

RÉSZLETES SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Az egészséges emberi táplálkozásban számos különböző, antioxidáns aktivitással rendelkező vegyület szerepel, melyek közül a legjelentősebbek az aszkorbinsav (C-vitamin), a tokoferolok (E vitamin), a flavanoidok és a karotinoidok. A karotinoidok jól ismert antioxidáns hatásán kívül antikarcinogén hatásuk (pl. likopin), kardiovaszkuláris betegségeknél tapasztalt védőhatásuk (pl. astaxantin) és az időskori macula degeneráció gyógyításában kifejtett hatásuk (pl. lutein, zeaxanthin) került a figyelem előterébe az utóbbi években.

Napjainkban a β -karotinon kívül már több mint 700 karotinoidot izoláltak természetes forrásból. A legfőbb források a sárgarépa (α - és β -karotin), paradicsom (likopin), citrom, narancs (β -kriptoxantin), spenót (lutein) és kukorica (zeaxantin). A táplálékkal felvett karotinoidoknak az emberi szervezetben történő felszívódását, átalakulásait, a karotinoidok antioxidáns szerepét, a vérérum karotin tartalmának diagnosztikus jellemzőit régóta vizsgálják a különböző szakterületek kutatói. Azonban csak az utóbbi években kezdtek figyelmet fordítani arra, hogy a különböző élelmiszerekben a feldolgozás - tartósítás, hőkezelés, tárolás stb. - során a karotinoidok szerkezeti változásokat is szenvedhetnek és megjelenhetnek olyan műtermékek is kisebb-nagyobb mennyiségben, melyek a friss gyümölcsben, vagy zöldségfélékben nem találhatók meg.

Munkánk célja tehát alapvetően az egészséges étrendben Magyarországon gyakran használt zöldségfélékben valamint gyümölcsökben a feldolgozás (főzés, blansírozás, konzerválás), tárolás (mélyhűtés) során fellépő, a karotinoid összetételben bekövetkező változások nyomon követése, a tárolás, feldolgozás során esetlegesen képződő új vegyületek kimutatása, izolálása és szerkezetazonosítása volt.

Alkalmazott módszerek

Analízis: A vizsgált mintákat metanollal majd éterrel extraháltuk, az extraktumot heterogén fázisban elszappanosítottuk, az össz-karotinoid tartalmat spektrofotometrián, a karotinoid-összetételt HPLC módszerrel határoztuk meg. A csúcsok azonosítása autentikus minták, retenciós idő és a csúcsok UV-VIS (HPLC-DAD), esetenként tömeg spektruma (HPLC-MS) segítségével történt.

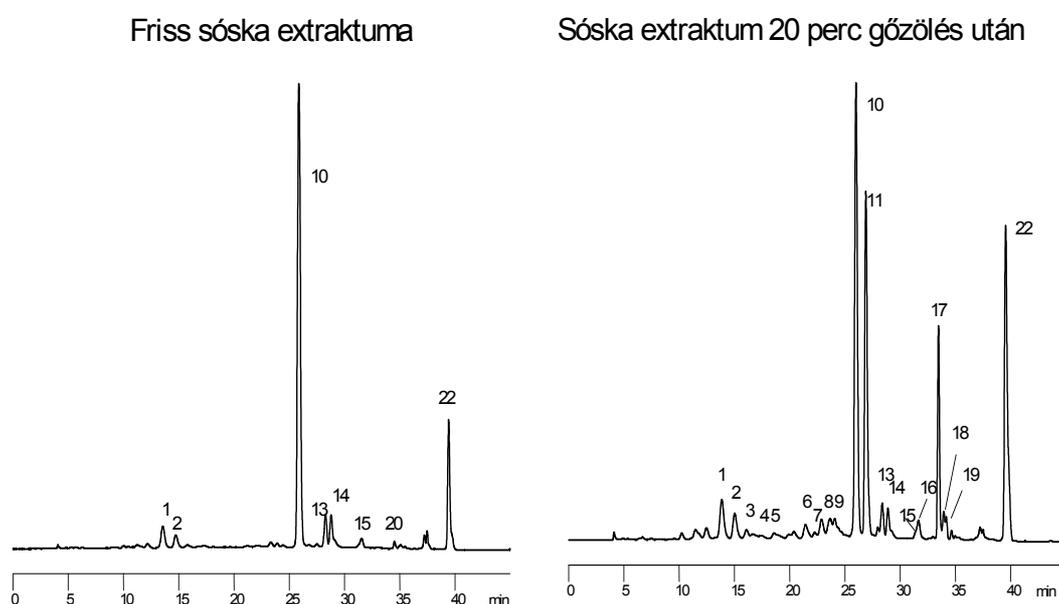
Izolálás, szerkezetazonosítás: A karotinoidokat klasszikus oszlopkromatográfiás módszerrel izoláltuk, a szerkezet meghatározást UV-VIS, CD, ¹H- és ¹³C-NMR spektroszkópiás és tömegspektrometriás mérésekkel végeztük el.

EREDMÉNYEK

Zöldségfélék és gyümölcsök analízise

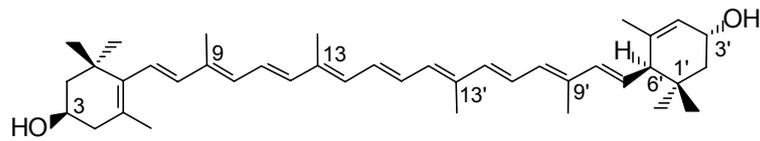
A következő friss és főzött zöldségfélék részletes karotinoid analízisét végeztük el: spenót (*Spinacea oleracea* L.), mangold (*Beta vulgaris* susp. *vulgaris*), sóska (*Rumex rugosus* Campd), zöldborsó, (*Pisum sativum*, L.), zöldbab (zöld és sárga hüvelyű variáns) (*Phaseolus vulgaris* L.), kukorica (*Zea mays* L.), kelbimbó (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), brokkoli (*Brassica oleracea* L. convar. *Botrytis*) és kelkáposzta (*Brassica oleracea* var. *Acephala*), valamint a különböző színű (piros, sárga, zöld) ún. Kaliforniai paprika (*Capsicum annuum* var. *grossum*). A zöldborsó, zöldbab, kelbimbó és kukorica esetén mélyhűtött termékeket is, a spenót és sóska esetén mélyhűtött félkész termékeket (Arvit, Iglo) is vizsgáltunk. Vizsgálatainknál hat különböző főzési módszert alkalmaztunk: párolás 10 perc, blansírozás 5 perc, gőzölés 20 perc, mikrohullámban főzés 5 perc, főzés 10 perc, főzés 20 perc. A zöld növények fő komponense minden esetben lutein és β -karotin, kis mennyiségben neoxantin, violaxantin, anteraxantin, mutatoxantin epimerek, illetve a lutein Z-izomerjei találhatóak meg. A sárga hüvelyű zöldbabban nagy mennyiségben található 5,6-epoxidok (violaxantin, lutein-epoxid ill. ezek furanoidjai) a sárga paprikában zeaxantin és lutein mellett ugyancsak 5,6-epoxidok és ezek furanoidjai (violaxantin, anteraxantin, mutatoxantin), míg a piros paprikában zeaxantin, kapszantin, cucurbitaxantin A található a β -karotinon kívül fő komponensként. A mélyhűtött termékek esetén – 6 hónapos tárolási periódust vizsgálva – nem találtunk jelentős változást a karotinoid-összetételben a friss növényhez képest. Az alkalmazott különböző hőkezelési eljárások során - a sóska valamint a zöld és sárga színű paprika kivételével – csak a Z-izomerek mennyiségének növekedését, illetve a karotinoid-5,6-epoxidok arányának csökkenését figyeltük meg. Az első eset nyilvánvalóan a termikus izomerizáció következménye. A hőre érzékeny karotinoid 5,6-epoxidok pedig vagy degradálódnak vagy 5,8-epoxidokká (furanoidokká) alakulnak át a főzés során.

A magas oxálsav tartalmú friss sóska és a mélyhűtött sóska készítményekben a lutein 3'-epiluteinné illetve anhidrolutein I-é és anhidrolutein II-é történő átalakulását figyeltük meg a különböző főzési eljárások során. Legnagyobb mértékben a gőzölés során keletkezett a 3'-epilutein (9-17%) és az anhidrolutein I (4-5%), így megvizsgáltuk a lutein, a 3'-epilutein és az anhidrolutein I és II mennyiségének a változását a gőzölés idejének növelésével (Gubicsko-Kisbenedek, A., Bonyár, K., Deli, J.: Investigation of the carotenoid composition in fresh and processed green leafy vegetables: spinach, mangel and sorrel; *Eur. Food Res. Techn.* (előkészületben)).

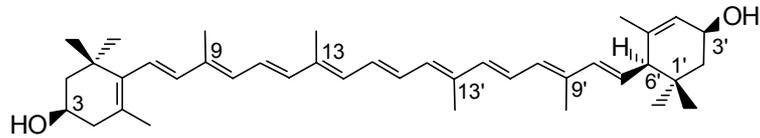


1.ábra: Friss sóska extraktum és 20 perc gőzölés utáni extraktum kromatogramja **1:** neokróm I; **2:** neokróm II; **6:** auroxantin; **8:** mutatoxantin; **9:** mutatoxantin; **10:** lutein; **11:** 3'-epilutein; **13:** (9/9'Z)-lutein; **14:** (13/13'Z)-lutein; **15:** anhidrolutein II; **17:** anhidrolutein I; **22:** β -karotin

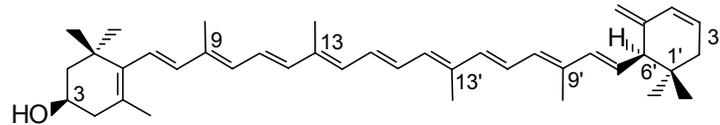
A keletkezett vegyületeket izoláltuk, szerkezetüket UV-VIS, CD, $^1\text{H-NMR}$ és tömegspektrumuk alapján igazoltuk (lásd később). Kismennyiségű anhidrolutein II képződését is megfigyeltük, melynek jelenlétét autentikus mintával történő együtt kromatografálással valamint MS detektálással igazoltuk először, majd a későbbiekben sikerült kristályos állapotban is izolálni.



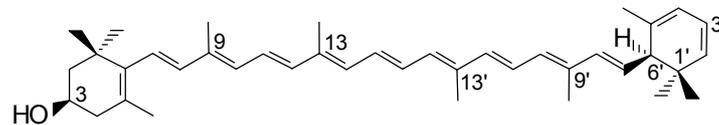
Lutein



3'-Epilutein



Anhidrolutein I



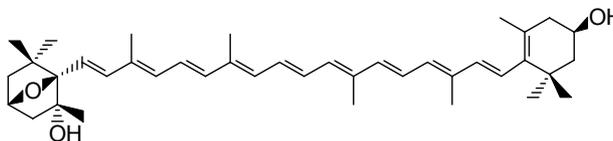
Anhidrolutein II

Kaliforniai paprika (*Capsicum annuum* var. *grossum*) vizsgálata során a zöld és sárga paprika főzésekor illetve savanyításakor is 3'-epilutein és anhidrolutein I képződését figyeltük meg. Ugyancsak e vegyületeket mutattuk ki az ecetes kapor és ecetes pfefferoni paprikában (konzervipari termék) is, és igazoltuk, hogy a friss növényben nem található meg (Molnár, P., Oláh, P., Deli, J.: Investigation of the carotenoid composition in processed paprika (*Capsicum annuum*); *J. Agric. Food. Chem.* (előkészületben).

Konzerv szilva, illetve feketeszeder befőtt valamint feketeszeder lekvár esetén is az említett vegyületeket tudtuk kimutatni, miközben a friss gyümölcsben ugyancsak nem található meg.

A lutein átalakulása (epimerizáció és dehidratáció) nyilvánvalóan a növényi savak, illetve a savas közeg hatására bekövetkező folyamat, melyre a következő ábrán bemutatott mechanizmust javasoljuk:

képződését itt nem tudtuk kimutatni. Sikerült azonban kristályos állapotban cucurbitaxantin A-t izolálnunk, amit eddig csak piros paprikában tudtunk kimutatni. Az izolált vegyület szerkezetét ^1H NMR, CD és tömeg spektruma alapján azonosítottuk.



Cucurbitaxantin A

Megvizsgáltuk a különböző friss, mélyhűtött és szárított fűszernövények (zeller (*Apium graveolens* L.), petrezselyem (*Petroselinum hortense* L.), kapor (*Anethum graveolens* L.) metélőhagyma (*Allium. schoenoprasum* L.), bazsalikom (*Ocimum* sp.), kakukkfű (*Thymus* sp.), menta (*Mentha* sp.), oregano (*Origanum vulgare*), rozmaring (*Rosmarinus officinalis*) zsálya (*Salvia* sp.) és tárkony (*Artemisia Dracunculus*) leveleinek karotinoid-összetételét. Mind a szárított, mind a mélyfagyasztott termékek között voltak házilag és iparilag (pl. Kotányi termékek) előállított termékek is. Vizsgálataink azt mutatták, hogy jelentősebb változás a karotinoid-összetételben nem következett be. Minden esetben lutein és β -karotin volt a fő komponens, mellettük karotinoid 5,6- és 5,8-epoxidokat (anteraxantin, violaxantin, mutatoxantin, neoxantin) detektáltunk. A tárkony esetén három, rövid kromofórral rendelkező vegyületet találtunk, melyek izolálása és szerkezetazonosítása még folyamatban van.

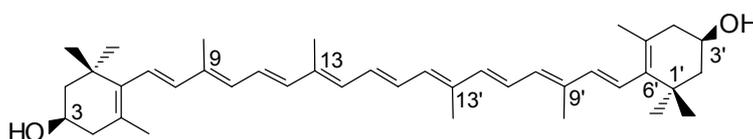
Ugyancsak megvizsgáltuk különböző salátafélék (közönséges fejes saláta (*Lactuca sativa* L.), jégsaláta (*Lactuca sativa*), zöld és piros lollo rosso saláta (*Lactuca sativa lollo rosso*), madársaláta (*Valerianella locusta*) karotinoid-összetételét is. Minden esetben a jellegzetes kloropaszt pigmenteket, azaz luteint és β -karotint azonosítottunk főkomponensként neoxantint, neokrómot, violaxantint, mutatoxantint valamint a lutein Z-izomerjeit minor komponensként.

A Magyarországon honos gyümölcsök közül elvégeztük a friss földieper (*Fragaria vesca*), a friss málna (*Rubus idaeus* L), a friss fekete szeder (*Rubus tornless*), a friss fehér, piros és fekete ribizli (*Ribes album*, *Ribes rubrum*, *Ribes nigrum* L.), a fehér és

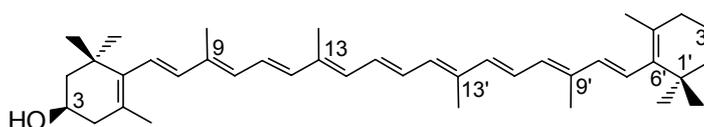
piros egres (*Ribes grassularia* L.), a szilva (*Prunus domestica* L.) valamint a sárga alma (*Golden delicious*) és a birsalma (*Cydonia oblonga* mill) karotinoid-összetételének vizsgálatát. Valamennyi gyümölcs luteint és β -karotint tartalmazott fő komponensként. A feldolgozott termékek közül a konzerv szilva illetve feketeszeder extraktumában ugyancsak megtaláltuk és azonosítottuk a 3'-epiluteint és az anhidrolutein I-t.

Az FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetből (Pécs) kapott 8 fehér (Zengő, cirfandli, Pinot blanc, Olasz rizling, Rajnai rizling, Chardonnay, Furmint, Hárslevelű) és 3 piros (Kékfrankos, Merlot, Cabernet Sauvignon) szőlő (*Vitis vinifera*) karotinoid analízisét végeztük el. A belőlük készült borok vizsgálatát eddig még nem tudtuk elvégezni.

A közönséges ördögcérna (*Lycium barbarum* L.) bogyótermése számos gyógyhatású vegyületet tartalmaz, és különböző gyógyhatású készítményekben alkalmazzák. Összehasonlítottuk a Pécsen szedett és Kínában termesztett bogyók karotinoid-összetételét. Mindkét esetben igen nagy mennyiségben találtunk zeaxantint (~90%), valamint kisebb mennyiségben β -kriptoxantint (~7%).



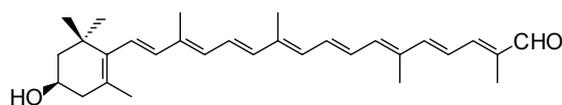
Zeaxantin

 β -Kriptoxantin

Újabban a nagy szupermarketekben számos egzotikus déli gyümölcs jelent meg, köztük a *Physalis alkekengi*. Összehasonlítottuk a délamerikai (Kolumbia) és a magyar *Physalis alkekengi* (zsidócserezsnye) bogyójának és kehelylevelének karotinoidjait, és jelentős eltérést találtunk a karotinoid-összetételben. A magyar változat nagyobb mennyiségű karotinoidot tartalmaz, a fő komponensek zeaxantin (~70%) és β -kriptoxantin (~12%). A kolumbiai változat ezzel szemben β -karotint

(~60%) és zeaxantint (~12%) tartalmaz. Itt jegyzem meg, hogy míg a kolumbiai növény bogyója ehető, a hazai mérgező, és csak, mint dísznövény ismert.

Elvégeztük a különböző citrusfélék (narancs (*Citrus sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*), klementin (*Citrus reticulata*), kumquat (*Citrus fortunella*), lime (*Citrus aurantifolia*), citrom (*Citrus limon*), grapefruit (*Citrus paradise*)) karotinoid analízisét is. Külön vizsgáltuk a gyümölcsök héját (amely nagyobb mennyiségű karotinoidot tartalmazott) és a húsát. A fő komponens β -kriptoxantinon, violaxantinon és β -citraurinon kívül kis mennyiségben luteint, zeaxantint, anteraxantint, mutatoxantint valamint β -citraurin-5,6-epoxidot azonosítottunk HPLC-DAD and HPLC-MS technikával (Nagy, V., Agócs, A., Szabó, Z., Márk, L., Ohmacht, R., Deli, J.: Comparative Study on the Carotenoid Composition of the Peel and the Pulp of Different Citrus Species; *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (előkészületben)).



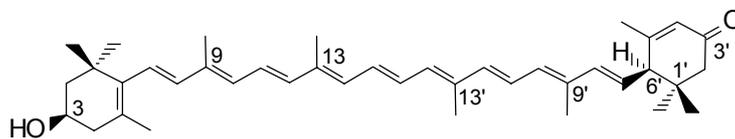
β -citraurin

A kereskedelmi forgalomban kapható narancs (illetve narancs tartalmú) gyümölcslevek vizsgálatát időhiány miatt még nem tudtuk elvégezni.

Izolálás szerkezetazonosítás

Főzött sóskából kristályos állapotban izoláltuk a 3'-epiluteint ((all-*E*-3*R*,3'*S*,6'*R*)- β , ϵ -karotin-3,3'-diol), az anhidrolutein I-t ((all-*E*,3*R*,6'*R*)-3-hidroxi-3',4'-didehidro- β , γ -karotin), és anhidrolutein II-t ((all-*E*,3*R*,6'*R*)-3-hidroxi-2',3'-didehidro- β , ϵ -karotin). Az izolált vegyületek egzakt szerkezet és konfiguráció meghatározását UV-VIS, CD, ^1H - és ^{13}C -NMR spektroszkópia és tömegspektrometria segítségével végeztük el. A sóskából izolált 3'-epilutein egzakt konfiguráció kijelöléséhez különböző forrásból származó epiluteineket hasonlítottunk össze: mocsári gólyahírből (*Caltha palustris*) izolált, luteinből savas epimerizációval előállított, valamint 3'-oxolutein nátriumborohidrides redukciójával előállított. A négy különböző forrásból származó 3'-epilutein 3'- és 6'-szénatomjának konfigurációja azonosnak bizonyult: 3'*S*,6'*R*.

A 3'-oxoluteint a lutein különböző módokon elvégzett oxidációjával állítottuk elő (Molnár, P., Deli, J., Ósz, E., Tóth, G., Zsila, F., Herrero, C., Landrum, J. T.: Preparation and Spectroscopic Characterization of 3'-Oxolutein. *Letters in Organic Chemistry* (közlésre előkészítve)).



3'-Oxolutein

Az epimerizációs reakció során mindig keletkeztek a 3'-epilutein Z-izomerjei is. Azonosításuk megkönnyítése érdekében a 3'-epilutein termikus és jód katalizálta fotoizomerizációjával előállítottuk a négy fő Z-izomert, a (9Z)-, (9'Z)-, (13Z)- és (13'Z)-epiluteint, és meghatároztuk szerkezetüket.

Az anhidrolutein I sóskából való izolálása során kis mennyiségben e vegyület Z-izomerjeit is sikerült elkülönítenünk, NMR méréseket azonban a kis mennyiség miatt nem tudtunk végezni. Ezért ugyancsak termikus valamint jód katalizált fotoizomerizációval előállítottuk és oszlopkromatográfiával szétválasztottuk a fő izomereket. Kristályosítani azonban különleges polaritásukból adódóan nem sikerült őket, az NMR minták készítésekor pedig visszaizomerizálódtak. A problémát végülis a Tübingeni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén Klaus Albert munkacsoportjával közösen sikerült megoldanunk. A termikus és fotoizomerizációval nyert izomer elegyekből on-line HPLC-NMR technikával tudtuk az egyes komponensek konfigurációját meghatározni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Elvégeztük számos zöldségféle és gyümölcs karotinoid-összetételének vizsgálatát. Megállapítottuk, hogy a különböző főzési, feldolgozási eljárások során azokban a növényekben, amelyek nagyobb mennyiségű növényi savat tartalmaznak, vagy amelyek hosszabb ideig savas közegben állnak, a lutein átalakul 3'-epiluteinné valamint anhidrolutein I és II-é. Bár sem a 3'-epilutein, sem az anhidrolutein nem rendelkezik káros hatással, az eredményeink azt mutatják, hogy a főzési,

konzerválási eljárások során a növényekből felvehető hasznos lutein mennyisége csökken.

A keletkezett 3'-epiluteint, anhidrolutein I-t és anhidrolutein II-t izoláltuk, szerkezetüket kémiai és modern spektroszkópiás módszerekkel (UV-VIS, CD, NMR, MS) igazoltuk. Előállítottuk a 3'-epilutein és az anhidrolutein I fő mono Z-izomerjeit is, melyek a feldolgozási eljárások során szintén keletkeznek.

Eredményeinkből eddig 7 közlemény jelent meg nemzetközi folyóiratokban, egyet közlésre elfogadtak, egy közlemény magyar folyóiratban jelent meg. További egy munkánk jelent meg és egyet fogadtak el közlésre proceeding kiadványban, három idézhető absztrakt pedig nemzetközi folyóiratban jelent meg. Az elvégzett munkát nemzetközi konferenciákon 13 poszter és 3 előadás, magyar tudományos fórumokon 8 poszter és 2 előadás formájában mutattuk be (a konferencia absztraktokat csak abban az esetben tüntettem fel a publikációs listán, ha az azokból készült közlemény még nem jelent meg). További két közleményt közlésre előkészítettünk, másik három közlemény pedig előkészítés alatt van.

További megjegyzések:

- A kutatási szerződésben vállalt feladatoktól nem tértünk el, annak ellenére, hogy a csoportban jelentős személyi változások voltak.
- A befektetett eszközök területén a betervezett HPLC detektor helyett spektrofotométert kellett vásárolnunk az előző készülék végleges meghibásodása miatt, illetve a már meg lévő HPLC detektorunkhoz vásároltunk újabb szoftver verziót.
- A kutatáshoz az ETT támogatását is igénybe vettük.
- A témát a jövőben is folytatni szeretnénk, elvégezve a még be nem fejezett vizsgálatokat.

Pécs, 2006. február

Dr. Deli József
egyetemi tanár, vezető kutató