a poláris

állófázisokon végzett kromatográfiára a HILIC hidrofíli kölcsönhatás kromatográfiára (Hydrophilic Interaction Chromatography) elnevezést javasolta (BARCZA-BUVÁRI, 2008.).

3. táblázat: Kromatográfiás módszerek és jellemzőik (I₃)

Kromatográfiás módszer	Állófázis minősége	Mozgófázis minősége
<i>Normál fázisú kromatográfia (NP-HPLC)</i>	poláris töltet	apoláris
<i>Fordított fázisú kromatográfia (RP-HPLC)</i>	apoláris töltet	poláris
<i>Ionkromatográfia (IC)</i> Ionpár kromatográfia (MPIC) Ioncserés kromatográfia (HPIC) Ionkizárásos kromatográfia (HPICE)	apoláris töltet töltéssel rendelkező töltet kationcserélő töltet	poláris oldószer + ionpároképző puffer oldat puffer oldat
<i>Méretkizárásos kromatográfia (SEC)</i>	nagy pórusátmérővel rendelkező töltet (gél)	víz vagy szerves oldószer
<i>Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)</i>	hidrofób felületű töltet	sótartalmú oldat, elválasztás során csökkenő só koncentráció

A HPLC technika előnyei:

- klasszikus oszlopkromatográfiás módszerekhez képest gyors (hagyományos ioncserélő kromatográfia elúciós sebessége 6-20 ml/óra, HPLC 1-2 ml/perc),
- rendkívül jó felbontóképességű,
- nagy érzékenység és hatékonyság jellemzi.

A HPLC technika hátrányai:

- számolni kell az oszlopeltömődés lehetőségével,
- a finom szemcseméret miatt kiválóan vezérelt és pulzálásmentes szivattyúkat kell alkalmazni,
- nagy tisztaságú oldószer szükséges (I₄).

2.5.3. Fordított fázisú kromatográfia

Az elválasztás alapja az állófázis apoláros oldalláncai és a minta hidrofób csoportja közötti kölcsönhatás. Az RP-HPLC-hez alkalmazott állófázisok erősen hidrofób karakterűek. Általában szilika alapú hordozóhoz kovalensen kötött alkil- (leggyakrabban C18) csoportot tartalmaznak a felületen. A felülethez kötött alkil-láncok mennyisége, a borítottság is befolyásolja a felbontást. A mozgófázis kiválasztásánál az oldószererősség, a viszkozitás és az UV-detektálás esetén az oldószer UV-elnyelése a meghatározó (BARCZA-BUVÁRI, 2008.).

A mintákat analizáltuk a Merck -Hitachi LaChrom nagyhatékonyságú folyadékkromatográf diódasoros detektorral L-7455, automata mintavevővel L-7250, interface L-7000, pumpa L-7100 és a HPLC rendszerhez Manager szoftvert, használtunk.

2.5.4. MALDI TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)

A MALDI TOF technikát Koichi Tanaka használta először biomolekulákra. Ennek a módszernek nagy előnye, más tömegspektrometriás módszerekkel szemben, hogy megfelelő mátrix alkalmazásával egyszerűbbé teszi a spektrumok értékelését valamint lehetővé teszi nagy tömegű molekulák és elegyek vizsgálatát (TANAKA, 1998.). A mátrix a nem illékony molekulát segíti a gáz fázisba juttatni egy lézer segítségével. A lézer impulzusszerűen sugározza be a mátrix-minta kristályokat, a lézer energiáját a mátrix molekulái elnyelik, kristályból gázfázisba kerülnek, míg a velük együtt kristályosodó molekulákat is magukkal ragadják. A gázfázisba jutott molekulák molekulatömegét TOF (time of flight) repülési idő alapján mérik. A töltéssel rendelkező részecskék egy gyorsító feszültség hatására egy adott sebességgel fognak repülni. A különböző molekulatömegű részecskék eltérő idő után csapódnak a detektorba, ahol elektromos jelet hoznak létre. Megfelelő kalibrálás után a molekulatömeg meghatározható (TANAKA, 1998.).

A MALDI TOF-MS analízist a melatonin molekula azonosítására alkalmaztuk.

Az eljárás előnyei:

- Nagy érzékenységű,
- mikro szekundum alatt ad spektrumot teljes tartományban,
- felső tömeghatára elméletileg nincs,
- nem fragmentál.

3. Mérési eredmények

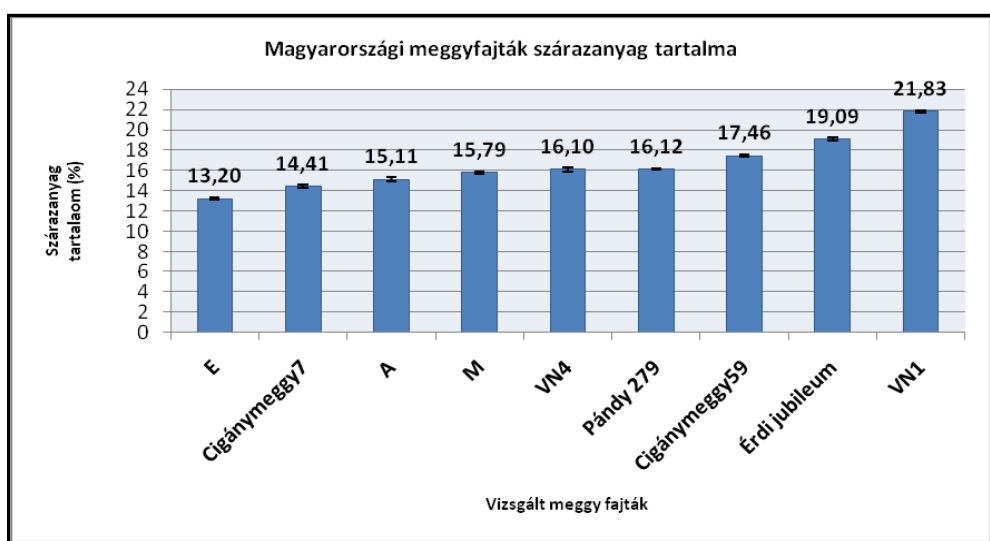
3.1. Szárazanyag tartalom meghatározás

Méréseink során meghatároztuk az egyes meggy minták szárazanyag tartalmát. A kapott eredményt táblázatba foglaltuk össze.

4. táblázat: Vizsgált fajták szárazanyag tartalma

Fajta	Kiindulási tömeg (g)	Extrahált tömeg (mg)	Szárazanyag tartalom (%)
E	108	51,4	13,20± 0,122
Cigánymeggy7	212	227	14,41± 0,161
A	214	114,8	15,11± 0,231
M	152	81,9	15,79± 0,135
VN4	204	69,3	16,10± 0,181
Pándy 279	142	177,1	16,12± 0,070
Cigánymeggy59	200	118	17,46± 0,130
Érdi jubileum	214	81,8	19,09± 0,165
VN1	204	69,3	21,83± 0,131

A mérés során azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált fajták szárazanyag tartalma jelentősen eltér. Magas szárazanyag tartalommal jellemezhető a „VN1” Bosnyák-fajtakörből szelektált, valamint az „Érdi jubileum” fajta. Kisebb szárazanyag tartalommal jellemezhető az Újfehértói fürtösből szelektált fajták, és a „Cigánymeggy7” fajta. A kapott eredményekből az is kiderült, hogy a magas szárazanyag tartalommal rendelkező fajtákból kevesebb mennyiségű kivonatot extraháltunk, míg a kisebb szárazanyag tartalommal rendelkező fajtáknál nagyobb mennyiségű extraktumot állítottunk elő a kloroformos extrakcióval.



4. ábra: Vizsgált fajták szárazanyag tartalma

3.2. Kromatográfiás rendszer:

Kromatográfiás rendszert fejlesztettünk ki a melatonin kvalitatív és kvantitatív meghatározására a magyarországi meggyfajtából. Gondos minta előkészítés után betöményített mintából melyet 1000 µl metanolban oldottunk ezt követően a mintát SIGMA 2-16 SARTORIUS centrifugáltuk 5 percig 10000 rpm-n és a felülúszóból határoztuk meg az egyes meggy minták melatonin koncentrációját. A melatonin azonosításához és mennyiségi meghatározásához standardot használtunk melatonin 99+% (Alfa Aesar, Germany).

A melatonin retenció ideje a fenti kromatográfiás rendszerben 5,49 min.

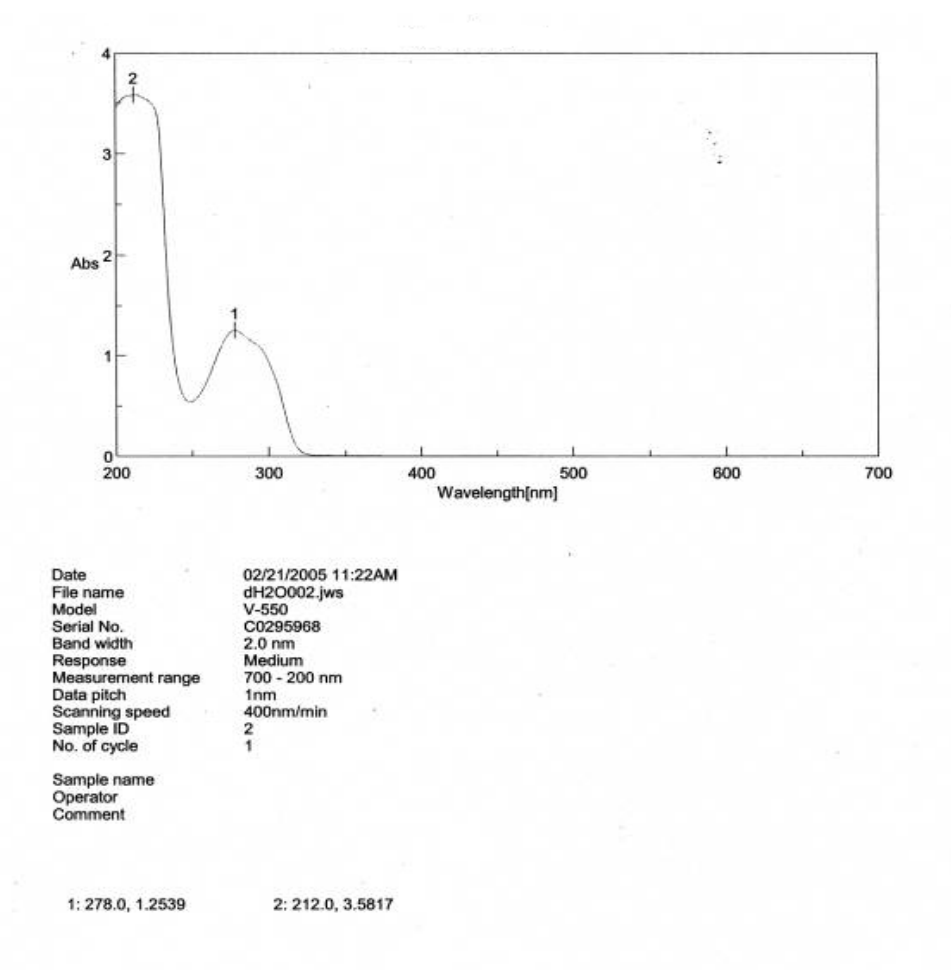
A melatonin pontos koncentrációjának ismeretében ellenőriztük a fejlesztett kromatográfiás rendszer rendszerpontosságát, a módszer ismételhetőségét. Az elvégzett mérések alapján a rendszerpontosság megfelel az irodalmi követelményeknek, az Rsd érték 3% alatti, a detektálási határ 0,001 mg/ml.

5. táblázat: Alkalmazott HPLC rendszer (REITER, et. al. 2005, Remenyik által módosítva 2012).

Melatonin HPLC rendszer	
Álló fázis	100x4,6 mm Chromolit Performance RP-18
Eluens	A pumpa acetonitril: B pumpa pH 4,95 Sörensen puffer
Elució	Isokratikus
Áramlási sebesség	1 ml/min
Injektált térfogat	50 µl
Alkalmazott standard	Melatonin 99+% (Alfa Aesar, Germany)

3.2. A melatonin maximális elnyelésének meghatározása:

Jasco típusú kétsugaras spektrofotométeren 1mg/ml standard oldat teljes elnyelési spektrumát vizsgáltuk 200-700 nm hullámhossz tartományban.



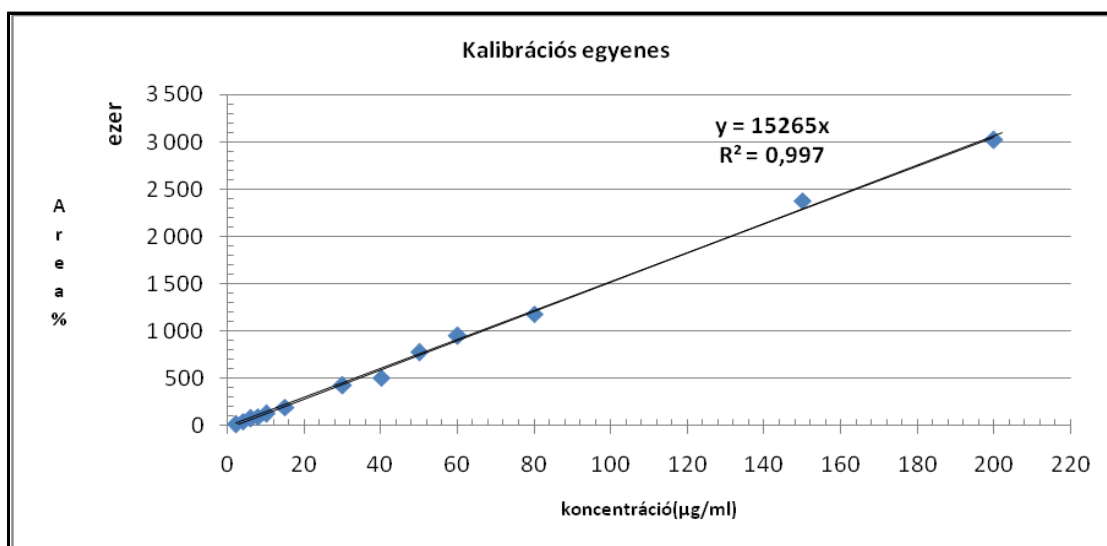
5. ábra: A melatonin elnyelési spektruma

A spektrumból látható, hogy a melatonin az indol váznak köszönhetően UV aktív. Két elnyelési maximummal rendelkezik, amely 210 nm és 275 nm. A detektálást 275 nm-en végeztük.

3.3. Adott koncentrációjú kalibrációs oldat csúcs alatti területeinek meghatározása

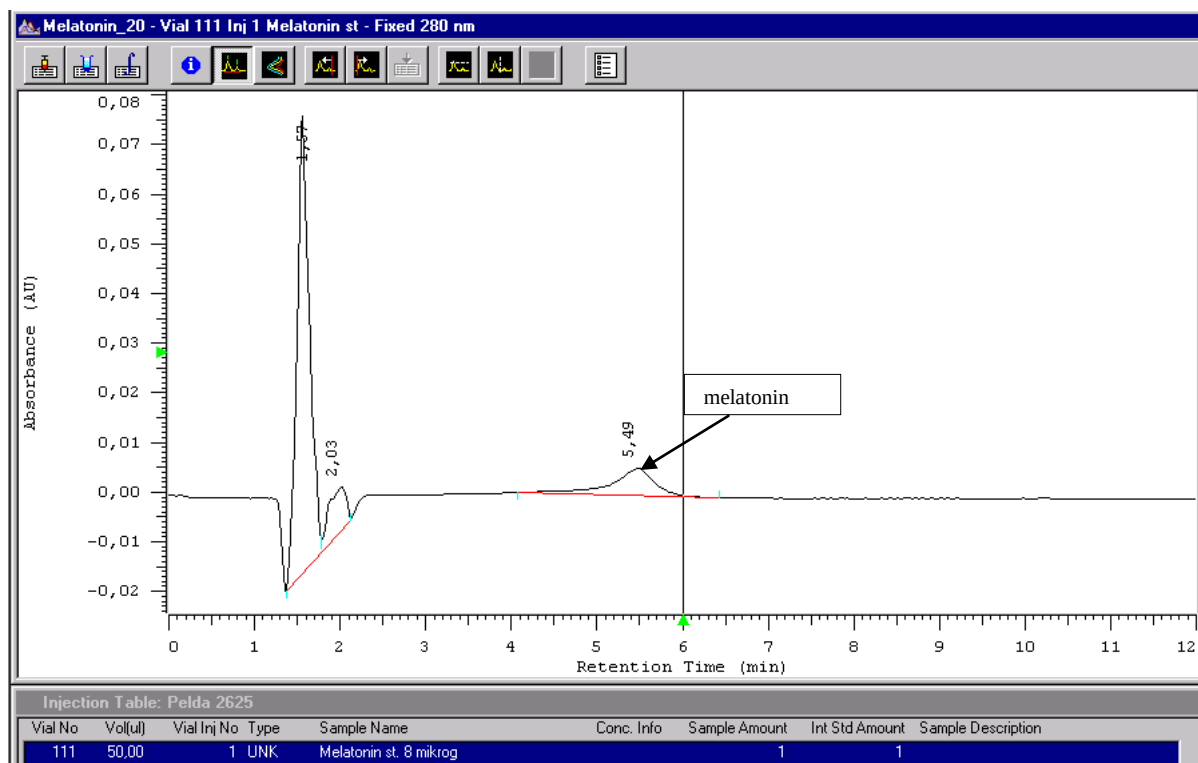
6. táblázat: Koncentrációkhoz tartozó csúcs alatti terület

Koncentráció (µg/ml)	Csúcs alatti terület
2	17867
4	48607
6	75198
8	97959
10	128200
15	194065
30	426237
40	508994
50	773541
60	953499
80	1180572
150	2380268
200	3018246



6. ábra: Kalibrációs egyenes

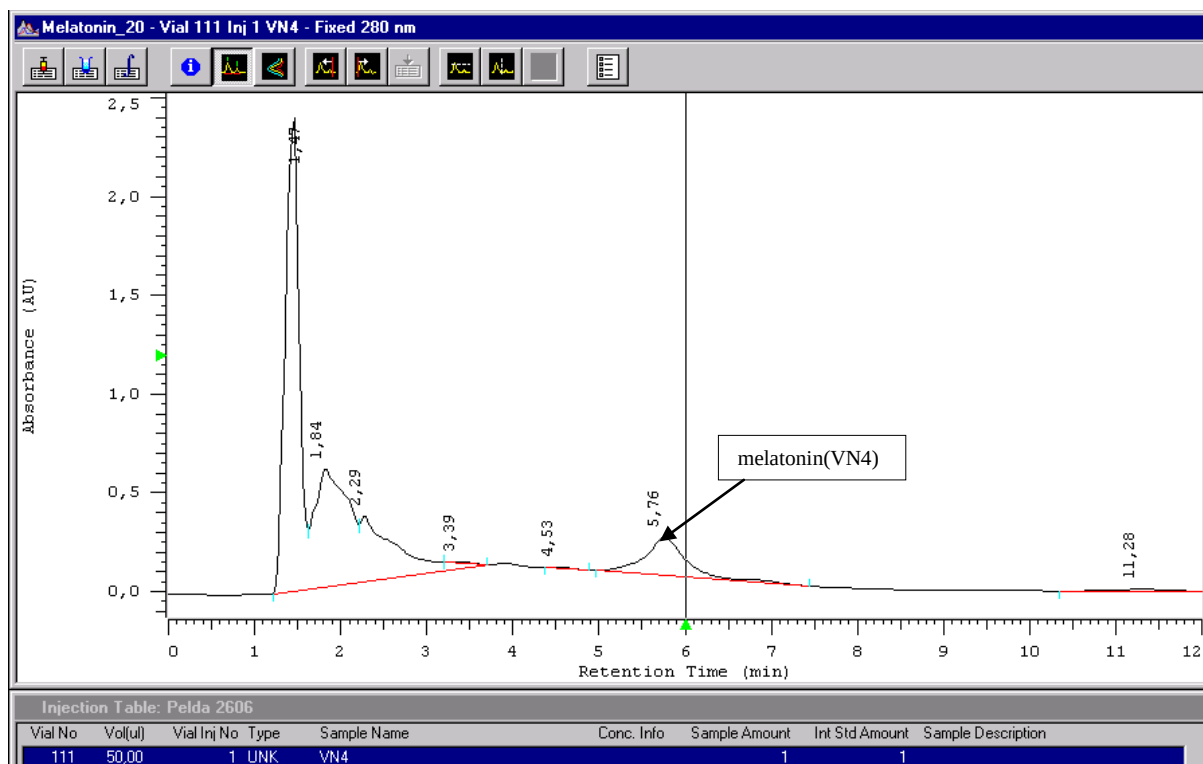
A melatonin retenciós ideje a fenti kromatográfiás rendszerben 5,49 min.



7. ábra: Standard melatonin retenciós ideje

Vizsgáltuk a termesztésben leggyakrabban előforduló meggyfajták melatonin tartalmát. A mennyiségi és minőségi analízist HPLC-s technikával végeztük (9-12. sz. melléklet).

A minőségi azonosítást standard segítségével a mennyiségi meghatározást belső addíciós módszerrel számoltuk ki. A vizsgált meggy gyümölcs melatonin koncentrációját száraz tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

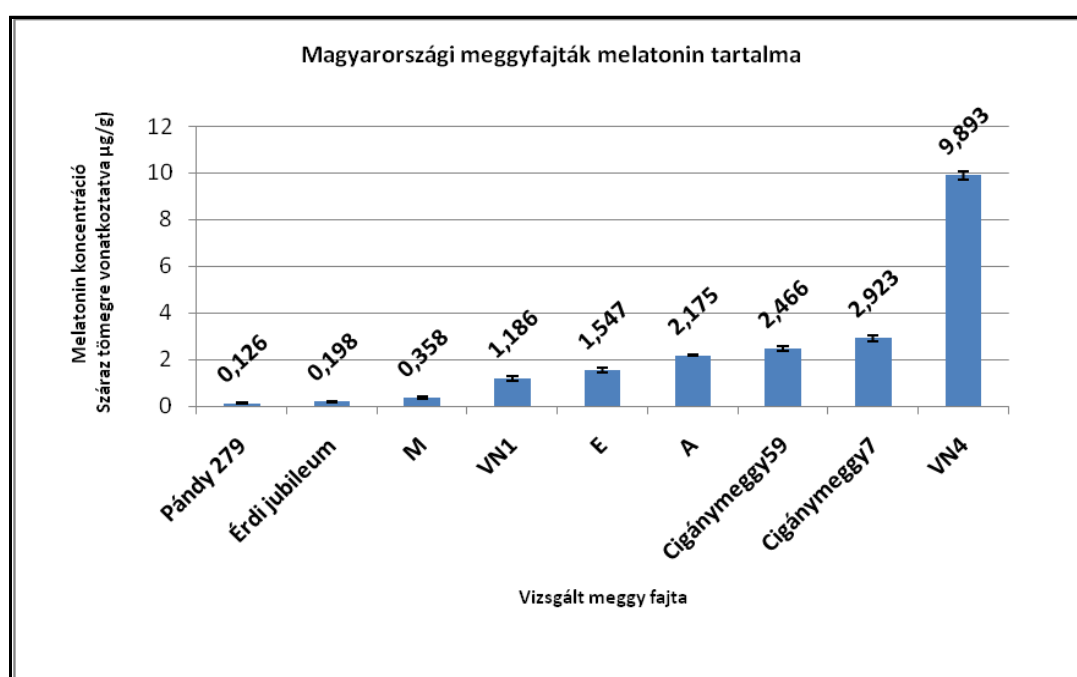


8. ábra: „VN4” meggyfajta kromatogramja

A „Pándy 279”, és az „Érdi jubileum” alacsony melatonin koncentrációval jellemezhető, átlagosan 0,162 $\mu\text{g/g}$ száraz tömegre vonatkoztatva. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a „VN4” meggy minta magas melatonin tartalommal 9,893 $\mu\text{g/g}$ száraz tömegre vonatkoztatott tömeggel rendelkezik. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a Bosnyák fajtakörből szelektált „VN4” fajta melatonin felhalmozó. A „Cigánymeggy” klónoknál, közel azonos mennyiségű melatonin koncentrációt számoltunk, míg az „Újfehértói” tájszelekcióból származó mintákból az „M” fajta szignifikánsan alacsonyabb melatonin tartalommal rendelkezik, mint a másik ugyanazon tájszelekcióból származó variánsok. Az általunk vizsgált magyarországi meggyfajták melatonin tartalmának átlagos értéke 2,319 $\mu\text{g/g}$ száraz tömegre vonatkoztatva.

7.táblázat: Vizsgált fajták melatonin tartalma (µg/g)

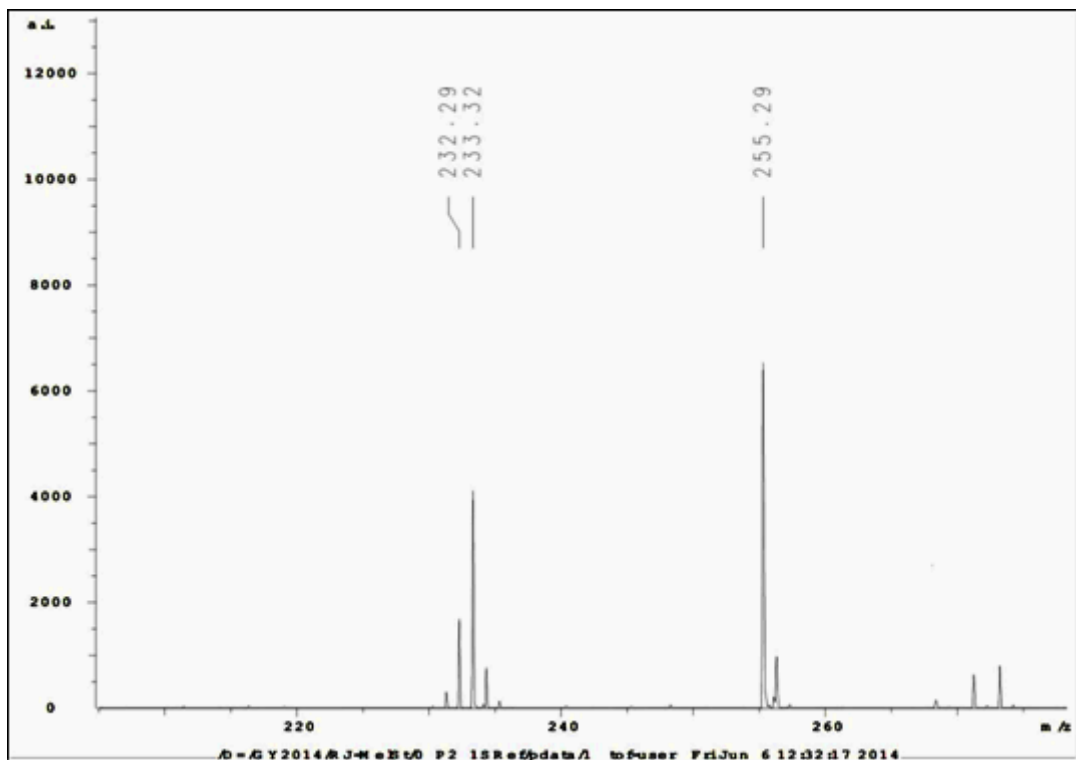
Fajták	Melatonin tartalom száraz tömegre vonatkoztatva (µg/g)
Pándy 279	0,126± 0,014
Érdi jubileum	0,198± 0,015
M	0,358± 0,050
VN1	1,186± 0,090
E	1,547± 0,119
A	2,175± 0,028
Cigánymeggy59	2,466± 0,119
Cigánymeggy7	2,923± 0,133
VN4	9,893± 0,181



9. ábra: Vizsgált fajták melatonin tartalma (µg/g)

Preparatív HPLC-s módszerrel a Bosnyák fajtakörből szelektált „VN4” mintából a nagy intenzitású 5,76 percnél detektálható frakciót izoláltuk.

Az izolált vegyület molekulatömegét MALDI TOF-MS segítségével meghatároztuk.



10. ábra: Az izolált vegyület molekulatömege megegyezik a melatonin molekulatömegével

A spektrumon jól látható a 232,29 g/mol molekulatömegű frakciónk melynek értéke tökéletesen megegyezik az irodalomban szereplő melatonin molekulatömeggel, illetve a $[M+Na]^+$ 255,30 g/mol és kis intenzitással látható $[M+K]^+$ molekulaionok jelei is, 273,214 g/mol ezen kívül egyéb szennyező anyagot nem tartalmaz a spektrum.

Az izolált vegyület szerkezetét NMR mérésekkel igazoltuk. A kapott karakterisztikus értékeket az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

8.táblázat: 1H NMR értékek

Csoport	Kémiai eltolódás (δ ppm)	Csatolási állandó (J, Hz)	Jel alakja
2-CH ₃	1,88		s
OCH ₃	3,88		s
b-CH ₂	2,92	6,5	t
l-CH ₃	3,40	6,5	q
6-H	6,89	8,5	q
4-H	6,92	2	d
7-H	5,7	8,5	d

9.Táblázat: ^{13}C NMR értékek

Csoport	Kémiai eltolódás (δ ppm)
2-CH ₃	23,25
CH ₂	25,47
b-CH ₂	41,51
OCH ₃	57,54
C-3	112,98
C-4a	128,71
C-5	154,16
C-7a	133,047

Mind a proton-, mind a szén¹³ NMR értékek jó egyezést mutatnak az irodalomban meghatározott értékekkel, ami alapján bizonyított, hogy a mért és az izolált vegyület a N-acetil-5-metoxi-triptamin.

4. Következtetések és javaslatok

Megvizsgáltuk a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszékén, az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú KFT.-től származó a termesztésben leggyakrabban előforduló magyarországi meggyfajták biológiailag aktív komponensei közül a melatonin mennyiségét.

- Cigánymeggyekből: „Cigánymeggy59” és a „Cigánymeggy7”.
- Maraszka meggyekből: „VN1” és a „VN4”.
- Üvegmegeggyekből: „Pándy279”, „Érdi jubileum”, „A”, „E”, „M”.

A beltartalmi mutatók közül meghatároztuk a melatonin tartalmat friss mintában. Vizsgálataink során extrakciós eljárást dolgoztunk ki annak érdekében, hogy minél hatékonyabb módon tudjuk kioldani a vizsgálni kívánt vegyületet. Továbbá kromatográfiás eljárást fejlesztettünk ki a melatonin kvantitatív és kvalitatív meghatározására. Preparatív HPLC-s technikával a standarddal egyező vegyületet tisztítottunk az extraktumból a tisztított minta szerkezetét MALDI TOF-MS technikával igazoltuk.

Az Amerikai Egyesült Államokban a meggykutatások a „Montmorency” (*Prunus cerasus*) valamint az 1984 óta honosított termesztésbe vont „Balaton” névre átnevezett „Újfehértói fürtös” fajtára terjedt ki. Texasi kutatók méréseik során a következő eredményeket kapták: „Montmorency” (*Prunus cerasus*) melatonin koncentrációja $2-13,46 \pm 1,10$ ng/g friss tömegre vonatkoztatva. Valamint a „Balaton” melatonin koncentrációja $2,06 \pm 0,07$ ng/g. Mérési eredményeink (a pontos összehasonlítás érdekében ng/g tartományba számoltuk át valamint a száraz tömegre vonatkoztatott értékeket visszaszámoltuk friss tömegre) azt igazolják, hogy a magyarországi meggyfajták kiemelkedően magas melatonin tartalommal bírnak. Az „Újfehértói” tájszelekcióból származó minták melatonin koncentrációját átlagoltuk, melynek értéke: $196,490 \pm 0,495$ ng/g. Méréseink alapján megállapítható, hogy a biológiai érettség állapotában betakarított általunk vizsgált magyarországi meggyfajták kiemelkedően magas melatonin tartalommal jellemezhetőek. Ezen eredményeinkre alapozva, elmondhatjuk, hogy a meggy gyümölcs természetes melatonin forrás lehet. Mindazonáltal alkalmassá válhat arra, hogy melatonin felhalmozó funkcionális élelmiszereket fejlesszünk belőle.

Összefoglalás

A Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszékén, 2003-ban kezdődött el magas endogén antioxidáns kapacitású meggyfajták kutatása.

Megvizsgáltuk az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú KFT.-től származó a termesztésben leggyakrabban előforduló magyarországi meggyfajták biológiailag aktív komponensei közül a melatonin mennyiségét.

Kísérleti munkánk során extrakciós eljárást dolgoztunk ki a melatonin hatékony kioldása érdekében. Továbbá kromatográfiás eljárást fejlesztettünk ki a melatonin kvantitatív és kvalitatív meghatározására. Preparatív HPLC-s technikával a standarddal egyező vegyületet tisztítottunk az extraktumból és a tisztított minta szerkezetét MALDI TOF-MS technikával igazoltuk.

Méréseink alapján megállapítható, hogy a biológiai érettség állapotában betakarított magyarországi meggyfajták nagy mennyiségű melatonint tartalmaznak.

Vizsgálataink alapján elmondható, hogy a „VN4” fajta kiemelkedően magas melatonin tartalommal 9,893 µg/g rendelkezik. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a „Bosnyák” fajtakörből szelektált „VN4” fajta melatonin felhalmozó. Az általunk vizsgált magyarországi meggyfajták melatonin tartalmának átlagos értéke 2,319 µg/g.

Ezen eredményeinkre alapozva, elmondhatjuk, hogy a korábbi irodalmi adatokhoz képest egy sokkal hatékonyabb extrakciós eljárást fejlesztettünk ki melatonin meghatározására a gyümölcshúsból. A szakirodalmak melatonin detektálására alkalmas különböző módszerekről számoltak be úgy, mint: szilárd fázisú extrakció (SPE), enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA) és nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC). A vizsgálati mintát előkészítettük, szilárd fázisú extrakcióval HPLC-s mérésre és azt tapasztaltuk, hogy a meggy mintában nem volt detektálható mennyiségű melatonin. Ennek oka lehet, hogy az alkalmazott SPE oszlop 1 ml extraktum elválasztására képes. Az 1 ml extraktum nem tartalmaz diódasoros detektorral rendelkező HPLC számára detektálható mennyiségű melatonint. Ilyen kis mennyiségben előforduló molekula kinyeréséhez precíz macerációs eljárás kidolgozására van szükség, mert a vizsgált molekula a növényi sejtekben illetve sejtalkotókban fordul elő. Továbbá a meggy bizonyos komponensei például fruktóz és szacharóz valamint az egyéb fenolos komponensek miatt a melatonin nem tud megkötődni a SPE oszlopon, így a vizsgálni

kívánt molekula elvész a mintából. Természetesen ez nem azt jelenti, hogy a fent említett kivonási eljárás nem megfelelő, de ebben az esetben a melatonin detektáláshoz nagy érzékenységű műszeres analitikai módszerre van szükség például fluorescens detektorral rendelkező HPLC-re. Mérési eredményekből később kiderült, hogy kb.: 200g friss meggy mintából kiindulva az általunk módosított kloroformos extrakciós eljárással 0,126 µg/g melatonin koncentrációt már nagy biztonsággal tudtunk detektálni a diódasoros HPLC-vel. Hatékony kromatográfiás eljárást fejlesztettünk ki a melatonin minőségi és mennyiségi elemzésére. A kromatogramon látható, hogy a melatonin jól elválasztható az egyéb komponensektől. Fontos megemlíteni hazánk földrajzi, éghajlati adottságait és az évtizedes hazai nemesítő munkát melynek köszönhetően kimagasló beltartalmi paraméterekkel rendelkező fajták jöttek létre. Ezen eredmények igazolják, hogy a magyar meggy természetes melatonin forrás lehet. Mindemellett alkalmassá válhat arra, hogy melatonin felhalmozó funkcionális élelmiszereket fejlesszünk belőle (13. sz. melléklet).

Irodalom jegyzék

ACUNA -CASTROVIEJO D. - LOPEZ LC. - ESCAMES G. et al.: 2011. Melatonin-mitochondria Interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem*, 11:221–240p.

APOSTOL J. : 2003. Cseresznye- és meggynevelés, a fontosabb fajták leírása. Cseresznye és meggy, szerkesztette: Hrotkó Károly Budapest. Mezőgazda Kiadó 37-96 p.

BALZER I,- HARDELAND R: 1996. Melatonin in algae and higher plants: possible new roles as a phytohormone and antioxidant. *Bot Acta*, 109: 180-183p.

BARCZA L.- BUVÁRI Á.: 2008. A minőségi kémiai analízis alapja. Budapest. Medicina Könyvkiadó, 488-493 p.

BLASK DE. - SAUER LA. - DAUCHY RT.: 2002. Melatonin as a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2: 113–132p.

BLASK DE. - HILL SM. - DAUCHY RT et al. : 2011. Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res*, 51:259–269p.

BOROSS L. - SAJGÓ M. 2003. A biokémia alapjai. Budapest. Mezőgazda Kiadó, 109-124 p.

BRAINARD GC. - HANIFEN JP. - ROLLOG MD et al.: 2001. Human melatonin regulation is not mediated by the three cone photopic visual system. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 433–436p.

BURKHARET S. - TAN D. X. REITER R. J. : 2001. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). *Food Chemistry* 2001 Oct; 49(10):4898-902p.

CANTOS, E. - GARCIA-VIGUERA C. - DE PASCUAL-TERESA S. - TOMAS-BARBERAN F. A.: 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4606–4612p.

CHEN G. – HUO Y. – TAN D.X. – LIANG Z. – ZHANG W. – ZHANG Y.: 2003. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sciences* 73 (2003) 19–2p.

CLAUSTRAT B. - BRUN J. - CHAZOT G.: 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews* 9:11-24p.

DOPFEL P. - SCHULMEISTER K. - SCHERNHAMMER E. S: 2007. Nutritional and lifestyle correlates of the cancer-protective hormone melatonin. *Cancer Detection and Prevention* 31: 140-148p.

DUBOCOVICH ML. - MANSANA MI. - BENLOUCIF S.: 1999. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 460: 181–190p.

Elválasztástechnika Laboratóriumi Gyakorlat jegyzet

CONTI, A. - TETTAMANDI C. - SINGARAVEL M. - HALDAR C. - PANDI-PERUMAL R.S. - MAESTRONI G.J.M.: 2002. Melatonin: an ubiquitous and evolutionary hormone. In: Haldar, C., Singaravel, M., Maitra, S. K. (Eds.), *Treatise on Pineal Gland and Melatonin*. Science Publishers, Enfield, USA, pp. 105–143p.

EKMEKCIOGLU. C.: 2006. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance *Biomedicine&Pharmacotherapy*; 60:97-108p.

FALUBA, Z. - HARSÁNYI, Z. - BÖDECS, L. - TOMCSÁNYI, P.: 1982. Gyümölcsfajtákról Csonthéjasok és héjasgyümölcsűek. Budapest. Mezőgazdasági Kiadó, 88p.

FONYÓ A. - LIGETI E. 2007. Az orvosi élettan tankönyve. Bp. Medicina Könyvkiadó Zrt.1147p.

GARCIA-PARRILLA M. C. - CANTOS E. - TROCOSO A. M. 2009. Analisis of melatonin in foods 22: 177-183p.

GUERRERO JM - REITER R. J.: 2002 Melatonin–immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*; 2: 167–180p.

Gyógyszer Kompendium 2005 Az Országos Gyógyszerészeti Intézet Hivatalos Kiadványa 1598 p.

HARDELAND R. - MADRID JA. - TAN DX et al.: 2012. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*; 52:139–166p.

HERNANDEZ-RUIZ J. - CANO A. 2004. Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta* 220:140-144p

- HERNANDEZ-RUIZ J. - ARNAO M.: 2008. Melatonin stimulates the expansion of etiolated lupin cotyledons. *Plant Growth Regulation* 55 (1), 29–34.
- HÜSE CS.: 2005. Analitikai módszer validálása. TEVA Gyógyszergyár Rt. Gyógyszer Kémiai Ellenőrzési Osztály HPLC-s Laboratórium,.5-10p.
- LERNER AB. - CASE JD. - TAKAHASHI Y et al.: 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*; 80: 2587p.
- LERNER AB. - CASE JD. - HEINZELMANN R V.: 1959. Structure of melatonin. *Journal of the American Chemical Society*; 81: 6084–6085.
- MACCHI M. M. - JEFFREY N. B.: 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin *Frontiers in Neuroendocrinology* 25:177-195p.
- MALPAUX B. - MIGAUD M. - TRICOIRE H. - CHEMINEAU P.: 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms* ; 16: 336–347p.
- MANCHESTER L. C. - POEGGELE B. - ALVARES F L. - OGDEN G. B. - REITER R J.: 1995. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic procaryote *Rhodospirillum rubrum*: Implications for an ancient antioxidant system. *Cellar and Molecular Biology Research* 41:321-5p.
- MANCHESTER L. C. - TAN D-X. - REITER R. J. - PARK W. - MONIS K. - QI W.:2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants Possible Function in germ tissue protection, *Life Sciences*. 67:3023-3029p.
- MASATERU O.-HIROSHI E: 2009. Profiling of melatonin in the model tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Journal of Pineal Research*. Apr2009, Vol. 46 Issue 3, p338-343. 6p.
- MIGLIORI ML. - ROMANOWSKI A. - SIMONETTA SH et al.: 2012. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Pineal Res*; 53:38–46p.
- MOTILVA V. - GARCIA-MAURINO S. - TALERO E et al.: 2011. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res*; 51:44–60p.
- PAPE, C., LUENING, K., 2006. Quantification of melatonin in phototrophic organisms. *Journal of Pineal Research* 41, 157–165p.

- PARK S. - LEE DE. - JANG H et al.: 2013. Melatonin-rich transgenic rice plants exhibit resistance to herbicide-induced oxidative stress. *J Pineal Res* 2013 doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01029.x. [Epub ahead of print].
- POEGGELER B. - HARDELAND R.: 1994. Detection and quantification of melatonin in a dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non-vertebrate material. *J Pineal Res*; 1 7: 1 -10p.
- RÁCZ I. - SELMECZI B.:1991. *Gyógyszertechnológia* 3. Budapest. Medicina Kiadó 417-426p.
- REITER RJ. et. al.: 1993. The mammalian pineal gland as an end organ of the visual system. In Wettenberg L (ed.) *Light and Biological Rhythms in Man*. Oxford: Pergamon Press,145–150p.
- REITER RJ.: 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*; 49: 654–664p.
- REITER RJ. - AN DX. - BURKHARDT S. - MANCHESTER L C.: 2001. Melatonin in Plants Special Article 286-290 p.
- REITER RJ. - TAN DX. - SAINZ RM et al.: 2002. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 54: 1299–1321p.
- REITER RJ. - MANCHESTER L. C. - TAN D.X.: 2005. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition* 21, 920-924p.
- REITER RJ. - TAN DX. - TERRON M. P. - FLORES L J. - CZARNOCKI Z.: 2007. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions, Vol. 54 No. 1/2007, 1-9p.
- ROGGERO J.P. - GARCIA-PARRILLA C.: 1995. Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivatives in the skins of ripening grapes. *Sciences des Aliments* 15, 411–422p.
- SALISBURY FR. - ROSS CW.: 1992. *Plant physiology*, 4th edn. Wadsworth, Belmont
- STEHLE JH. - SAADE A. - RAWASHDEH O et al.: 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res*; 51:17–43p.
- SONG N. - KIM AJ. - KIM HJ et al.: 2012. Melatonin suppresses doxorubicin-induced premature senescence of A549 lung cancer cells by ameliorating mitochondrial dysfunction. *J*

Pineal Res; 53:335–343p.

STÜRTZ M. - CEREZO A.B. - CANTOS-VILLAR E. - GARCIA-PARRILLA M.C.: 2011. Determination of the melatonin content of different varieties of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and strawberries (*Fragariaananassa*). Food Chemistry, Volume 127, Issue 3, 1 August 2011, 1329–1334p.

SZENTÁGOTHAJ J., RÉTHELYI M.: 1997. Funkcionális anatómia II. Semmelweis Kiadó, Budapest 1136 p.

TAN D.X. - CHEN L.D. - POEGGELER B. - MANCHESTER L.C. - REITER, R. J., 1993. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocrine Journal 1, 57–60p

TAN DX. - REITER RJ. - MANCHESTER LC. et al.: 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. Current Topics in Medicinal Chemistry; 2: 181–198p.

TAN D.X. - MANCHESTER L.C. - TERRON M.P. - FLORES, L.J. - REITER, R. J.: 2007a. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and reactive nitrogen species? Journal of Pineal Research 42, 28–42p.

TAN D.X. - MANCHESTER L.C. - DI MASCIO P., et al.: 2007b. Novel rhythms of N-1-acetyl- N-2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. FASEB Journal 21 (8), 1724p.

TAN D.X. - MANCHESTER L.C. - HELTON, P. - REITER R. J., 2007c. Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. Plant Signal Behaviour 2, 514–516p

TAN DX. - HARDELAND R. - MANCHESTER LC. et al.: 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. Biol Rev Camb Philos Soc, 85:607–623p.

TAN DX. - HARDELAND R. - MANCHESTER LC et al.: 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. J Exp Bot; 63:577–597p.

TAN D.X. - MANCHESTER L.C. – LIU X., ROSALES-CORRAL S. A. - ACUNA-CASTROVIEJO D- REITER RJ.: 2013.. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes 2013 Journal of Pineal Research 54:127–138p.

TANAKA, K. - Waiki, H. - Ido, Y. - Akita, S. - Yoshida, Y. – Yoshida: 1998. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 151-153p.

OZTURK G. - AKBULUT KG. - GUNEY S et al.: 2012. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. Exp Gerontol; 47:706–711p.

VERES ZS.– FÁRI M. G. :, Antioxidánsok a mezőgazdaságban

WANG P. - YIN L. - LIANG D et al.: 2012. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. J Pineal Res; 53:11–20p.

YU HS. - REITER R. J.: 1993. Melatonin: biosynthesis, physiological effects and clinical applications. CRC Press, Boca Raton

ZHANG N. - ZHAO B. - ZHANG HJ et al.: 2013. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). J Pineal Res 2013. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01015.x. [Epub ahead of print].

ZUROWSKI D. - NOWAK L. - MACHOWSKA A.- WORDLICZEK J.- THOR P.J. (2012): Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. the role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. Journal of Physiology and Pharmacology. 63.6:641-647.

Internetes források

I₁ : In : <http://www.matud.iif.hu/2013/01/11.htm> 2014.10.19

I₂: In :SOLTÉSZ, M.: 2005. Integrált gyümölcstermesztés. Elektronikus Felsőoktatási Tankönyv és Szakkönyvtár.

<http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/integralt/adatok.html> 2014.10.20.

I₃:In <http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch07s03.html> 2014-10-06

I₄: In KEMPELEN FARKAS digitális könyvtár (2014.)

<http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/genetikai-variabilitas/ch09s03.html> (2014.10.19.)

I₅ : In : Astrology-Research.Net, 2007.

<http://www.astrology-research.net/researchlibrary/Iatr/pineal.htm> 2014.10.20.

NYILATKOZAT

Asbóth Georgina, büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a TDK dolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, az irodalmi források korrekt kezelésének módját a szabályzatból megismertem, a DK dolgozatra vonatkozó jogszabályokat betartottam. Tudomásul veszem, hogy ezen követelmények megszegése esetén a dolgozatom visszautasításra kerül.

aláírás

Születési idő:.....

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Remenyik Judit tanárnőnek, témavezetőmnek, aki lehetővé tette, hogy dolgozatomat a Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Könyezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet Takarmány- és Élelmiszer Biotechnológiai Tanszéken írhasam. Hálával tartozom, mert lehetőségem volt megtanulni a pontos és precíz minta előkészítést, gyógyszer technológiai eljárást az áztatás folyamatát, valamint, hogy módomban állt megérteni és megtanulni a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia alapjait. Köszönöm a dolgozatomra szánt idejét és építő jelegű kritikáit. Köszönöm segítőkész támogatását, valamint dolgozatom alapos és kritikus javítását. Szakértelme, elhivatottsága és precizitása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom Homoki Judit Ritának, társ témavezetőmnek, aki szaktudásával segítette munkámat. Köszönöm a válaszokat kérdéseimre, az alaposságot, hogy mindennek utánanézett, az egyértelmű iránymutatásokat, dolgozatom alapos és kritikus átolvasását, javítását. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom neki a jó hangulatért, ami jellemző volt a közös munka során. Tudása, segítsége és bátorítása nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom a Szervetlen – és Analitikai Kémiai Tanszéken Dr. Gyémánt Gyöngyi tanárnőnek, aki kérésünkre megmérte a preparatív HPLC során elválasztott frakció molekulatömegét, és ez által identifikált a melatonin molekulát MALDI TOF-MS készülékkel. Hálával tartozom segítségéért.

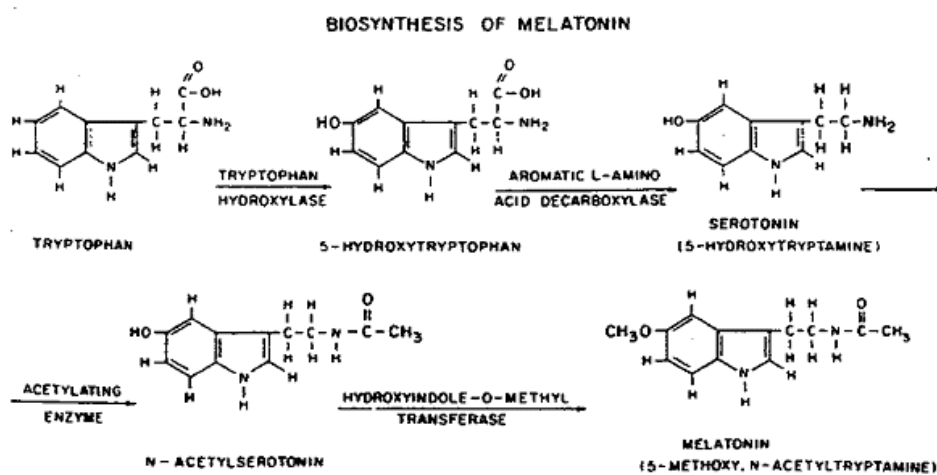
Köszönettel tartozom Dr. Bajza István tanár úrnak, hogy az izolált vegyület szerkezetét igazolta NMR analízissel.

Köszönettel tartozom Bíróné Molnár Piroskának az önzetlen segítségért, amivel hozzájárult a minták előkészítéséhez és a mérések sikeres lebonyolításához. Hálás vagyok, hogy segített eligazodni egy kutató laboratóriumban, megismertette velem a mérési eszközöket.

Hálás vagyok a laborban dolgozó valamennyi PhD hallgatónak, akikhez mindig bizalommal fordulhattam.

Mellékletek

1. számú melléklet: A melatonin bioszintézise

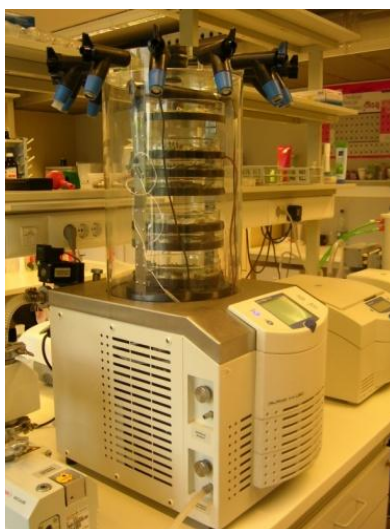


Forrás: I₅

2. számú melléklet: Szárazanyag tartalom meghatározására előkészített minták



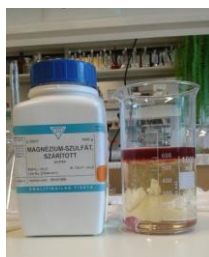
3. számú melléklet: Liofilizáló berendezés



4. számú melléklet: Extrakció fénytől elzárt környezetben



5. számú melléklet: Szerves fázis elválasztása rázótolcsérrel



6. számú melléklet: Az extrahált mintákat szárazra pároltuk



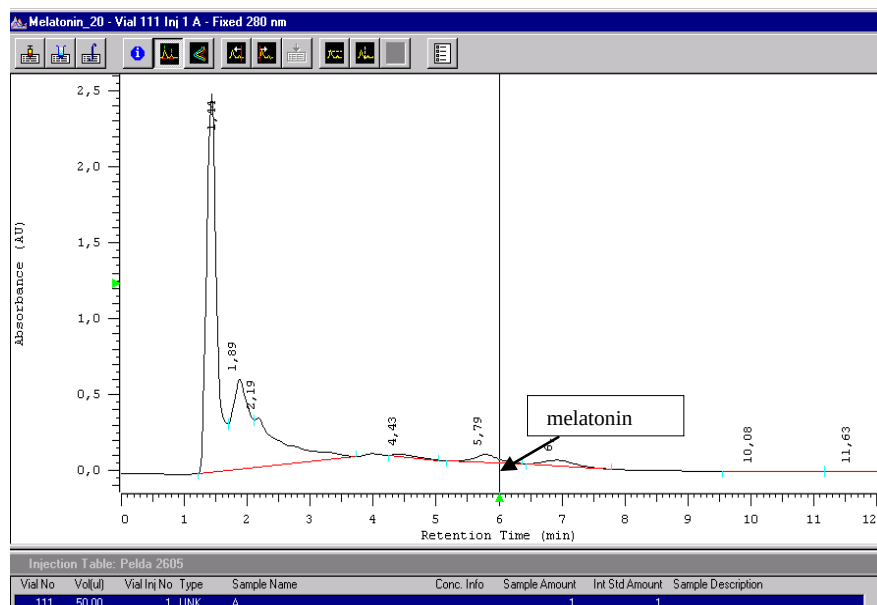
7. számú melléklet: HPLC mérésre előkészített minták



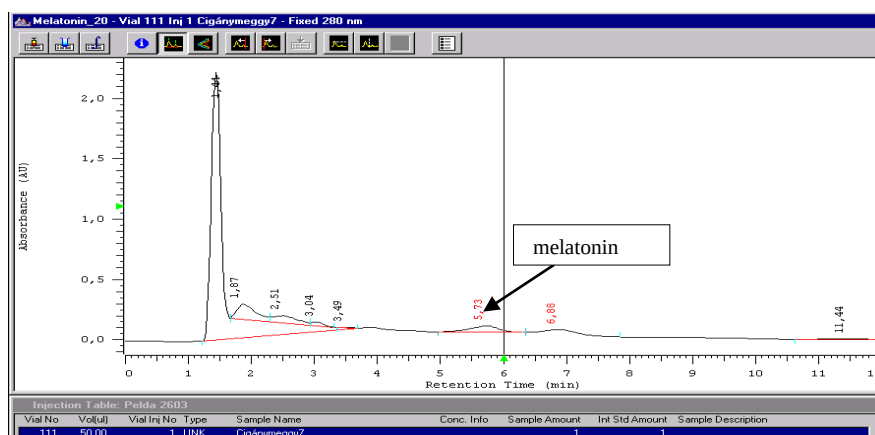
8. számú melléklet: Nagynyomású folyadékkromatográf (HPLC)



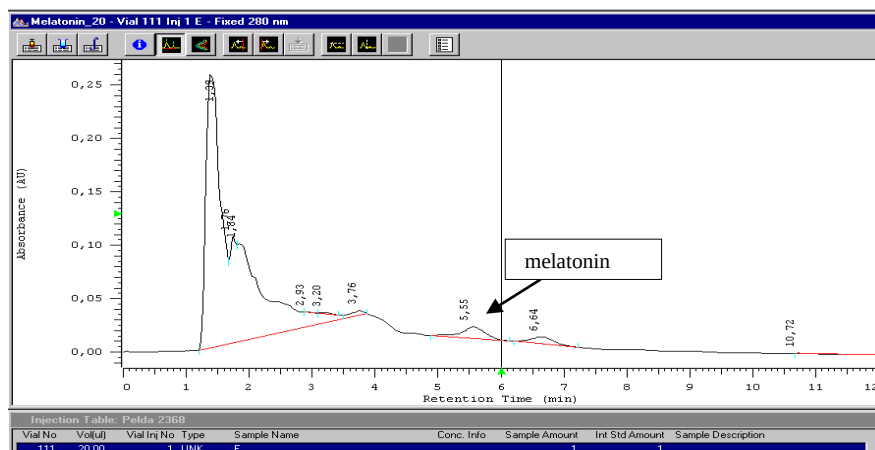
9. számú melléklet: Az „A” minta kromatogramja



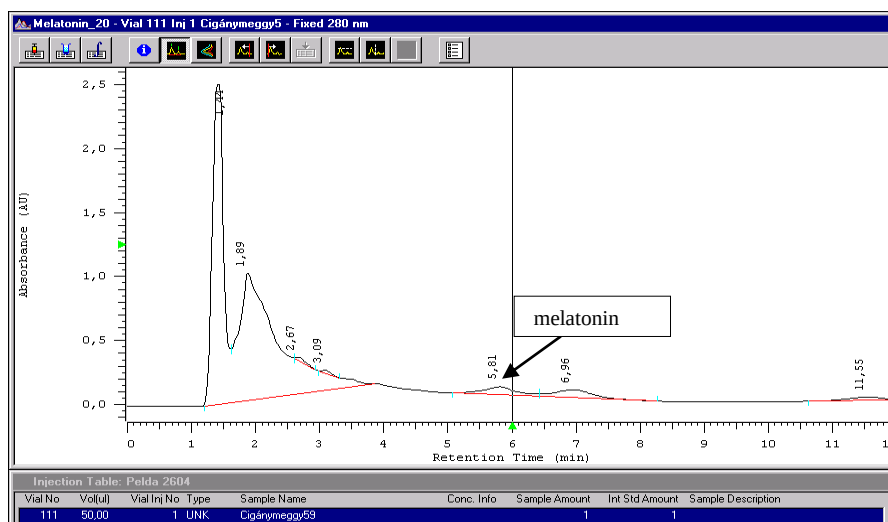
10. számú melléklet A „Cigánymeggy7” kromatogramja



11. számú melléklet Az „E” minta kromatogramja



12. számú melléklet: A „Cigánymeggy59” minta kromatogramja



13. számú melléklet: Meggy pempő

