

Humán és fitoösztrogének analitikai vizsgálata

Ph.D. értekezés

Montskó Gergely

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Témavezető: Prof. Dr. Ohmacht Róbert

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai
Intézet**

Pécs, 2010

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	5
1.1 Humán ösztrogének és más szexuáliszteroidok MALDI TOF vizsgálata	5
1.1.1. Szexuáliszteroidok előfordulása és élettana	5
1.1.2. Szexuáliszteroidok egészségügyi vonatkozásai	8
1.1.3. Szexuáliszetroidok analitikája	10
1.1.4. Szexuáliszetroidok MALDI TOF tömegspektrometriája	12
1.2. Fitoösztrogének analitikai vizsgálata	14
1.2.1. Fitoösztrogének előfordulása és bioszintézise	14
1.2.2. Transz-rezveratrol előfordulása és bioszintézise	15
1.2.3. Fitoösztrogének és a transz-rezveratrol egészségügyi vonatkozásai	16
1.2.4. A rezveratrol előfordulása borokban	19
1.2.5. A rezveratrol analitikája	19
1.2.6. A transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója	21
2. Célkitűzések	23
3. Anyagok és módszerek	24
3.1. Standard vegyületek és oldatok	24
3.2. Mintaelőkészítés	25
3.3. Műszerbeállítási paraméterek	27
4. Eredmények és megbeszélésük	29
4.1. Transz-rezveratrol és transz-piceid előfordulása magyar borokban	29
4.1.1 Eredmények értékelése	34
4.2. Transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója	38
4.2.1 Eredmények értékelése	46
4.3. Humán szexuáliszteroidok MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálata: eredmények és értékelésük	52
5. Összefoglalás	66
6. Köszönetnyilvánítás	68
7. Irodalomjegyzék	69
8. Tudományos közlemények	79

Rövidítések jegyzéke

LDL	Low density lipoprotein
HDL	High density lipoprotein
Ac-KoA	Acetil-KoenzimA
P450 _{scc}	Citokróm P450 cholesterol side-chain cleavage enzim
P450 _{c17}	Citokróm P450 szteroid 17 alpha-hidroxiláz/17,20 liáz
DHEA	Dehidroepiandroszteron
AD	Androsztendion
ACTH	Adrenokortikotróp hormon
FSH	Follikulus stimuláló hormon
LH	Luteinizáló hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
ER α	Ösztrogén receptor α
ER β	Ösztrogén receptor β
PI3K	Foszfoinozitol-3 kináz
GPR30	G-protein coupled receptor-30
7TMR	7-transzmembrán-hélix receptor
EGF	Epidermal growth factor
HB-EGF	Heparin-binding epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
CBG	Cortikosteroid binding globulin
SHBG	Steroid hormone binding globulin
IL-6	Interleukin-6
IL-1	Interleukin-1
TNF α	Tumor necrosis factor- α
DHT	5-dihidrotesztoszteron
DHEA-S	Dehidroepiandroszteron-szulfát
SPE	Szilárd fázisú extrakció
RIA	Radio immuno assay
LOD	Kimutatási határ
LOQ	Kvantifikálhatósági határ
GC	Gázkromatográfia

HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ESI	Electrospray ionization
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
MALDI TOF	Matrix-assisted laser/desorption ionization Time-of-flight
MS	Tömegspektrometria
GT	Girard-T
GP	Girard-P
CHCA	α -ciano-4-hidroxifahéjsav
DHB	2'5-dihidroxibenzoesav
SA	Mustársav
PBS	Foszfát puffertolt sóoldat
UDP	Uridin difoszfát
HSD	17 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz
XO	Xantin oxidáz
JAK	Janus kináz
MAPK	Mitogene activated protein kinase
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenozin trifoszfát
CHD	Koronária betegség
Dad	Diode array detection
UV	Ultra viola
CNT	Carbon nano tube

1. Bevezetés

1.1 Humán ösztrogének és más szexuáliszteroidok MALDI TOF vizsgálata

1.1.1 Szexuáliszteroidok előfordulása és élettana

A szexuáliszteroidok, hasonlóan a többi szteroidhoz, esszenciális molekulák az élő szervezetek számára. Biológiai hatásukat rendkívül alacsony koncentrációban is kifejtik, ezért az élő szervezetben is rendkívül kis mennyiségben fordulnak elő. A szexuáliszteroidok szintézise a két nemből a mellékvesékben, továbbá férfiakban a herékben, nőkben pedig a petefészekben történik.

A legfontosabb androgén, a tesztoszteron termelése férfiakban a herék Leydig sejtjeiben zajlik, továbbá kisebb mennyiségben ugyan, de nőkben is termelődik a tüszők theca sejtjei által. Férfiakban a Leydig-féle sejtek az androgéntermelésen túl progeszteront és ösztrogéneket is szekretálnak. A nők androgén hormon termelésének jelentőségét az adja, hogy a tesztoszteron a mellékvesék által termelt androsztendion mellett az ösztrogénszintézis kiindulási vegyületeként szolgálhat. A 3 leggyakoribb ösztrogént az ösztront, a ösztradiolt, valamint az ösztriolt a tüszők granulosa sejtjei, a theca interna sejtjei illetve a tüszők és azok származékai termelik. Nőkben a progesztinek, mint például a progeszteron szintén a theca és a granulosa sejtek által termelődnek.

Az androgének elsődleges hatásai az izomtömeg növekedésében, a férfi másodlagos nemi jellegek kialakításában játszanak szerepet, kiegészülve a spermatogenezis regulációjával. A ösztrogén hormonok elsődleges hatásai nőkben a petefészek működésének szabályozásában, a megtermékenyülés feltételeinek biztosításában nyilvánulnak meg. Az ösztrogének további hatásai közé tartoznak a női másodlagos nemi jellegek kialakítása, valamint az első menstruáció megjelenése is. A progeszteron a nőkben fenntartja a méhnyálkahártya embrió befogadására alkalmas állapotát, továbbá fokozza a sárgatest szexuáliszteroid termelését. Fontos kiemelni továbbá az androgének és az ösztrogének csontállományt védő hatását is, mely a csontépítés/csontlebonthat egyensúlyának megtartásában rejlik az oszteoblaszt és az oszteoklaszt sejtek aktivitásának szabályozásával. A csontok növekedésének stádiumában továbbá, az ösztrogének szabályozzák az epiphysis porckorongok időben történő záródását is.

[illegible]

A bioszintézis első lépése a koleszterin oldalláncából egy hat szénatomos fragment lehasadása a mitokondriális P450_{scc} enzim segítségével. Az így keletkezett 21 szénatomos pregnenolon a mitokondriumból kидiffundálva alapjául szolgál a szteroid bioszintézis további, endoplazmás retikulumban zajló lépéseinek. Ennek egyik útja az androgének szintézise mely során a pregnenolon előbb 17 α -hidroxi-pregnenolonná alakul a P450_{c17} enzim segítségével. Ugyanez az enzim a 17-20 liáz reakció katalizálásával a 17 α -hidroxi-pregnenolomból dehidroepiandrosteront (DHEA) és androsztendiont (AD) állít elő. A másik út a progeszteron termelése a 3 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim közreműködésével.

6

történő tesztoszteron és ösztrogén szintézishez nyújt alapot. A gonádokban történő szexuáliszteroid genezis kiindulási vegyületei a DHEA és az androsztendion (AD), melyekből egyrészt tesztoszteron, másrészt az aromatáz enzim hatására ösztradiol és ösztron képződik. Az ösztriol mindkét vegyületből keletkezhet a máj vagy a placenta közreműködésével (1. ábra).

A mellékvesékben történő szexuáliszteroid termelést a glucocorticoid szekréciót érintő hatása mellett főként az ACTH szabályozza kiegészülve egyéb hipofízis eredetű faktorokkal (β -lipoprotein, γ -MSH). A szexuáliszteroidok herékben, és petefészekben zajló szintézisét közvetlenül az agyalapi mirigy által termelt FSH és LH hormonok szabályozzák, amelyeket pedig a hipotalamusz GnRH szekréciója befolyásol. A hormonok negatív és pozitív feedback mechanizmussal hatnak saját termelődésükre a hipofízis és a herék/ováriumok között, valamint a hipofízis és a hipotalamusz között is (Leövey A, 2001).

Az ösztrogének hatásaikat nukleáris és extranukleáris utakon keresztül fejtik ki. A nukleáris ösztrogénreceptoroknak két típusát különböztetjük meg, az ER α és az ER β receptorokat melyek két különböző gén termékei. A cink-ujjat tartalmazó DNS kötő domainjük 97%-ban homológ, míg az α -hélixekből álló ligandkötő domain csak 60%-ban. Eloszlásuk szervek szerint és a különböző életkorokban is változatos. A két fajta ER homo- és heterodimereket is képezhet, befolyásolva az ösztrogének biológiai hatásait. Ismert jelenség továbbá az, hogy az ER β transzkripciós represszor funkciójának köszönhetően gátolni képes az ER α transzkripciós aktivitását, tovább árnyalva a képet.

Amennyiben az ösztrogénreceptor ligandot köt meg, a ligand-ER komplex a sejtmagba transzlokálódik, ott dimerizálódik, majd a DNS ún. ösztrogén-reszponzív elemeihez kötődik. Az aktív ER dimer ezt követően kiegészülve más koaktivátor fehérjékkel (cAMP response element-binding protein, Amplified in breast cancer-1) az adott gén transzkripcióját váltja ki (Rice S, Whitehead S A, 2008). Bizonyos sejttélettani változások, mint például azonnali, másodpercek alatt bekövetkező intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedés azonban túl gyorsan zajlanak le ahhoz, hogy génexpressziós változásokkal magyarázni lehetne őket, ezek háttérében extranukleáris mechanizmusok keresendők (Higashi et al., 2005). Ilyen mechanizmusok a nem-receptor típusú tirozin kináz (Src) molekula aktiválódása további protein kinázok egyidejű modulációja mellett, valamint a PI3 kináz aktiváció is. A gyors ösztrogénhatás harmadik közvetítője pedig nagy valószínűséggel a nemrég felfedezett membrán ösztrogén receptor a G-protein coupled receptor-30 (GPR30).

Ez egy hét transzmembrán alegységgel rendelkező (7TMR) receptor mely ösztrogének specifikus kötésére képes. A hormonkötést követően a sejtmembránhoz kötött heparin-binding EGF (HB-EGF) felszabadulását váltja ki, amely EGF ezt követően szabad EGF receptorokhoz kötődik, kiváltva azok aktivációját. Ez a mechanizmus magyarázatot adhat az ösztrogének növekedési faktorszerű hatásaira is. Ez, és az Src által aktivált Ras/ERK jelátviteli út, valamint a Foszfinozitol-3 kináz (PI3K) aktiváció bizonyíthatóan szerepet játszik a sejtek hormon dependens proliferációjában, antiapoptózisában mely szexuál hormon szenzitív daganatok kialakulásában jelentős tényező (Kampa et al., 2008). Az ösztrogén receptor jelenlétére nézve negatív mellrák sejtek ösztrogénszenzitivitásaért is a GPR30 receptor felelhet (Filardo et al., 2008).

A vérplazmában a szexuálszteroidok 90-95%-a fehérjékhez kötötten szállítódik, biológiai hatása csak a szabad formáknak van. Ezen fehérjék közül a corticosteroid binding globulin (CBG, transzkortin), a steroid hormon binding globulin (SHBG), valamint nem specifikus kötéssel ugyan, de az albumin emelendő ki. A szteroidok szekréciója vizelettel, illetve az epével történik epesavak formájában a máj által történő oxidáció után. A vizelettel ürülő hormonok előbb szintén a májban glükuronáción vagy szulfatáción esnek át (Leövey A, 2001).

1. 1. 2. Szexuálszteroidok egészségügyi vonatkozásai

Nők esetében az ösztrogénhiányos állapot, annak élettani háttérétől függetlenül gyors csontállomány csökkenéssel jár, különösen a csontok trabekuláris állományában. A jelenség elsősorban a gerincben, a felkarcsontban és a kézközépcsontokban mutatható ki. A csöves csontokban található kéregállomány szintén elvékonyodik, de e folyamat lassabban zajlik le, mint a trabekuláris állományban. A csontitkulásos folyamatok eredményeként csökken a csontállomány tömege, a csontszerkezet megváltozik, valamint a csontszövetek mechanikai ellenállóképessége is csökken. Ezek a folyamatok gyakran a csontszövet szerkezetét érintő mikrotörésekhez, vagy csonttörésekhez vezetnek. Az ösztrogén, és az androgén hiányos állapotokban is megfigyelhető, hogy a folyamatosan zajló csontátépülés, „remodelling” folyamatában az építés/lebontás egyensúlyának megváltozik a csontépülés rovására. A csontállomány fokozott lebomlása az oszteoklaszt sejtek megnövekedett aktivitásának köszönhető. Fiziológias állapotokban az ösztrogének és az androgének jelenléte az oszteoklasztok csökkent képzéséhez, azok apoptózisának fokozódásához, és csontlebontó képességük csökkenéséhez vezet. Emellett, mind a

tesztoszteron, mind az ösztrogének meghosszabbíthatják az oszteoblaszt sejtek élettartamát azok apoptózisának gátlásával (Syed F, Khosla S, 2005). Patológiás, ösztrogén vagy androgénhiányos állapotokban az oszteoklaszt sejtek aktivitása megnő citokinek, mint például interleukinek (IL-6, IL-1), vagy a tumor necrosis factor- α (TNF α) fokozott felszabadulásának hatására. Ezen citokinek forrásai a sztrómasejtek, a monociták és főként a T limfociták (D'Amelio et al., 2008). A férfi csonttritkulás is a szexuáliszteroidok csökkent szintjével függ össze, azonban jóval ritkább.

A szexuáliszteroidok kritikus szerepet játszanak a mell és prosztatatarák etiológiájában is. A prosztatatarák, egy androgén dependens rákos megbetegedés melynek növekedését androgén hormonok segítik elő (Higashi et al., 2005). A legfőbb keringő androgén hormon a tesztoszteron amely, a jelentősebb biológiai aktivitással bíró 5-dihidrotesztoszteronná (DHT) alakul a prosztatában. A humán szervezetben a mellékvesék által termelt DHEA valamint annak szulfátja (DHEA-S) is tesztoszteronná konvertálódhat, amely tesztoszteron ezt követően DHT-vé alakul a perifériás szövetekben. Ennek megfelelően csekély androgén aktivitása ellenére a DHEA és metabolitjai is felelősek a prosztatatarák kialakulásáért valamint növekedéséért (Mitamura et al., 2003). Hasonló összefüggés mutatható ki nőknél a mellrák és az ösztrogén hormonok között.

A mellrák kockázatát növelő legfontosabb faktorok a szexuáliszteroidok által regulált reprodukciós folyamatokkal függenek össze, mint az első menstruáció bekövetkezése korai életkorokban, a terhesség hiánya, vagy a magas életkor a menopauza bekövetkeztékor. A mellrák kialakulásának kockázata és a vérben keringő ösztrogének mennyisége között pozitív korreláció figyelhető meg. Tanulmányok szerint az emelkedett tesztoszteron, vagy ösztrogén szintek a mellrák kialakulásának magasabb kockázatával járhatnak együtt. Azokban a nőkben akikben a keringő ösztradiol és tesztoszteron koncentrációja a populációs átlagnál magasabb, a mellrák kialakulásának valószínűsége kétszeres is lehet. Az, hogy a tesztoszteron hatása direkt módon érvényesül, vagy esetleg enzimatikusan ösztradiollá történő konverzióján keresztül, részleteiben még nem tisztázott. Kevésbé ismert ugyanakkor a menopauza előtti életkorokban fennálló mellrák kockázat a keringő szexuáliszteroidok mennyiségével való összefüggésben. Ennek oka, hogy fiatal nőkben a hormonális szintek, különösen az ösztrogének szintjei rendkívül nagy változatosságot mutatnak a nemi működés ciklusossága miatt. A kevés rendelkezésre álló adat ellenére egyértelmű pozitív korreláció látszik fiatal nőknél is. Magas keringő szexuáliszteroid koncentráció esetén a mellrák kialakulásának valószínűsége hozzávetőlegesen kétszeres.

1.1. 3. Szexuálissteroidok analitikája

A szexuálissteroidok rendkívül alacsony, nano vagy pikomoláris koncentrációban fordulnak elő a különböző szövetekben. Kimutatásukat tovább nehezíti, hogy rendkívüli szerkezeti hasonlóságot mutatnak egymással (Higashi et al., 2005), így vizsgálatukhoz kellőképpen szelektív analitikai módszerek szükségesek. Elsődleges tényező a minta-előkészítési módszerek helyes megválasztása. Almeida és munkatársai (2006) szilárd fázisú extrakciót (SPE) alkalmazva több szexuálissteroid hormon egyidejű vizsgálatát végezte el vizeletből kiindulva. Strahm és munkatársai (2008) anioncserélő SPE segítségével szexuálissteroidok szulfát és glükuronid metabolitjait vizsgálták szintén vizeletből kiindulva. Gyakran feldolgozott anyag a vérplazma is, (Johnson D W, 2005), valamint ritkábban ugyan, de neurosteroidok vizsgálatához a cerebrospinális folyadék is. Széleskörűen alkalmazott analitikai technika a radio immuno assay (RIA). A RIA-val lehetséges nagyszámú biológiai minta feldolgozása is, valamint a módszer érzékenysége is nagy (LOQ 0,1 nmol) mondható (Okamura et al., 2005). Azonban a RIA vizsgálatokhoz a kereskedelmi forgalomban kapható kitek segítségével történt mennyiségi meghatározások eredményei jelentős mértékben eltérhetnek egymástól annak függvényében, hogy melyik gyártó termékét használták (Stanczyk et al. 2003). A vérben számos konjugált szteroid származék is kering, ugyanakkor ezeknek csak kevés képviselője szerezhető be standardként, kiszűrendő az antitestek keresztreakcióit. Ennek megfelelően a RIA technika jelentős mennyiségi túlbecsléshez vezethet, ha nem kellően specifikus antitestet használunk a meghatározás során. További korlát, hogy a májenzimek által mind ösztéron és ösztradiol esetében hidroxiláció figyelhető meg az ösztrogénváz több szénatomján is. Ezen hidroxilált metabolitok bármelyike is adhat kereszt reakciókat abban az esetben, ha az antitest specifikitása nem elég magas.

Ezen okokból kifolyólag az utóbbi időkben más módszerek is rutinszerűen használatosak, jellemzően a kromatográfia, és/vagy a tömegspektrometria eszköztárából. Hagyományosan alkalmazott módszerek a gázkromatográfia (GC), illetve újabban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) is. A tömegspektrometria (MS) szerepelhet önálló analitikai módszerként, továbbá GC vagy HPLC elválasztást követően detektorként alkalmazva (Honour J W, 2006), (Fuh et al., 2004). A GC tömegspektrometriás detektálással történő alkalmazásának előnye, hogy kombinálja a gázkromatográfia jelentős felbontóképességét a tömegspektrometria kiemelkedő

érzékenységevel. A gázkromatográfia ugyanakkor illékony vegyületeket kíván, mely a szteroidok esetében származékképzési lépésekkel valósítható csak meg.

Tandem tömegspektrometria alkalmazásával az egyes metabolitok szerkezetvizsgálata és kvantifikálása is megoldható a kromatográfiánál magasabb érzékenységben. Fontos megemlíteni azonban, hogy a szteroidok származékképzése tömegspektrometriás azonosítást megelőzően is szükséges (Seo et al., 2005) miután rossz hatásfokú tömegspektrometriás ionizációval jellemezhetőek (Griffith et al. 2001), mely a kimutatás alacsony érzékenységét okozza (Williams et al., 1999).

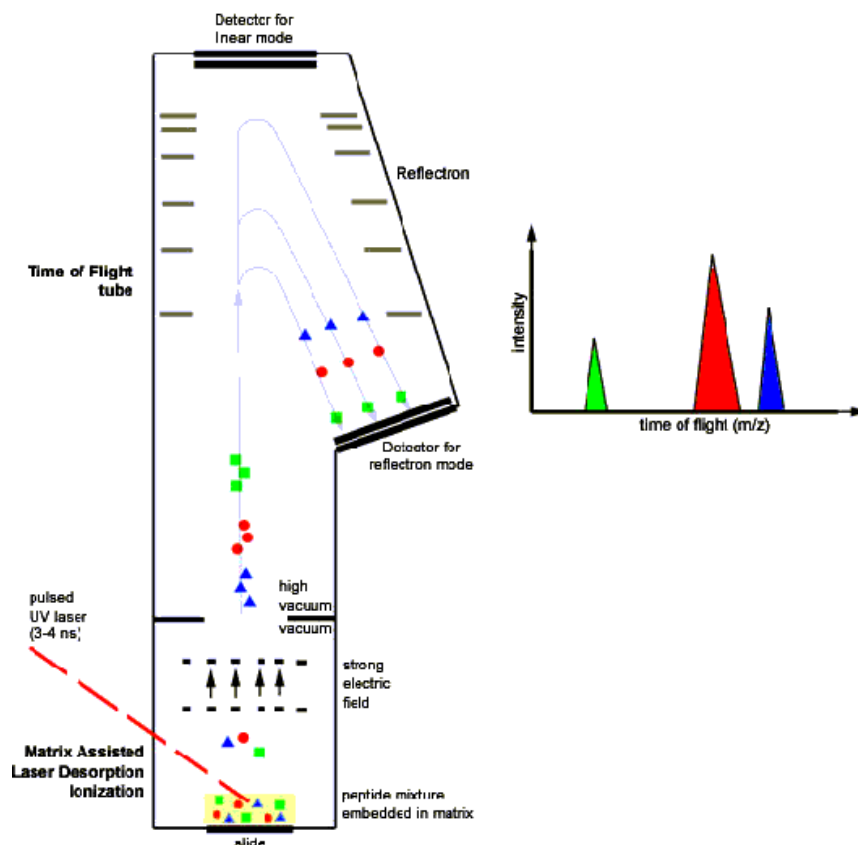
Előszeretettel alkalmazott reagensek a Girard-T [carboxymethyl] trimethylammonium chloride hydrazide (GT) és a Girard-P 1-[carboxymethyl] pyridinium chloride hydrazide (GP) reagensek. A reakció oxo-szteroidok módosítására alkalmas, melyek során GT, vagy GP hidrazon származékok keletkeznek. Ezek a származékok kvaterner nitrogénatomot tartalmaznak mely hatékony tömegspektrometriás ionizációt tesz lehetővé. Cowan és munkatársai (2008) tesztoszteron, epitesztoszteron, valamint azok metabolitjainak tömegspektrometriás analízisét megelőzően a glükuronid metabolitok metilálását, valamint a szteránvázban található keton csoportok Girard P reagenssel történő származékképzését végezték el. A GP reagens kiválóan alkalmazható MALDI ionizáció esetén is (Griffith et al., 2003. Wang et al., 2006). A GP-hez hasonló származékot ad a GT reagens is mely ritkábban, inkább gázkromatográfiás szeparációt megelőzően alkalmazott reagens (Shackleton et al., 1997). Az alkoholos hidroxilcsoportok trimetil szililizálása, vagy a fenolos csoportok alkilálása pentafluorobenzilbromid segítségével szintén sikeresen alkalmazott reakciók (Courant et al., 2007). A származékképzés alkalmazhatóságát azonban korlátozza a tény, hogy számos szteroid vegyület többféle terméket is ad a reakció során, valamint, hogy univerzálisan használható reagens nem elérhető (Higashi et al., 2005). Az így keletkezett, gyakran instabil járulékos termékek pedig megzavarhatják az analízis menetét. Kardinális pontok a derivatizációs reakció körülményei is, például a hőmérséklet, vagy a reakció inkubációs ideje, további bizonytalansági tényezőket felvetve (Hadeef et al., 2008).

1.1.4. Szexuálissteroidok MALDI TOF tömegspektrometriája

A matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tömegspektrometriát (MALDI TOF) 1985 óta ismerjük Franz Hillenkamp, Michael Karas, és Koichi Tanaka (1987) munkássága nyomán. A technika proteomikai célokon túl is széleskörűen használható, lehetséges kis molekulású anyagok vizsgálata is. A tömegspektrometria során, az első lépés egy ionizációs folyamat, mely során az analit molekulából ionok keletkeznek. Az ionizációt követően az egyes ionok tömeg/töltés (m/z) arányuk alapján elválaszthatók el egymástól, mely folyamat a tömegspektrométer analizátorában zajlik le. Az ionok végül egy detektorba csapódnak be.

A MALDI ionizáció során folyékony halmazállapotú mintát keverünk össze egy ún. mátrix vegyület oldatával, majd a keveréket egy rozsdamentes acélból készült tálcára (MALDI plate) csepegtetjük fel. Az oldószer elpárolgását követően a minta és a mátrix molekulák keveréke kristályos szerkezetben szilárdul meg. Az ionizáció során a kristályos minta/mátrix keveréket vákuumban lézersugárral „lőjük” meg, ekkor a mátrix molekuláiból töltött részecskék kerülnek a mintában található analit molekulákra. Az ionizáció folyamatához az alkalmazott lézersugár szolgáltat energiát.

Mátrixként olyan vegyületek használatosak melyek konjugált kettős kötést tartalmazó hattagú gyűrűvel rendelkeznek, mint az α -ciano-4-hidroxifahéjsav (CHCA), a 2,5-dihidroxibenzoészav (DHB), vagy a mustársav (SA). Ez a delokalizált elektronszerkezet képes az ionizációhoz általánosan használt 337 nm hullámhosszú lézersugár energiáját abszorbeálni, ezáltal lehetővé téve a MALDI folyamatát. Az ionizációt követően elektromos térerősség ún. gyorsítófeszültség segítségével történik meg az ionok analizátorba történő juttatása. A MALDI ionforrás legáltalánosabban TOF analizátorhoz kapcsolva használatos. A TOF analizátor felépítését tekintve, egy acél cső melyben vákuum uralkodik. Működési elvét az adja, hogy a forrást elhagyó ionok vákuumban történő repülési sebessége, azaz adott úthosszon repülési ideje m/z arányuk függvénye. A nagyobb m/z értékű ionok lassabban a kisebb m/z értékűek pedig gyorsabban teszik meg, így a kisebb tömegek előbb, a nagyobb tömegek később csapódnak be a detektorba. A detektor lehet lineáris ekkor az ionforrást elhagyó ionok közvetlenül a detektorba csapódnak, vagy reflektoron, ahol is egy elektromágneses tükör által visszafordítva az ún. reflektoron detektorba érkeznek. Ez utóbbi előnyét a hosszabb repülési úthossz által megvalósítható nagyobb felbontás adja. A működési elv a 2. ábrán tekinthető át szemléletesen.



2. ábra. A MALDI TOF tömegspektrométer működési sémája. Az ionforrást elhagyó ionok a repülési idő analizátoron keresztül a lineáris, vagy a reflektoron detektorba jutnak el. (http://www.proteomicsnijmegen.nl/Maldi_pages/Maldi-about.htm)

A MALDI TOF valamint a molekuláris szerkezet vizsgálatára is alkalmas MALDI TOF/TOF tömegspektrometria alkalmazása lehetséges eljárás (Wang et al., 2006, Khan et al., 2006) a szteroidok minőségi analízisében is. Előny a módszer gyorsasága, magas (femtomol) érzékenysége és az egy vizsgálatra jutó csekély költsége. A szteroidok derivatizációjára azonban ebben az esetben is szükség van a megfelelő érzékenység eléréséhez, ugyanis a szteroidok MALDI ionizációja is csekély hatásfokkal jellemezhető. A MALDI tömegspektrometriás vizsgálata során további problémát jelent, hogy az általánosan használt mátrix vegyületek, CHCA, DHB, és SA ugyanabban a tömegtartományban adnak csúcsokat, mint a szteroidok, így a mátrix és a szteroid csúcsok interferálnak egymással. A derivatizáló reagens alkalmazása erre a nehézségre is megoldást nyújt, mivel ha a keresett szteroid komponens tömegéhez hozzáadódik a derivatizáló reagens tömege, az így keletkezett származék már magasabb tömegtartományban lesz detektálható, ahol is a mátrix vegyület csúcsai már nem zavaróak.

1.2 Fitoösztrogének analitikai vizsgálata

1.2.1. Fitoösztrogének előfordulása és bioszintézise

A fitoösztrogének természetes körülmények között előforduló biológiai aktivitással rendelkező másodlagos növényi metabolitok, melyek szerkezeti hasonlóságot mutatnak a 17α -ösztradiollal. Ezen kémiaiilag polifenolként leírható vegyületek a növényeket ért stressz faktorok hatására (UV sugárzás, mikrobiális fertőzés) termelődnek legnagyobb mennyiségben az epidermális szövetekben, azon kívül a levelek mezofillumában, vagy bazális régióiban. (Hutzler et al., 1998). Elsősorban monoglikozidok alakjában fordulnak elő, glükózzal, vagy galaktózzal alkotott konjugátumként (Flamini R, 2003), de kis mennyiségben konjugátatlanul is. Ezeket a konjugációs reakciókat glükozil-transzferáz enzimek katalizálják UDP-glükóz vagy UDP-galaktóz felhasználásával.

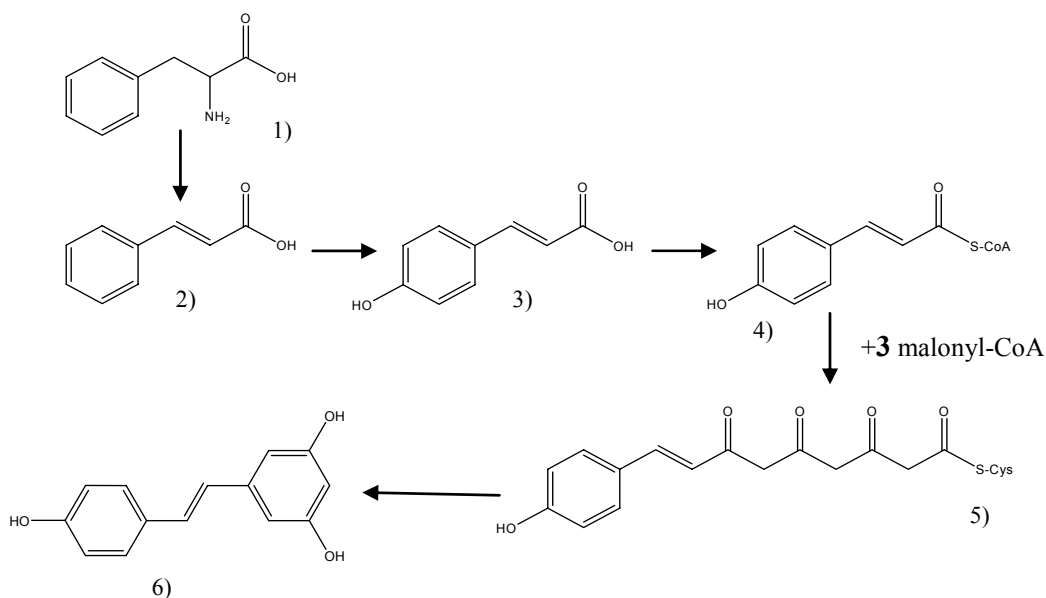
A polifenolok legegyszerűbb képviselői, mint például a hidroxicinnamát, ferulát, kaffeát mindössze egy aromás gyűrűt tartalmaznak, fenolos hidroxilcsoportjaik száma alapján lehetnek mono, di, vagy trifenolok is. A komplex polifenolok kettő vagy több aromás gyűrűvel rendelkeznek, hidroxilcsoportjaik száma ennek megfelelően számos lehet. Jellemző képviselők az antociánok, flavonoidok vagy a stilbének. A fitoösztrogének biológiai funkcióikon túl, a gyümölcsök és az azokból származtatott termékek, mint például a gyümölcslevek vagy borok színéhez, ízéhez, valamint dietétikai tulajdonságaihoz is hozzájárulnak (Alonso et al., 2004).

A fitoösztrogének csoportjának legnépesebb tagjai az izo- és egyéb flavonoidok mint a lignánok, tanninok, vagy a stilbének mint például a transz-rezveratrol (Taylor et al., 2005). Ezen csoportokon belül is a legtöbbet tanulmányozott molekulák a daidzein és a genistein az izoflavonoidok közül (Schwartz et al., 2009), valamint a stilbén rezveratrol. További, ösztrogénhatás szempontjából kisebb jelentőségű képviselők a hidroxicinnamátok (ferulát, kumarát), a hidroxibenzoátok (gallát), valamint a tanninok és ligninek.

A fitoösztrogének szintézise a citoszólban, kisebb mennyiségben a Golgi-apparátusban, az endoplazmás retikulum felszínén és a plasztiszokban zajlik.

1.2.2. Transz-rezveratrol előfordulása és bioszintézise

A rezveratrol (3, 4', 5 trihidroxistilbén) jelentős mennyiségben található meg szőlőhájban, borokban,ogyorófélékben, lignifikált szövetekben, valamint szójababban (Mazza et al., 2002, Lee et al., 2004, Palomino et al., 2000). A rezveratrolt első alkalommal szőlőlevélben (*Vitis vinifera*) mutatták ki, ahol is jelentős mennyiségben található meg, mechanikus sérülések, UV sugárzásra, vagy gombás (*Botrytis*, *Plasmopora*) fertőzésre adott válaszként. Előfordulása létezhet szabadon, vagy glikozidként is, ezt az alakot piceidnek nevezzük. A rezveratrol transz-, és cisz-sztereoizomerek alakjában is létezhet, a cisz-rezveratrol glikozidját cisz-piceidnek hívjuk. A transz-rezveratrol bioszintézise (3. ábra) az epidermisz sejtek membránján, illetve a kloroplasztiszokban a stilbén szintáz által történik (Pan et al., 2009). A kiindulási vegyület a fenilalanin (1) mely először fahéjsavvá (2) aztán 4-kumaráttá (3) alakul a cinnamát 4-hidroxiláz enzim segítségével. A kumarát ezután CoA-val aktiválódik (4), a 4-kumarát-CoA ligáz enzim katalízisével. Utolsó lépésben a stilbén szintáz katalízisével egy darab 4-kumaroil-CoA és három darab malonil-CoA molekula kondenzálódik, majd egy átmeneti tetraketid terméken (5) keresztül alakul ki a transz-rezveratrol (6) (Halls C, Yu O, 2008).



3. ábra A transz-rezveratrol bioszintézisének fő lépései.

1.2.3. Fitoösztrogének és a transz-rezveratrol egészségügyi vonatkozásai

A polifenolok elsődleges forrásai a növényi eredetű élelmiszerek, mint a hüvelyesek, gabonák, gyümölcsök és az ezekből származó termékek, mint a gyümölcslevek, teák és a borok (Kuhnle et al., 2009). Felszívódásuk a bélcsatornából történik, ürülésük pedig a széklettel és a vizelettel natívan, vagy kémiaiilag módosítva. A felvételt követő egy óra után már kimutathatóak a vérplazmából, a plazmában található mennyiségük maximumát hozzávetőlegesen négy, öt óra után érik el (Mazza et al, 2002). A polifenolok bioaktivitása antioxidáns, szabadgyök fogó, illetve azon tulajdonságaiknak köszönhető, hogy egyes képviselőik képesek az ismert ösztrogénreceptorokhoz kötődni. Egy polifenol akkor viselkedhet ösztrogénként, (Mazur W, Adlercreutz H, 2000) ha tartalmaz legalább egy fenolos gyűrűt, mely hasonló az ösztrogének „A” gyűrűjéhez, ha az ösztrogén hormonokhoz hasonló, alacsony molekulatömeggel rendelkezik, és ha kettő vagy több hidroxilcsoport megléte esetén, azok egymáshoz képest térben történő elhelyezkedése hasonló az ösztrogénekéhez. Megfelelő koncentrációban fogyasztva (Dang Z C, Lowik C, 2005) jelentős szerepet játszanak kardiovaszkuláris megbetegedések, csonttritkulás, menopauzás tünetek és több rákos megbetegedés kezelésében és megelőzésében.

A fitoösztrogének magas koncentrációban ugyan csökkentik (*in vitro*), de a táplálékkal bevihető mennyiségben növelik az oszteoblaszt sejtek aktivitását. A kettős hatást valószínűleg az okozza, hogy a fitoösztrogének mindkét ($ER\alpha$, $ER\beta$) ösztrogénreceptorhoz kötődnek melyek modulálhatják egymás hatását. A csontlebontást végző oszteoklaszt sejtek esetében ez a kettősség nem látszik, itt mind *in vitro*, mind *in vivo* egyértelműen a fitoösztrogének gátló hatása érvényesül. Ekkor az oszteoklasztok differenciálódása lassul, apoptotikus folyamataik fokozódnak (Dang et al., 2005). Az eredmény a nettó csontállomány növekedése, kompenzálva a menopauzás ösztrogénhiányos állapotokat.

Az $ER\alpha$ és $ER\beta$ receptorokhoz történő egyidejű kötődés a fitoösztrogének ösztrogénszenzitív daganatokra gyakorolt hatásában is megmutatkozik. Annak ellenére, hogy az $ER\alpha$ receptorok a mell daganatos elváltozásainak progresszióját közvetítik az $ER\beta$ receptorok ezt a hatást gátolhatják. Mellrák sejtvonalakban *in vitro* az $ER\beta$ aktivációja gátolja a sejtek proliferációját, sőt az $ER\alpha$ -val heterodimert alkotva is csökkenti annak proliferatív hatását. A tény, hogy fitoösztrogének képviselői csökkenthetik az ösztrogénreszponzív daganatok növekedését, feltételezhetően annak tudható be, hogy az $ER\beta$ -hoz nagyobb affinitással kötődnek, mint az $ER\alpha$ -hoz. Továbbá a

fitoösztrogének bizonyíthatóan gátolják a 17β -hidroxiszteroid dehidrogenáz (HSD) családba tartozó enzimek képviselőit is. A 17β -HSD I az ösztron ösztradiollá történő átalakulást katalizálja, mely enzim aktivitása bizonyíthatóan emelkedett mellrákos betegekben (Miyoshi et al., 2001). Az ösztradiol az ösztronnál magasabb bioaktivitással bír, így emelkedett szintjei a mellrák kialakulásának magasabb kockázatával járnak (Rice et al., 2008).

Az ösztrogénszenzitív daganatos elváltozásokon túl számos súlyos krónikus rákos, vagy kardiovaszkuláris megbetegedés függ össze az oxidatív károsodások hatásaival is, melyet a fitoösztrogének kompenzálhatnak. A WHO halálozási statisztikái alapján ez figyelemre méltó tény, hiszen napjainkban a kardiovaszkuláris megbetegedések szerepelnek vezető halállokként a fejlődő országokban.

Az oxidatív stresszért felelős reaktív gyökök endogén, és exogén forrásokból is származhatnak. Elsődleges endogén források a citokróm P450 típusú enzimek, a mitokondriumokban és a peroxisómákban, valamint a xantin oxidáz (XO) enzim is. Az exogén hatások közül az UV sugárzás, a nehézfémionok (Cr VI, Cd) és a többek között lipid peroxidációhoz vezető túlzott alkoholfogyasztás érdemel említést (Sun et al., 2001). A szabad gyökök károsítják a membránokat, valamennyi makromolekulát, továbbá mutagén hatásuk is ismert, melyek a sejtek öregedéséhez, nekrozisához, vagy daganatos megbetegedésekhez vezethetnek. Különösen érzékenyek az oxidációra a low density lipoprotein (LDL) molekulák, melynek oxidációja jelentős szerepet játszik az érlemezés kialakulásában (Frémont L, 1999). Az oxidált, károsodott LDL-t az endoteliális sejtek nem szabályozott endocitózissal felveszik, ami az LDL felszaporodásához vezet a sub-endoteliális régiókban, érrendszeri megbetegedéseket okozva (Yu et al., 1999).

A közvetlen, agresszív hatásokon túl a szabad gyökök bizonyíthatóan befolyásolják a sejtek intracelluláris jelátviteli folyamatait is. Ez hatással van a sejtek proliferációjára, apoptózisára, és differenciálódására. Elsődleges hatás a sejtmembrán belső oldalán lokalizált Ras fehérje aktiválódása, mely az apoptózis gátlásához és fokozott sejtproliferációjához vezet. Hasonló az eredménye az Src kináz (Src), vagy a Janus kináz (JAK) családba tartozó nem-receptor típusú tirozin kinázok aktiválódása is, melyek további jelátviteli útvonalakat (MAPK, NF- κ B, PI3K) serkentenek. Az ezen útvonalakhoz tartozó fehérjék fokozott expressziója daganatok széles spektrumában figyelhető meg, beleértve a mell rákos elváltozásait is. A szerin/treonin típusú kinázok, mint például az AKT fokozott aktivitása is hasonló eredményre vezet.

A MAPK által regulált NF- κ B rendkívül fontos jelátviteli molekula, mely a sejtek osztódását, transzformációját és az angiogenezist is regulálja. Az NF- κ B fehérje aktiválódása a sejtosztódási folyamatok inicializációjához vezet. Jól dokumentált tény, hogy a rákos transzformáción átesett sejtek számos képviselője az NF- κ B fokozott expresszióját mutatja. A rákos daganatok tekintetében fontos kiemelni azt a tényt is, mely szerint a daganatok vaszkularizációjának mértéke limitálja azok kiterjedését. A daganatos elváltozások csak abban az esetben képesek korlátlanul növekedni, ha a vaszkularizációs folyamatok is lépést tudnak tartani a növekedéssel.

További hatása a szabad gyököknek a proliferatív AP-1 fehérje aktiválása mellett a tumor szuppresszív p53 fehérje esetleges károsítása, mely a p53 gén mutációján keresztül valósulhat meg (Valko et al., 2006).

A káros oxidatív hatások ellen az endogén mechanizmusok (kataláz, szuperoxid dizmutáz) mellett exogén antioxidánsok tápora, vitaminok, például C és E-vitamin, valamint fitoösztrogének, polifenolok védenek. Az oxidatív károsodások kiváltó okai az ischemiás szívelégtelenségnek is, mely során a reaktív szabad gyökök mennyisége megnő a szervezet antioxidáns kapacitását meghaladva, szöveti károsodást okozva. Az oxidatív stressz során a szívműködés anyagcsere-egyensúlya felborul élettani, elektrofiziológiai és morfológiai eltérésekhez, végül a szívizom nekrozisához vezetve. Az ischemiás szívműködés reperfüziója során újabb patológiás elváltozások alakulnak ki, mint például reperfüziós aritmiák, a pumpafunkció zavarai, és sejthalál. Az akut kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában a trombociták is szerepet játszanak, mivel fokozott aggregációjuk során az endoteliális felszínre letapadva szűkületet, vagy elzáródást okozhatnak (Hung et al., 2000).

A szívműködés mellett magas oxigénfogyasztása és az antioxidáns mechanizmusok csekélyebb előfordulása miatt az agyszövet is fokozottan ki van téve az oxidatív stressz hatásainak. Következésképpen akut vagy krónikus degeneratív kórképek (agyi ischemia, Alzheimer-kór) a neuronális szövetekben is ismertek (Zhuang et al., 2003).

Ezen kedvezőtlen élettani változások csökkenthetőek transz-rezveratrol hatására, LDL oxidációt csökkentő, trombocita aggregációt gátló, valamint gyulladáscsökkentő, és antioxidáns mechanizmusok segítségével. Az ischemiás állapotokat követően transz-rezveratrol hatására drámai javulás figyelhető meg a szív pumpafunkciójának, és energiametabolizmusának helyreállításában is. Az ischemia reperfüziót követő pitvari tachycardia és fibrilláció rövidebb idő alatt megszűnik, és a szívműködés ATP és kreatin-foszfát készletei is gyorsabban helyreállnak (Hung et al., 2000).

1.2.4. A rezveratrol előfordulása borokban

Az érlemeszedés és a koronária betegség (CHD) kialakulása bizonyíthatóan összefügg a helytelen étrenddel, és a fentebb részletezett oxidatív károsodások következményeivel. A kismértékű vörösborfogyasztás azonban hajlamosító életvitel ellenére is (Valko et al., 2006) védelmet biztosíthat CHD és érlemeszedés ellen (Viñas et al., 2000), mely jelenség Francia-paradoxonként ismert (Sun et al., 2001, Poussier et al., 2005).

Általában a vörösborok sokkal nagyobb mennyiségben tartalmazzák a rezveratrolt, ennek oka a vörös és fehérbor készítésének technológiai különbségeiből ered. A transz-rezveratrol ugyanis legnagyobb mennyiségben a bogyók epidermiszében található meg, és a vörös borok készítése során a must hosszabb ideig érintkezik a bogyók héjával, mint a fehérborkészítés során. A fenolos komponensek glikozidként, vagy szabadon előfordulva a borok színét és ízvilágát határozzák meg (Viñas et al., 2000). A borok transz-rezveratrol tartalma fajtafüggő is, jelentős mennyiség található például a Pinot Noir vagy a Cabernet Sauvignon fajtákban. A borok rezveratrol tartalmára klimatikus, földrajzi, talajtani, és technológia tényezők vannak további erőteljes hatással. A bogyók epidermiszében ismeretünk szerint csak a transz- izomer található meg, a borokban azonban a cisz- izomer is jelen van, mely vélhetőleg a borkészítés lépései során keletkezik a transz-rezveratrolból (Goldberg et al., 1995).

A vörösborokban található transz-rezveratrol jelentősége annak kitűnő hozzáférhetősége adja. A nyers növényi termékekben, mint például a gyümölcsök, a polifenolok legtöbbször polimerek, vagy konjugátumok alakjában fordulnak elő, ami csökkent hatásfokú emészthetőséghez és felszívódást okoz. A borokba ugyanakkor az erjedés folyamata során jelentős mennyiségű szabad transz-rezveratrol kerül, melynek felszívódása sokkal könnyebb (Valko et al., 2006).

1.2.5. A rezveratrol analitikája

A transz- /cisz- rezveratrol analitikájában legelterjedtebben HPLC technikákat alkalmaznak. Az egyes módszerekben közös, hogy az elválasztás alapja fordított fázisú kromatográfiás elválasztás, apoláros, rendszerint C_{18} állófázist alkalmazva izokratikus, esetleg grádiens elúcióval történik. Mozgófázisként acetonitril:víz, vagy metanol:víz elegye használatos, kiegészülve kis mennyiségű (0,1-1 v/v %) szerves (ecetsav) (Viñas et

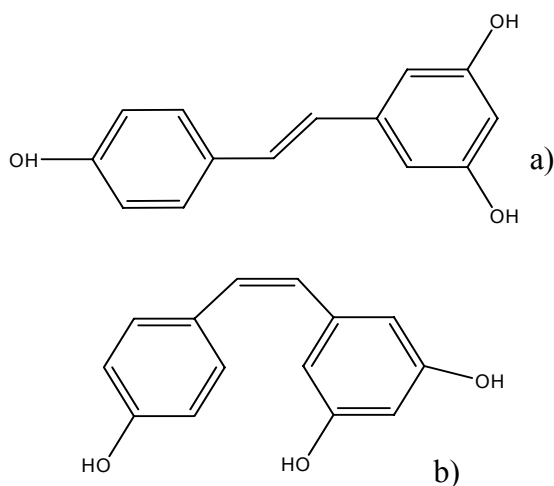
al., 2000), vagy szervesen (foszforsav) (Hanzlíková et al., 2004) savval, viaszosítandó a polifenolokban található fenolos hidroxilcsoportok disszociációját. Az elválasztott komponensek detektálása történhet UV elnyelés (Goldberg et al., 1995), fluoreszcencia alapján (Quirós et al., 2007), vagy tömegspektrometria segítségével (Bravo et al., 2006). Az össz rezveratrol tartalom meghatározásához szükség lehet továbbá a glikozidok enzimatisz hidrolízisére (Goldberg et al., 1995) vagy a szabad és konjugált formák egyidejű meghatározására. Vinas és munkatársai (2000) más polifenolokkal együtt spanyol borok és mustok transz- és cisz-rezveratrol tartalmát határozták meg összehasonlítva az UV és a fluoreszcenz detektálás eredményeit. Fluoreszens detektálást alkalmazva az érzékenység kismértékű növekedése, és a kvantifikálhatósági határ csökkenése érhető el. Transz-rezveratrol esetén ez 0,01 µg/ml, míg cisz-rezveratrol esetében pedig akár: 0,004 µg/ml is lehet szemben az UV-Dad módszerek érzékenységével (0,02 µg/ml és 0,02 µg/ml) (Quirós et al., 2007).

Lehetőség van gázkromatográfiás elválasztásra is (Cai et al., 2009, Luan et al., 2000), ekkor azonban szükség van egy derivatizációs lépésre az analízist megelőzően, mivel az erősen poláros polifenolok illékonyasága rendkívül alacsony. A bonyolultabb mintaelőkészítés ellenére megemlítendő a gázkromatográfiás módszerek magas érzékenysége. A kimutatási határ SPE-t is alkalmazva 0,003-0,005 µg/l lehet (Cai et al., 2009), ez az érték azonban HPLC és fluoreszens detektálás kombinációjával is elérhető. HPLC alkalmazása mellett szól az is, hogy az analízist megelőzően egy egyszerű membránszűrést, vagy centrifugálást leszámítva semmilyen mintaelőkészítésre nincs szükség (Quirós et al., 2007, Goldberg et al., 1995).

Elterjedt detektálási technika a tömegspektrometria alkalmazása is Atmospheric pressure chemical ionization (APCI), Electrospray ionization (ESI) (Loredana et al., 2006) esetleg MALDI ionizációval. Bravo és munkatársai (2006) számos polifenol egyidejű analízisét végezték el portugál borokból, APCI tömegspektrometriával, mely módon a komponensek többsége magasabb érzékenységgel volt kimutatható, mint ESI-vel. A transz-rezveratrol leghatékonyabban APCI+ módban volt detektálható, ez egy későbbi összehasonlító tanulmányban újra megerősítésre került (Bravo et al., 2008). Tömegspektrometria segítségével lehetőség van az egyes komponensek retenciós időn és abszorpciós/fluoreszcenz spektrumon túl tömeg alapján történő azonosítására is, melynek specifikas tandem tömegspektrometria útján meghatározható fragmentációs mintázatok segítségével tovább növelhető (Bravo et al., 2006).

1.2.6. A transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója

A rezveratrol, mint azt már részleteztük két sztereoiszomer alakjában fordulhat elő. A kettő közül energetikailag a transz-stilben („Z”) forma a stabilabb, a cisz-resveratrol („E” stilbén) rendkívül instabil, (Goldberg, et al., 1995). Fénytől védett helyen tárolva, a transz-rezveratrol oldata, hacsak nem magas pH-jú pufferben készítettük el hónapokig stabil lehet. A cisz-rezveratrol tiszta oldatáról ugyanez nem mondható el, a stabilitást az alacsony pH és a napfény tovább rontja, a cisz-rezveratrol visszaalakul a transz- formává. Ezen okból kifolyólag a cisz-rezveratrol esetleges biológiai hatásairól sem állnak rendelkezésre biztos ismeretek, mivel instabilitása megnehezíti a vele való kísérletes munkát.



4. ábra A transz- és a cisz-rezveratrol szerkezeti képlete.

A transz-rezveratrol oldatának fotoizomerizációját napfény vagy 366 nm-es (Trela B C, Waterhouse A L, 1996) UV sugárzás katalizálja. A reakció során az oldat transz-rezveratrol tartalma csökken, ezzel párhuzamosan a belőle átalakuló cisz-rezveratrol mennyisége nő. Ezt a változást időben ábrázolva egy egyensúlyi állapot rajzolódik ki, mely hozzávetőlegesen 5, egyes szerzők szerint (Trela B C, Waterhouse A L, 1996) két óra elteltével áll be, de ez erősen függ a besugárzás körülményeitől is. Ez az egyensúly 24 óráig biztosan fennáll addig a komponensek egymáshoz viszonyított aránya nem változik jelentős mértékben (Hanzlíková et al., 2004). Egyes irodalmi adatok alapján (Goldberg, et al., 1995, Trela B C, Waterhouse A L, 1996) a fotoizomerizációs reakció egyetlen terméke a cisz-rezveratrol, más szerzők azonban (Hanzlíková et al., 2004), még további,

általuk nem azonosított termékek keletkezéséről számoltak be. E további komponensek napfény hatására három és fél óra, UV sugárzás hatására pedig már 20 perc elteltével kimutathatók voltak (Quirós et al., 2007). Hanzlíková és munkatársai a transz-rezveratrol oldatának diffúz napfény hatására bekövetkező fotoizomerizációját vizsgálták hőmérséklet és eltelt idő függvényében, mely folyamat eredményeképpen a cisz-rezveratrolon kívül két komponens keletkezését is kimutatták. Hernández és munkatársai ugyanakkor a fotoizomerizáció folyamatát 254 nm hullámhosszúságú UV besugárzás mellett tanulmányozták, egy további komponenst kimutatva, melynek abszorpciós spektrumát is leírták. A reakció kinetikája alapján feltételezték azt is, hogy ez a termék a cisz-rezveratrolból keletkezik.

2. Célkitűzések

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Munkánk során meg kívántuk határozni, hogy a fitoösztrogéneket képviselő transz-rezvertarol és annak glikozidja, a transz-piceid milyen mennyiségben fordul elő magyar borokban.
2. Az egyes évjáratokat, pincészeteket és fajtákat képviselő borok összehasonlításával meg kívántuk vizsgálni, hogy mely faktorok befolyásolják jelentősen a borok transz-rezveratrol tartalmát.
3. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója csak az ismert cisz-rezvertarol keletkezésével jár-e, vagy esetleg további új komponensek is kimutathatók a reakció eredményeképp.
4. Amennyiben más, további komponensek keletkezése figyelhető meg célul tűztük ki ezek azonosítását is HPLC, MS és MS/MS módszerekkel.
5. Célunk volt továbbá egy olyan MALDI TOF tömegspektrometria alapú módszer kifejlesztése, mellyel lehetővé válik a származékképzés nélkül nehezen ionizálható szexuáliszteroidok gyors tömegspektrometriás vizsgálata biológiai mintákból.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Standard vegyületek és oldatok

Transz-rezveratrol és transz-piceid standardok

A transz-rezveratrolt (99%) valamint a transz-piceidet a Sigma-tól (Sigma-Aldrich Budapest, Hungary) vásároltuk. Az oldatokhoz, valamint az eluensek készítéséhez használt etanolt a Reanal-tól (Reanal Rt. Budapest, Hungary), a metanolt a Scharlau-tól (HPLC-grade, Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain) szereztük be. Az eluensekhez általunk előállított kétszerdesztillált vizet, a transz-rezveratrol és a transz-piceid vizes oldataiban pedig MilliQ vizet (Millipore Co., MA, USA) használtunk.

Szexualsteroid standardok

A MALDI TOF tömegspektrometriás szteroidmeghatározás beállításához ösztront, (1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one), β -ösztradiolt, (3,17 β ,-dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien), ösztriolt, (1,3,5(10)-estratrien-3,16 α ,17 β -triol), progeszteront (4-pregnene-3,20-dione) és tesztoszteront (17 β -Hydroxy-3-oxo-4-androstene) használtunk analitikai standardként. A hormonokat a Sigma-tól (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) szereztük be. A törzsoldatok készítése során 0,1 mg hormon standardot oldottunk fel 800 μ L metanolban (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spanyolország). A teljes oldódást követően az oldathoz 200 μ L MilliQ vizet (Millipore Co., MA, USA) adtunk. Ezt a lépést a metanol csekély felületi feszültsége tette szükségessé, mivel tisztán nem képes cseppet formálni a rozsdamentes acélból készült MALDI target plate felszínén. A tömegspektrometriás vizsgálatokhoz ezeket a törzsoldatokat hígítottuk tovább 80%-os metanol segítségével.

Fullerén mátrix

A szexualsteroidok MALDI TOF analíziséhez mátrixként C₇₀ és C₆₀ fullerént (Gold grade, Hoechst AG Frankfurt, Németország) alkalmaztunk. Első lépésben telített oldatot készítettünk toluol (Spektrum 3D Kft., Debrecen, Magyarország) felhasználásával. A fel nem oldódott fullerén szemcséket 10 perc 3000 rpm-en történő centrifugálással távolítottuk el. A centrifugálást követően a felülúszót óvatosan, az üledék felkeveredését elkerülve leszívtuk. A tömegspektrometriás analízis során a toluolos felülúszó szolgált MALDI mátrix anyagként.

Fullerén mátrixfelszín kialakítása

A MALDI TOF tömegspektrometriás mérés során először a mátrix felszín került kialakításra a MALDI plate-en (MTP 384 target plate, Bruker Daltonics, Bréma, Németország) C₇₀ és C₆₀ fullerén oldatok alkalmazásával. A fullerén, MALDI mátrixként abban az esetben nyújthat optimális teljesítményt amennyiben kellően homogén kristályfelszínt alkot a MALDI plate felszínén. Első lépésben a fullerének telített, toluolos oldatát pipetta segítségével vittük fel a plate felületére. A toluol azonnali elpárolgását követően egy vékony fullerén kristályfilm képződött a MALDI target plate felszínén.

3.2. Mintaelőkészítés

Borminták

42 különböző bort vizsgáltunk meg a Dél-Dunántúlon található villányi valamint az Észak-Magyarországon található egri bortermő régiókból. A villányi borokat a Bock illetve a Polgár pincészetek biztosították, az egri borokat az Egri Korona borház. A vizsgált évjáratok a villányi borok esetében a 2003-tól a 2007-ig terjedtek, az egri borok esetében ez a 2007-es, egy esetben pedig a 2006-os évjáratot jelentette. A vizsgált borfajtákat és évjáratokat az 1. táblázat tartalmazza. A borokból 1 ml-t Eppendorf csőben centrifugáltuk 10 percig 3000 rpm-en, így eltávolítva az esetlegesen előforduló lebegő részecskéket, mint például a borkő vagy dugódarabkák. A borok ezt követő HPLC analízise extrakció nélkül, direkt injektálással történt.

Transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója

A transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakcióját 14,5%-os alkoholos oldatban tanulmányoztuk. Első lépésben a tökéletes oldódás érdekében 0,5 mg transz-rezveratrolt 1 ml tiszta etanolban oldottunk fel. Ezt az oldatot 9 ml 95/5 (V/V) víz:etanol keverékével 10 ml -re töltöttük fel, hasonlóan a borokban található 12% és 15% közötti alkoholtartalomhoz. A kapott 0,005 mg/ml-es oldat 1 ml -ét UV fényt áteresztő Eppendorf csőben világítottuk meg teljes sötétségben egy Cole Palmer 9815 UV lámpa (Cole Palmer Instrument Co., Vernon Hills, Illinois) segítségével 365 nm hullámhosszon. Ebből a reakcióelegyből 200 µl térfogatú mintákat vettünk ki további HPLC analízis

céljára 10, 30 és 60 perc, valamint öt óra elteltével. A mintákat a HPLC analízis elvégzéséig sötétben, 4°C-on tartottuk.

Igazságügyi csontanyag

A minta-előkészítés első lépése a lágyrész maradványok eltávolítása volt a leletek felkarcsontjáról, illetve gerincoszlopáról. Ezt követően a csontokról a további környezeti szennyeződések (föld, növényi törmelék) desztillált vízzel, valamint pufferrel (PBS) mostuk le. A csontokat kisebb darabokra tördelve kézzel őröltük meg achát mozsárban 0,2 mm szemcseátmérő eléréséig. A hormonok kivonása a csontőrleményből a következőképpen zajlott: 100 mg csontőrleményhez 10 ml diklórmétánt (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk, majd az elegyet ultrahangos kádiban extraháltuk 15 percen át. Az extrakciót követően az oldatot centrifugálással tisztítottuk 10 percig 3000 rpm-en. A felülúszót eltávolítottuk és félretettük, az üledéket pedig a fent említett lépésekben még két alkalommal extraháltuk. Az extraktumokat egyesítettük, majd pedig szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszféra alatt bepároltuk. A bepárlási maradékot 10 µl acetonitril/víz (9:1) v/v arányú keverékében oldottuk fel.

Vizelet minták

A vizeletmintákat egy, a harmadik trimeszterben lévő 29 éves terhes nőtől kaptuk. A szexuálissteroidok kivonását folyadék-folyadék extrakcióval végeztük. A mintákat először centrifugáltuk 20 percig 4000 rpm-en 4°C –on, leülepítve a lebegő szennyeződések. A tisztítást követően a vizelet felülúszóját három alkalommal diklórmétánnal extraháltunk. 1 ml lecentrifugált vizelethez 1 cm³ diklórmétánt adtunk, majd ezt a keveréket 2 percig, szobahőmérsékleten vortexeltük. A felülúszót leszívtuk, az üledéket a fent említett lépésekben még két alkalommal extraháltuk. Az felülúszokat egyesítettük, majd szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszféra alatt bepároltuk. A maradékot 10 µl acetonitril/víz (9:1) v/v arányú keverékében oldottuk fel.

3.3. Műszerbeállítási paraméterek

Borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának HPLC analízise

A transz-rezveratrol és transz-piceid meghatározáshoz használt HPLC berendezés egy Dionex P680 grádiens pumpát (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), egy héliumos gáztalanító rendszert, és egy Rheodyne 8125 injektort (Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Germany) tartalmazott. Az injektorhoz 20 µl térfogatú mintaadagoló kapilláris tartozott. A kromatogramok detektálását, valamint az elválasztott komponensek abszorpciós spektrumának meghatározását Dionex 340D UV–VIS diódasoros detektor (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) segítségével tettük meg. A folyadékromatográfiás elválasztás 250 mm×4.6 mm méretű, általunk előállított szilikagél (120 Å) alapú C₁₈–as (ODS) fordított fázisú HPLC oszlopon történt meg. A mérési paraméterek beállításához, valamint a kromatogramok elemzéséhez a Chromeleon Data Management szoftvert (Version 6.60 SP3 Build 1485, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) használtuk.

Az elválasztást többlépcsős, bináris grádiens elúció segítségével oldottuk meg. „A” eluensként metanol–víz–ecetsav (10/90/1; v/v/v) arányú keveréke, „B” eluensként pedig metanol–víz–ecetsav (90/10/1; v/v/v) arányú keveréke szolgált 1,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. A grádiens összesen 35 perc hosszú kétlépcsős profilú volt. Részleteiben: 0,0–18,0 perc 0% -tól 40% B; 18,0–25,0 perc 40% -tól 100% B; 25,0–27,0 perc 100% B; 27,0 perc és 35,0 perc között egy nyolc perces regenerációs szakaszt iktattunk be 100% „A” eluenst alkalmazva. Az elválasztást 306 nm-en, szobahőmérsékleten detektáltuk, ahol mind a transz-rezveratrol, mind a transz-piceid abszorpciós maximummal rendelkezik. A két komponens mennyiségét a csúcs alatti területek alapján határoztuk meg.

Transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciójának HPLC analízise

A fotoizomerizációs reakció nyomon követése a fentebb részletezett műszeregyüttessel történt, mindössze a detektálási hullámhosszokban tapasztalható különbség. Az elválasztást szintén szobahőmérsékleten végeztük, de a detektálást két különböző, 285 nm és 306 nm hullámhosszokon valósítottuk meg, ahol a transz- és a cisz- izomerek abszorpciós maximummal rendelkeznek.

HPLC-APCI tömegspektrometria

A HPLC készüléket egy Bruker HCT Esquire (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) tömegspektrométerhez kapcsoltuk egy microsplitter szelep segítségével (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). A HPLC detektorából távozó 1,5 ml/perc áramlási sebességű eluensáramot 3:7 arányban osztottuk el a tömegspektrométer ionforrása és a kidobó üvegedény között. A tömegspektrometriás ionizációt APCI ionforrás segítségével valósítottuk meg pozitív ionizációs módban. Szárítógázként nitrogén szolgált 250 °C-on, 5 liter/perc áramlási sebesség mellett. Az ionok detektálása a „Smart Parameter Setting” (SPS) beállítás mellett történt, 229,2 és 227,2 m/z tömegszámokat gyűjtve. A szkennelés tartományát 50 és 2000 m/z között határoztuk meg.

A tandem MS (MS/MS) analízishez a manuális fragmentáció (MS_n) beállítást használtuk a már említett 227,2 m/z és 229,2 m/z ionokat fragmentálva. A tömegspektrométer, illetve a mérési paraméterek beállításához az Esquire Controll Version 5.3 Build 11 (Bruker Daltonics Bréma, Németország) szoftvert használtuk, az adatok kiértékeléséhez pedig a Data Analysis Version 3.3 Build 146 (Bruker Daltonics Bréma, Németország) szoftvert.

MALDI TOF tömegspektrometria

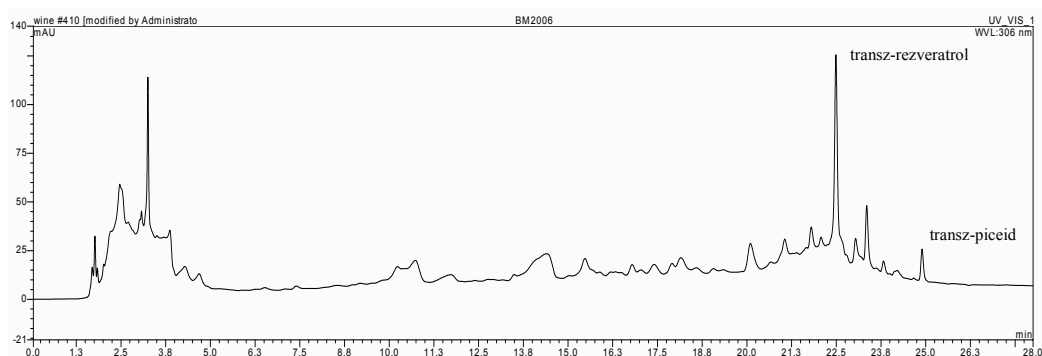
Miután az optimális mátrix szerkezet kialakításra került, mindegyik mintából (standard vegyület, vagy extraktum) 1 µl-t csepegtettünk fel a kristályfilmre. A méréseket egy Autoflex II típusú (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel végeztük. A készülék reflektron detekciós üzemmódban működött pozitív és negatív ionizációs módban egyaránt. Az ionizációhoz egy MNL-205MC (LTB Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Németország) típusú 337 nm hullámhosszúságú pulzáló nitrogén lézert alkalmaztunk. A mérések 50 Hz lézerfrekvencia, valamint 20.0 kV gyorsítófeszültség mellett történtek. A méréseket megelőzően külső kalibrációt alkalmaztunk, a kalibrációs pontokat mustársav (α -ciano-4-hidroxifahéjsav) és 2,5-dihidroxibenzoészav mátrix molekulák csúcsai adták. A minták tömegspektrumait 200 m/z és 500 m/z között vettük fel, valamennyi spektrum 1000 lövés eredményét összesítve készült. A mérési paraméterek beállításához a FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) szoftvert használtuk, az adatok kiértékeléséhez pedig a Bruker FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) szoftvert.

4. Eredmények és megbeszélésük

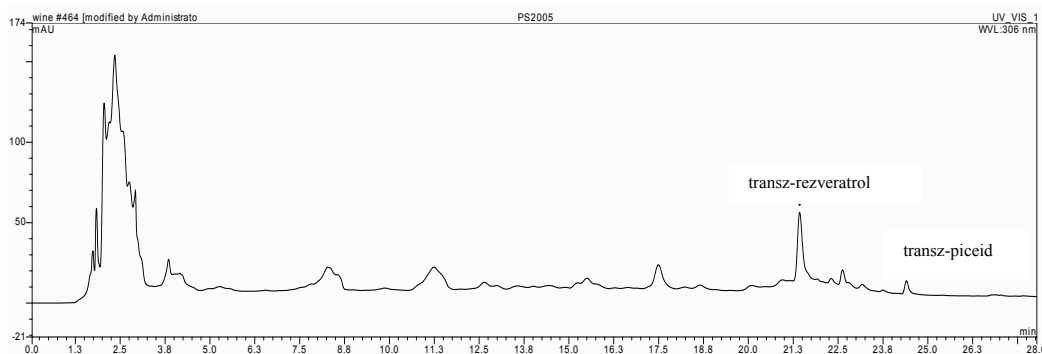
4.1. Transz-rezveratrol és transz-piceid előfordulása magyar borokban

A jelen munkában 42 különböző magyar vörösbor került feldolgozásra a 2003-2007-es évjáratokból, három pincészetet, és két földrajzi és klimatikus szempontból elkülönült bortermő régiót reprezentálva. A Villányi régióból a Bock és a Polgár pincészetek, az egri régióból pedig az Egri Korona Borház borai kerültek vizsgálatra a legnagyobb gyakorisággal előforduló fajták közül.

Az 5. és 6. ábrákon két tipikus vörösbor kromatogram látható, a Bock Merlot (2006) és Polgár Syrah (2005). A 9. és a 10. ábra egy fehér és egy rozé bor kromatogramját ábrázolja. A transz-rezveratrol és transz-piceid azonosítása a standard vegyületek retenciós idejével, valamint abszorpciós spektrumával összehasonlítva történt meg. A transz-rezveratrol retenciós ideje $21,9 \pm 0,3$ percnak adódott, míg a transz-piceid esetében a retenciós idő $24,7 \pm 0,2$ perc volt, összhangban állva korábbi méréseink (Mark L et. Al., 2005) eredményeivel. A keresett anyagok pontos koncentráció meghatározását a fentebb részletezett módszerben foglaltak alapján végeztük el, az eredmények összefoglalását a 1. táblázat tartalmazza. A transz-rezveratrol és transz-piceid tartalom erősen függött a vizsgált évjáratától, és az egyes borfajtáktól. A villányi borok esetében a transz-rezveratrol tartalom általában a Merlot, a Pinot Noir, a Kékfrankos, valamint a Cabernet Sauvignon fajtákban kiemelkedő.

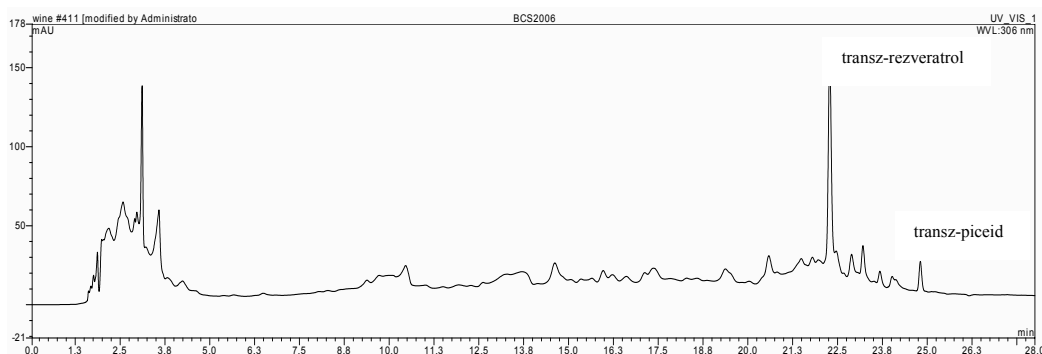


5. ábra. Bock Merlot (2006) vörösbor kromatogramja (UV detektor, 306 nm).



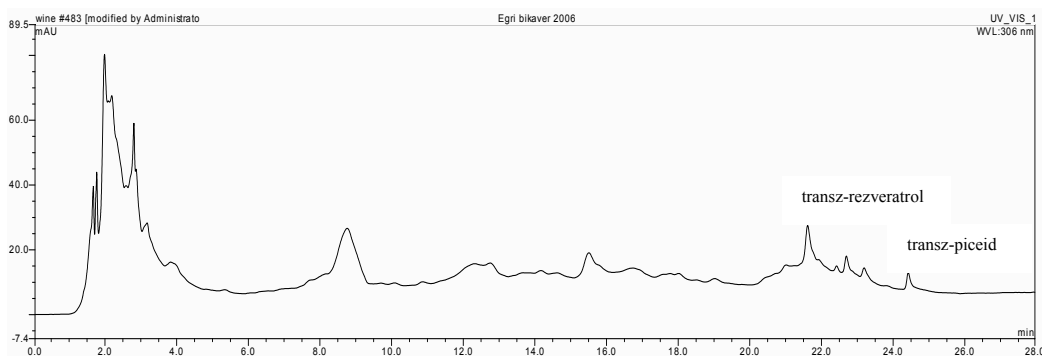
6. ábra. Polgár Syrah (2005) vörösbor kromatogramja (UV detektor, 306 nm).

A vizsgált borokban és évjáratokban a transz-rezveratrol koncentrációja 0,4 mg/l és 10,4 mg/l közötti mennyiségekben fordult elő, míg ugyanez a transz-piceid esetében 0,1 mg/l és 4,4 mg/l közötti értéknek adódott. Kiemelkedően jelentős mennyiségű transz-rezveratrolt sikerült kimutatni a Bock Cabernet Sauvignon (2006) vörösborban (7. ábra) 10,4 mg/l-t, valamint a Bock Merlot (2006)-ban 7,2 mg/l-t.



7. ábra. Bock Cabernet Sauvignon (2006) vörösbor kromatogramja (UV detektor, 306 nm).

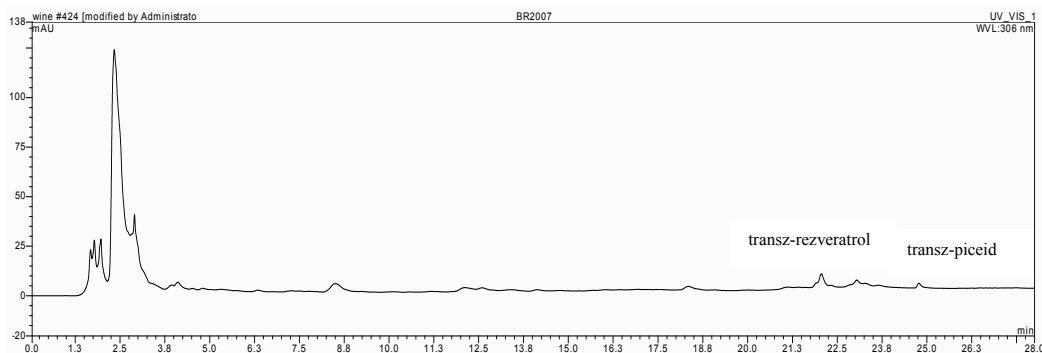
Ezek az értékek egy hosszabb időszak, valamint nemzetközi irodalmak eredményeivel összehasonlítva is figyelemre méltóak. A Polgár pincészet borai átlagosan hasonló mennyiségű transz-rezveratrolt tartalmaztak, mint a Bock pincészet borai. A legnagyobb mennyiségű transz-rezveratrolt a Polgár Syrah (2005)-ben sikerült kimutatni, az érték 5.1 mg/l-nek adódott. Az egri borvidékről származó vörösborokban a transz-rezveratrol átlagos koncentrációja alacsonyabb volt, mint a villányi borvidék boraiban, a mennyiségek 0,4 mg/l és 2,5 mg/l közötti értékeknek adódtak. A legmagasabb koncentrációt 2,5 mg/l-t a 2007-es Egri Kékfrankosban detektáltunk. Az Egri Bikavér (2006) vörösborban átlagosnak mondható 1 mg/l transz-rezveratrol koncentrációt találtunk (8. ábra).



8. ábra. Egri Bikavér (2006) vörösbor kromatogramja (UV detektor, 306 nm).

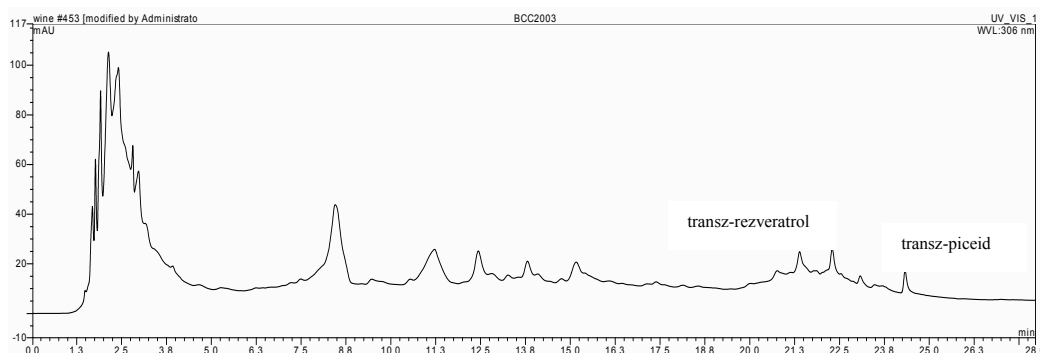
A vizsgált borok transz-piceid tartalma 0,1 mg/l és 4,4 mg/l közötti érték volt. Kiemelkedően magas transz-piceid koncentrációt találtunk a Bock Kékfrankos (2007) borban (4,4 mg/l) valamint az Egri Kékfrankos (2007) borban (3,7 mg/l).

A vizsgálat tartalmazott egy fehér és egy rozé bort is, a Bock pincészettől. A vörösborokkal összehasonlítva, várakozásainknak megfelelően mind a transz-rezveratrol mind transz-piceid mennyisége alacsonyabbnak adódott a fehér, és rozé bor borkészítési technológiájának megfelelően. A fehérborban a Bock Capella Cuvée (2003) borban ez a mennyiség 0,7 mg/l volt a transz-rezveratrol esetében, míg a transz-piceid esetében az érték 0,1 mg/l-nek adódott. A Bock Rose Cuvée (2007) rozé borban, nagyságrendileg hasonló mennyiséget találtunk, mind a két komponens esetében 0,5mg/l-t.



9. ábra. Bock Rose Cuvée (2007) rozébor kromatogramja (UV detektor, 306 nm).

Ebben a két esetben a vörösborokhoz képest mindenképpen alacsonyabb transz-rezveratrol és transz-piceid értékeket vártunk, hiszen a borkészítés technológiai sajátosságaiból fakadóan itt jóval kevesebb a kontaktus a szőlőszemek héjával, ahol is a legnagyobb mennyiségben fordulnak elő különféle polifenolok.



10. ábra. Bock Capella Cuvée (2003) fehérbor kromatogramja (UV detektor, 306 nm).

Az adatokat összehasonlítva egy hosszabb időszak adataival (Nikfardjam et al., 2006) a Villányi borok transz-rezveratrol tartalma, átlagosan hasonlóan alakult, bizonyos években azonban ettől jelentősebb eltérések is tapasztalhatók mind negatív, mind pedig pozitív irányokban. Különösen a 2006-os, illetve a 2007-es évek bizonyultak kedvezőnek a Villányi borok transz-rezveratrol tartalma szempontjából. Irodalmi adatokkal történő összehasonlítás után ki lehet jelteni, hogy a magyarországi borokban, különösen a villányi bortermő régió esetében mind a transz-rezveratrol mind a transz-piceid viszonylag magas koncentrációban található meg. Cseh borokban Hanzlíková és munkatársai 1-6,2 mg/l transz-rezveratrolt és 0,7-2,8 mg/l cisz-rezveratrolt találtak. A legmagasabb koncentrációt a Pinot Noir és a Kékfrankos fajtákban mérték. Spanyol borokban ez hasonló, 0-2,9 mg/l közötti értéknek adódott (Viñas et al., 2000), míg szicíliai borokban a transz-rezveratrol esetében 0,6-2,44 mg/l közötti mennyiségeket sikerült kimutatni. A glikozid 1,48-3,7 mg/l mennyiségben fordult elő. A világ átlag a transz-rezveratrol mennyiségének tekintetében 0,7-3,6 mg/l közötti értéket vesz fel jellemzően (Loredana et al., 2006).

A 42 magyar bor feldolgozása során kapott eredményeket összesítve, az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A vizsgált borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának összefoglalása. Az értékeket mg/l mennyiségben adtuk meg.

	t-rezveratrol mg/l	t-piceid mg/l
Bock Merlot 2006	7,2	2,4
Bock Cabernet Sauvignon 2006	10,4	1,3
Bock Caber. Franc 2006	4,1	n. d.
Bock Cabernet Franc 2005	4,1	n. d.
Bock Royal Cuvee 2003	2,7	n. d.
Bock Cabernet Sauvignon 2004	5,5	n. d.
Bock Rose Cuvee 2007	0,5	0,5
Bock Blaufrankisch 2003	3,6	1,8
Bock Blaufrankisch 2006	2,1	n. d.
Bock Blaufrankisch 2007	2,0	4,4
Bock Cuvee 2004	3,2	n. d.
Bock Cabernet Sauvignon 2003	1,2	n. d.
Bock Portugieser 2007	1,4	0,1
Bock Syrah 2005	3,4	2
Bock Cuvee 2005	3,3	n. d.
Bock Cuvee Barrique 2003	1,7	n. d.
Bock Ermitage 2005	2,7	n. d.
Bock Royal Cuvee 2004	3,8	n. d.
Bock Pinot Noir 2005	3,7	n. d.
Bock Royal Cuvee 2005	3,0	n. d.
Bock Ermitage 2006	2,0	n. d.
Bock Kadarka 2005	1,4	0,1
Bock Capella Cuvee 2003	0,7	0,1
Bock Syrah 2004	2,7	0,7
Bock Cabernet Frank 2003	n. d.	n. d.
Bock Cabernet Franc 2004	1,7	n. d.
Polgar Pinot Noir 2004	2,9	2,0
Polgar Merlot 2004	3,8	2,6
Polgar Syrah 2005	5,1	2,8
Polgar Cabernet Franc 2004	2,7	0,7
Polgar Kekfrankos 2005	2,4	2,4
Polgar B. Cabernet Franc 2006	3,9	0,6
Polgar Cuvee 2005	3,6	1,5
Polgar Pinot Noir 2005	3,7	4,3
Polgar Merlot 2005	3,1	1,4
Polgar Cabernet Franc 2005	2,2	0,6
Egri Blau Burger 2007	2,5	3,7
Egri Kekfrankos 2007	2,2	1,1
Egri Bikaver 2007	1,0	n. d.
Egri Cabernet Franc 2007	0,4	0,2
Egri Cabernet Sauvignon 2007	0,5	0,5
Egri Merlot 2007	2,2	n. d.

4.1.1. Eredmények értékelése

Az adatokat átlagolva egyes évjáratok, borfajták, valamint a vizsgált három pincészet szerint, melyek összefoglalva 2.-4. táblázatokban tekinthetők át további következtetések vonhatóak le. A Villányi régióban a legalacsonyabb transz-rezveratrol és transz-piceid mennyiségeket a 2003-as évjáratú borokban találtuk, egy esetben pedig (Bock Cabernet Franc 2003) egyik komponenst sem sikerült detektálnunk. A fiatalabb évjáratokban kimutatható magasabb átlagos polifenol tartalom nagy valószínűséggel a vegyületek csekélyebb ideig tartó, a borok érésével és állásával összefüggő oxidatív destrukciójának köszönhető (Nikfardjam et al., 2006). Bizonyos években kiugró polifenol mennyiség mutatható ki borokban. Ez gyakran összefügg a tárgyévben megfigyelt kedvező klimatikus viszonyokkal, mely kiemelkedő mennyiségű és minőségű szőlő és bortermést hoz. Jól megfigyelhető, hogy azokban az években találunk viszonylag magas polifenol tartalmat a borokban, amelyek borászati szempontból is jó éveknek bizonyultak, magas hőmérséklet, és száraz klíma által meghatározva, különösen augusztusban és kora ősszel. Ezzel szemben azokban az években, amikor a késő nyári, kora őszi időszakok hűvösnek és csapadékosnak bizonyultak az adott évjáratú borok polifenol tartalma is alacsony értéknek adódott. Ennek oka a polifenolok UV stresszt gátló tulajdonságaiban keresendő, hiszen szintézisüket többek között a napos órák magasabb számával járó fokozott UV sugárzás is katalizálja. A csapadékos időjárás továbbá kedvez a szőlőnövények gombás, különösen a *Botrytis cinerea*-val való fertőződésének. A mikrobiális infekció, mint stressz faktor szintén kedvez ugyan a transz-rezveratrol szintézisének, de a szürkerothadás folyamatának előrehaladtával, a *Botrytis cinerea* stilbén oxidáz enzime a transz-rezveratrol destrukciójához vezet (Jeandet et al., 2004). A klimatikus faktorok tehát mind közvetlen, mind közvetett módon jelentős mértékben befolyásolhatják a borok transz-rezveratrol tartalmát. Mivel a 2003-as év nem volt ismert, mint az átlagosnál rosszabb szőlő és bortermő év amikor is alacsonyabb polifenol koncentrációkat várnánk, ezeket az eredményeket a komponensek érés során bekövetkező degradációjának tudhatjuk be. A 2004-es és a 2005-ös évek a villányi régióban megszokott 3-3.5 mg/l transz-rezveratrol mennyiségeket eredményezték, kiegészülve glikozidjának 1 mg/l átlagos koncentrációjával. A 2006-os év azonban borászati szempontból is sikeresnek volt mondható, ez tükröződik a vizsgált borok transz-rezveratrol tartalmában is, ez azonban jelentős mértékben köszönhető a Bock Cabernet Sauvignon (2006) vörösbor 10.4 mg/l értékének. Ha azonban ezt figyelmen kívül

hagyjuk, az átlagos értékek akkor is 4 mg/l-t adnak ki, ami a megszokottnál magasabb tartomány. A 2007-es évre vonatkozóan villányi tekintetben csekély számú minta (n=3) állt csak rendelkezésre ezért az ott tapasztalt 1,7 mg/l átlagos transz-rezveratrol koncentráció fenntartásokkal kezelendő. Szembetűnő ugyanakkor a transz-piceid magas átlagos koncentrációja (1,67 mg/l) de ez egyedül a Bock Kékfrankos (2007) esetében tapasztalt 4,4 mg/l-es értéknek köszönhető, ezt figyelmen kívül hagyva az átlagértékek 0,5 mg/l-nek adódnának. Mivel az Egri bortermő régióból egy kivétellel (Egri bikavér 2006) csak 2007-es évjáratú borok álltak rendelkezésre, a 2007-es egri borokat külön választottuk a táblázatban. Az eredmények részleteire a három pincészet összehasonlításánál térünk ki.

2. táblázat A vizsgált évjáratok átlagos transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának összehasonlítása. A 2007-es évjárat borait különválasztottuk az egri és a villányi mintáknak megfelelően.

	t-rezveratrol mg/l	t-piceid mg/l
2003 (n=6)	1,65±1,32	0,29±0,73
2004 (n=8)	3,29±1,12	0,75±1,02
2005 (n=13)	3,21±0,93	1,16±1,39
2006 (n=6)	4,95±3,27	0,72±0,97
2007 (Villány n=3)	1,7±0,42	1,67±2,38
2007 (Eger n=6)	1,47±0,94	0,92±1,42

Az egyes borfajtákat összehasonlítva egymással az átlagos transz-rezveratrol tartalom tekintetében a Merlot (4,1 mg/l) és a Cabernet Sauvignon (4,4 mg/l) fajták emelendők ki, bár a bennük található transz-piceid mennyisége ezzel a következetéssel nem feltétlenül korrelál (0,6 mg/l a Cabernet Sauvignon fajták esetében). A transz-rezveratrol koncentrációját tekintve kiemelendők továbbá a Syrah (3,7 mg/l) és a Pinot Noir (3,4 mg/l) fajták is. Ha egy hosszabb időtávon, az 1996-os évig visszamenve vizsgáljuk meg az egyes borfajták transz-rezveratrol tartalmát hasonlóan a Merlot, a Cabernet Sauvignon és Pinot Noir fajtákban találunk kiemelkedő értékeket. A különféle borok házasításával nyert Cuvée-k (2,8 mg/l) és a Kékfrankos fajták (2,5 mg/l) közepes

koncentrációtartományt képviselnek, míg az előbbieknél könnyedebb karakterű Portugieser és Kadarka fajták a skála alján helyezkednek el (1,4 mg/l). A glikozid mennyisége szintén a testesebb fajtákban magasabb, azonban pontos korrelációt a transz-rezveratrollal nem figyeltünk meg. Kiemelkedő a Pinot Noir (2,1 mg/l) és a Kékfrankos (2,2 mg/l) fajták transz-piceid tartalma, míg a Portugieser és a Kadarka fajták ebben a tekintetben is a koncentráció tartomány alján helyezkednek el (0,1 mg/l). A Syrah és a Merlot fajták transz-piceid tartalma az első két fajtához képest nem kiemelkedő, de még mindig jelentősnek mondható (1,8 mg/l és 1,6 mg/l). Érdekes megfigyelni, hogy az egyébként transz-rezveratrolban gazdagnak mondható Cabernet Sauvignon és Franc fajtákban a transz-piceid előfordulása rendkívül csekély (0,45 mg/l és 0,3 mg/l). Mivel ez mind a három pincészet borai esetében megfigyelhető valószínűleg az ok a szőlőfajták jellegzetességeiben keresendő, nem technológiai különbségekben. A transz-rezveratrolban gazdag Merlot fajták transz-piceid tartalmához viszonyítva irodalmi adatok alapján is hasonlóan alakult a Cabernet fajták transz-piceid tartalma (Lee et al., 2007). A Cuvée-k esetében tapasztalt 1,5 mg/l érték átlagosnak mondható más Villányi borfajtákkal összehasonlítva.

3. táblázat Az egyes vizsgált borfajták átlagos transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának összehasonlítása.

	t-rezveratrol mg/l	t-piceid mg/l
Cuvée (<i>n</i> =8)	2,8±0,9	1,5
Kékfrankos (<i>n</i> =6)	2,5±0,6	2,2±1,6
Cabernet Franc (<i>n</i> =8)	2,7±1,4	0,3±0,3
Cabernet Sauvignon (<i>n</i> =4)	4,4±4,6	0,4±0,6
Pinot Noir (<i>n</i> =4)	3,4±0,5	2,1±2,2
Syrah (<i>n</i> =3)	3,7±1,2	1,8±1,1
Merlot (<i>n</i> =4)	4,1±2,2	1,6±1,2
Portugieser (<i>n</i> =1)	1,4	0,1
Kadarka (<i>n</i> =1)	1,4	0,1

A pincészeteket összehasonlítva egymással, a két villányi pincészet között számottevő különbség nem látszik boraik transz-rezveratrol tartalmában, és bár egyes kiemelkedő értékeket megfigyelhetünk, az adatok átlagolását követően hasonló nagyságrendeket kapunk. A Bock pincészet esetében tehát az átlagos transz-rezveratrol tartalom 3,2 mg/l-nek a Polgár pincészet esetében pedig 3,34 mg/l-nek adódik. A transz-piceid mennyiségét illetően a Polgár pincészet előnye látszik 1,89 mg/l kontra 0,52 mg/l átlagos transz-piceid tartalom mellett. Mivel ez a magasabb átlagérték több borfajtának is köszönhető, technológiai különbségeket sejtethetünk a háttérben.

Az Egri Korona Borház esetében láthatjuk, hogy a hűvösebb és csapadékosabb klímájú egri bortermő régióban alacsonyabb átlagos transz-rezveratrol koncentrációval találkoztunk (1,47 mg/l), azonban a transz-piceid átlagos mennyisége (0,92 mg/l) nem bizonyult egyértelműen alacsonynak, mely azonban egy kiugró értéknek (Egri Blau Burger 2007 3,6 mg/l) köszönhető. Ezt figyelmen kívül hagyva az átlagértéket 0,36 mg/l-nek határozhatjuk meg, ami láthatóan alacsonyabb a villányi borok estében mért értékeknél. Ennek okaként klimatikus tényezőket valószínűsíthetünk mivel Villány Magyarország déli részén található, ahol a klíma országos viszonylatban is meleg, a csapadék mennyisége pedig alacsony. Eger ugyanakkor az Északi-középhegység régiójában található, itt a klíma hűvösebb és csapadékosabb is.

Miután a vörösbor kitűnő forrása a transz-rezveratrol mellett annak glikozidjának is, a vörösborokban, vagy esetleg egyéb élelmiszertermékekben történő pontos mennyiségi előfordulásuk táplálkozástudományi szempontból fontos kérdés. Összefoglalva eredményeinket okunk van feltételezni, hogy a bortípuson, és a borkészítési technológián kívül a közvetlen és közvetett klimatikus faktoroknak is szerepe van abban, hogy az egyes borokban milyen mennyiségben lesz a transz-rezvertarol és annak glikozidja megtalálható. Azt azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a borok érése és állása során számos kémiai változások érinthetik a borokat, esetenként hátrányosan érintve a borok polifenol profiljának megőrzését és meghatározhatóságát.

4. táblázat Az egyes pincészetek által előállított borok átlagos transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának összehasonlítása.

	t-rezveratrol mg/l	t-piceid mg/l
Bock (<i>n</i> =27)	3,2±2,14	0,52±1,06
Polgár (<i>n</i> =10)	3,34±0,86	1,89±1,18
Korona Borház (<i>n</i> =6)	1,47±0,94	0,92±1,42

4.2. Transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciója

HPLC analízis UV diódasor segítségével

A transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakciójának nyomon követéséhez, egy fordított fázisú folyadékkromatográfiás rendszert használtunk kiegészítve MS és tandem MS detektálással.

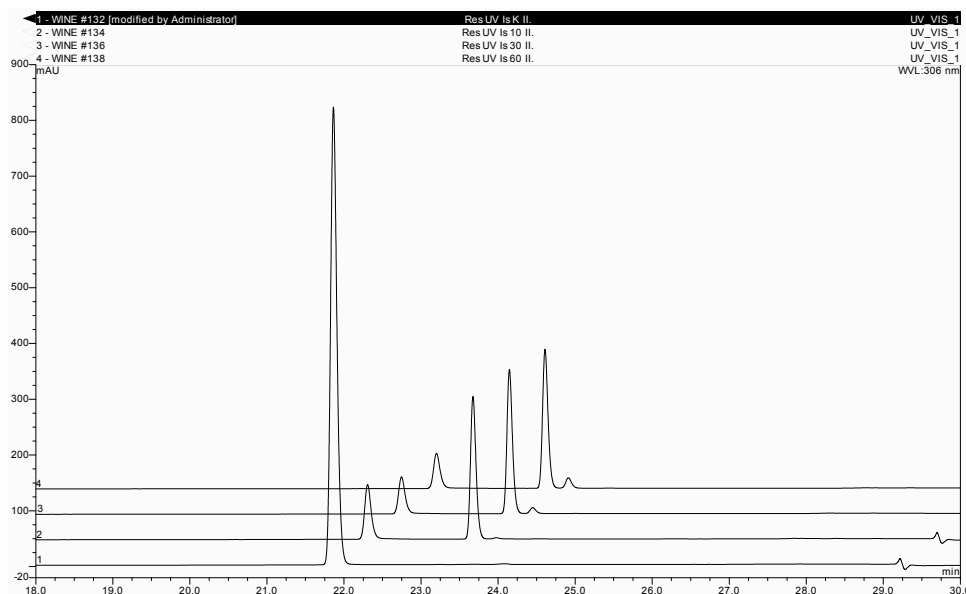
A kontroll mérés során a 0,05 mg/ml koncentrációjú törzsoldatból 100 µL térfogatot vettünk ki, melynek HPLC analízise során mindössze egy csúcsot detektáltunk, mely 21,9 percnél eluálódott. Az abszorpciós spektrum és a retenciós idő alapján ez a csúcs a transz-rezveratrol molekulának felelt meg.

A továbbiakban a törzsoldatból 1 ml térfogatot vettünk ki Eppendorf csőbe, majd 365 nm hullámhosszú UV fénnel sugároztuk be, tíz centiméter távolságból, elsötétített helyiségben. Az oldatból az első 100 µL térfogatú mintát 10 perc besugárzást követően vettük ki HPLC analízis céljaira. A tíz perc besugárzást követően vett mintában egy második csúcs is megfigyelhetővé vált a kromatogramon 23,2 percnél, ezt a retenciós idő és az abszorpciós spektrum alapján cisz-rezveratrolként azonosítottuk. Ezzel egyidejűleg a transz-rezveratrol csúcsának jelentős csökkenését figyelhattuk meg, az irodalomból már ismert fotoizomerizációs reakció eredményeképp.

A cisz-rezveratrolt reprezentáló csúcs mögött továbbá megjelent egy alacsony intenzitású harmadik csúcs is, 23,5 percnél. Ez a csúcs nem volt megtalálható a kontroll mintában, így egyértelműen a reakció termékeként azonosítható. Ez szintén egyezést mutat aktuális irodalmi adatokkal (Hanzlíková et al., 2004, Vinas et al., 2000), ahol is a cisz-rezveratrol mellett, egyéb nem azonosított reakciótermékek keletkezéséről számoltak be.

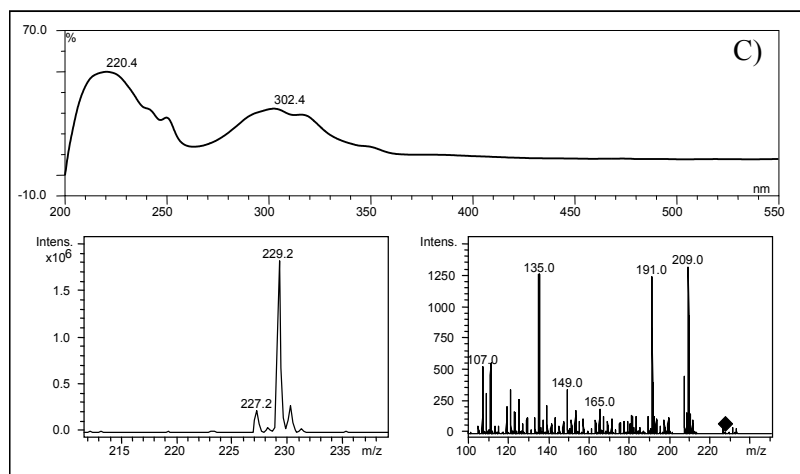
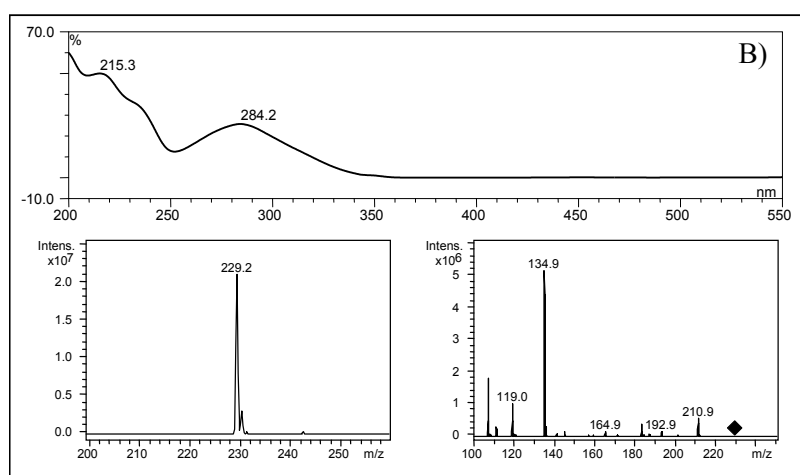
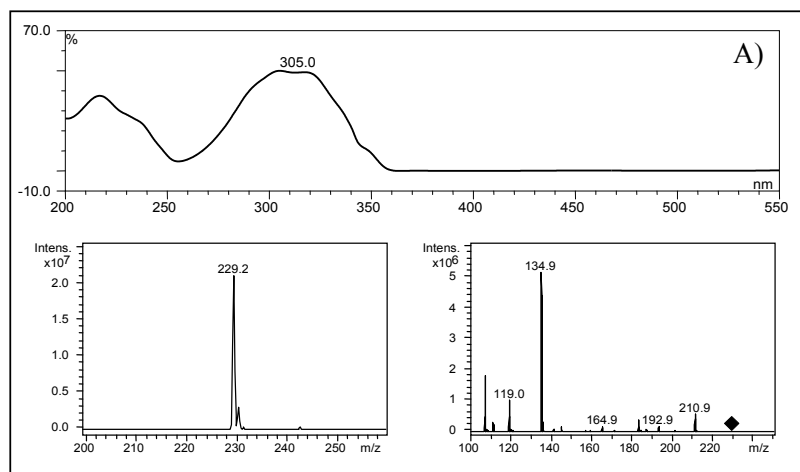
Tíz perc expozíciót követően harminc és hatvan perc besugárzás után is 100-100 µL mintát vettünk a besugárzott oldatból. A harminc percen és az egy órán át besugárzott mintákban is növekedett az eddig ismeretlen, harmadik komponens intenzitása bizonyítva, hogy a fotoizomerizációs reakcióban nem a cisz-rezveratrol az egyetlen keletkező termék. A vizsgált időintervallumon belül a transz-rezveratrol mennyisége tovább csökkent az eltelt idő függvényében, mintegy további 10%-al a kiindulási mennyiséghez képest. Ezzel párhuzamosan azonban a cisz-rezveratrol mennyisége nem növekedett tovább látható módon, a 10 percig besugárzott mintában is hasonló mennyiségben volt megtalálható. A cisz-rezveratrol mennyiségének stagnálásával szemben azonban, az ismeretlen komponens mennyisége jelentős mértékben növekedett. Egy óra elteltével, a 10 perc után

keletkezett mennyiség mintegy tízszeresét sikerült kimutatni. Az ismeretlen vegyület maximális koncentrációját az egy órán át besugárzott mintában érte el (11. ábra). Mivel az ismeretlen komponens mennyiségének növekedése nem járt együtt a cisz-rezveratrol mennyiségének csökkenésével, ugyanakkor a transz-rezveratrol koncentrációja ezzel párhuzamosan folyamatosan csökkent, azt feltételezhetjük, hogy a kérdéses anyag a transz-rezveratrol molekulából („E” stilbén szerkezetből) keletkezik.



11. ábra Transz-rezveratrol oldat összetételének változása UV sugárzás hatására.

Az öt órán át besugárzott oldatban nem mutattunk ki semmilyen új komponenst. Az egyetlen érzékelhető változás mind a három csúcs intenzitásának csökkenése volt. A változás legszembevetőbbben a cisz-rezveratrol (27%), és az azonosítatlan, eddig még nem ismert komponens esetében (50%) jelentkezett. Ezen kísérletes körülmények között a cisz-rezveratrol visszaalakulását transz-rezveratrollá nem figyeltük meg.



12. ábra A transz-rezveratrol (A), a cisz-rezveratrol (B) és az ismeretlen komponens (C) abszorpció, MS és MSMS spektruma.

Az abszorpciós spektrumok és retenciós idők alapján a cisz és a transz-rezveratrolt egyértelműen sikerült azonosítani irodalmi adatokkal összehasonlítva (Vicinelli et al., 2004). Az ismeretlen komponens abszorpciós maximuma és abszorpciós spektruma nagyon hasonló volt a transz-rezveratroléhoz (12. ábra). A transz-rezveratrol struktúra két egymástól jól elkülönülő abszorpciós maximummal rendelkezik 220 nm-nél, és 306 nm-nél, a kettő közül az intenzívebb elnyelés 306 nm-en figyelhető meg. Az új komponens esetében szintén látható ez a két maximum enyhe spektrális eltolódásokkal, különbséget inkább az egyes hullámhossz értékekhez tartozó elnyelések intenzitásában látunk. Az abszorpciós maximumok elhelyezkedése 220 nm és 302 nm-nél található, azonban 220 nm-es hullámhossz értéknél jelentősebb elnyelés figyelhető meg, mint 302 nm-nél. Ennél szembetűnőbb különbség a 220 nm-en lévő abszorpciós csúcsra szuperponálódó abszorpciós csúcs, mely 250 nm-nél látható és intenzitása megközelíti a 302 nm-nél látható mértéket.

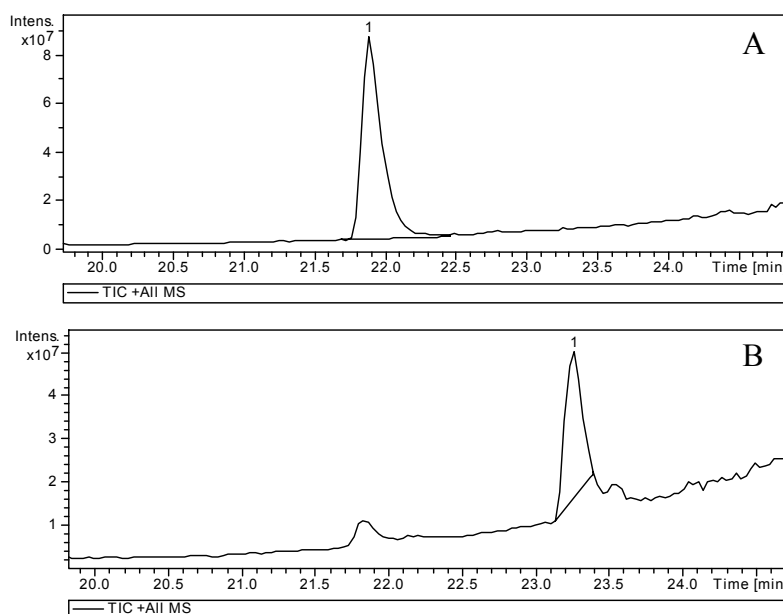
Az eddigi vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy az irodalomból jól ismert transz-rezveratrol fotoizomerizációs reakció során nem kizárólagosan cisz-rezveratrol keletkezik, hanem egy további komponens is. Ez a komponens egyértelműen a transz-rezveratrol molekulából keletkezik, hiszen mennyiségének növekedése együtt járt a transz-rezveratrol koncentrációjának csökkenésével, ugyanakkor a cisz-rezveratrol mennyisége az elegyben nem változott. Az ismeretlen molekula abszorpciós spektruma továbbá jelentős hasonlóságot mutat a transz-rezveratrol abszorpciós spektrumával is.

APCI MS vizsgálat

A komponensek tömegspektrometriás detektálását pozitív polaritású APCI ionizációval oldottuk meg. Az analitikai HPLC oszlopon történő elválasztást követően a komponensek keverékét tartalmazó eluensáram 1/3-ad részét egy microsplitter szelep segítségével vezettük a tömegspektrométer ionforrásába. Az ionforrást elhagyó komponenseket pozitív töltésű kvázimolekuláris ionként $[M+H]^+$ detektáltuk ahol is a mintában található molekulák egy proton segítségével ionizálódnak, az APCI ionforrás működési elvére jellemzően.

A kontroll mintában egyedül a transz-rezveratrolt találtuk 229,2 m/z -nél. A csúcsot izotópjaira felbontva két további, alacsonyabb intenzitású csúcs is látszott a transz-rezveratrol molekula izotópfelhasadására jellemzően, 230,2 m/z -nél és 231,2 m/z -nél a

szén izotópjait (C13 és C14) képviselve (12. ábra). A tömegspektrumhoz tartozó totál ion kromatogramon (TIC) szintén csak egy komponens volt kimutatható. (13. Ábra)



13. ábra A kontroll (A) és a 60 percen át besugárzott (B) minta totál ion kromatogramja (TIC). A kontroll mintában csak a transz-rezveratrol jelenléte látszik, a besugárzást követően két további csúcs: 23.2 percnél a cisz-rezveratrol 23.5 percnél pedig az ismeretlen komponens figyelhető meg.

A tíz perc UV fénnel történő besugárzást követően kivett mintában már három komponens volt jelen. A TIC alapján, hasonlóan az UV kromatogramhoz jól azonosítható volt a transz-rezveratrol mellett a cisz-rezveratrol molekula is, sőt azt követően megjelent a harmadik komponenst reprezentáló csúcs is. A cisz-rezveratrol tömegspektruma a transz-rezveratrollal megegyezően alakult, mivel nincs különbség a két molekula tömegében, csak térszerkezetükben. 229,2 m/z értéknél található a kvázimolekuláris ion, mely után az izotópfelhasadásból adódó csúcsok, 230,2 m/z -nél és 231,2 m/z -nél láthatók (12. ábra).

Szemben a transz- és a cisz-rezveratrol 229,2 m/z értékével a harmadik komponenst 227,2 m/z értéknél detektáltuk. A tömegspektrumban látható a cisz-rezveratrolra jellemző 229,2 m/z tömeg is, ennek oka, hogy a harmadik komponens retenciós ideje mindössze húsz másodperccel több, mint a cisz-rezveratrolé. Az alkalmazott LC-MS körülmények között ez a húsz másodperc nem volt elég arra, hogy a cisz-rezveratrol teljes mértékben távozzon az ionforrásból. Továbbá az azonosítatlan komponens mennyisége a

reakcióelegyben rendkívül csekély a cisz-rezveratrol mennyiségéhez képest, mivel csak kis százalékban keletkezik a fotoizomerizáció folyamata során. A harmadik komponens LC-MS tömegspektrumán megfigyelt kontaminációért tehát ez a két hatás felelős.

Megfigyelhető volt továbbá a 227,2 m/z értékű csúcs izotópfelhasadása is, 228,2 m/z és 229,2 m/z értéknél, bár ez utóbbi már nem válik el a cisz-rezveratrol kvázimolekuláris ionjának csúcsától, mely szintén 229,2 m/z-nél található.

A TIC alapján nyomon követhető volt a harmadik komponens mennyiségének növekedése is az eltelt besugárzási idő függvényében. A megfigyelések egyeztek a HPLC analízis esetében leírtakkal, a harmadik komponenshez a TIC-en tartozó csúcs területe a besugárzott időtartam függvényében növekszik, maximumát egy óra besugárzást követően éri el.

A transz- és a cisz-rezveratrol ismert molekulatömege 228,2 Da. Mivel a komponenseket pozitív töltésű kvázimolekuláris ionként $[M+H]^+$ detektáltuk a 229,2 m/z érték pontosan ennek felel meg. Mivel a mérési körülmények és az ionizáció folyamata állandóak voltak a harmadik, azonosítatlan komponens molekulatömege 226,2 Da-ban adható meg. Ez a két Da különbség a rezveratrol molekula szerkezeti képletének ismeretében két hidrogénnek felelhet meg. A két hidrogén hiányozhat a fenolos OH csoportokból, elveszhet a molekula közepén található kettős kötés átrendeződéskor, valamint az egyik, vagy mind a kettő fenolos gyűrű felnyílásával. A két hiányzó hidrogén helyének meghatározása az azonosítatlan komponens molekuláris szerkezetének a rezveratrol molekuláris szerkezetével történő összehasonlításával határozható meg, melyet tandem tömegspektrometria segítségével valósítottunk meg.

APCI MS/MS vizsgálat

A tandem tömegspektrometriás mérés első lépése a fragmentációra kiválasztott tömegek meghatározása volt, mely a transz-rezveratrol 229,2 m/z értékű, a cisz-rezveratrol szintén 229,2 m/z értékű, és az ismeretlen harmadik komponens 227,2 m/z értékű tömegeit jelentette. Annak érdekében, hogy az egyes tandem (MS/MS) tömegspektrumok ne tartalmazzák több vegyület frgmenteit is, a mérést megelőzően frakciókat gyűjtöttünk HPLC elválasztás segítségével az egyes komponensekből. A három komponens tartalmazó frakciókat direkt MS/MS eljárással mértük le, az eredményeket irodalmi adatokkal hasonlítottuk össze. A transz-rezveratrol fragmentációja

során keletkezett jelentősebb, és irodalomból is ismert fragmens ionokat 210,9 m/z, 192,9 m/z, 182,9 m/z, 134,9 m/z, és 119,0 m/z értékeknél figyeltük meg (Montoro et al., 2004). A 210,9 m/z, és 192,9 m/z értéknél látható fragmentek víz kilépésével és fenolos hidroxilcsoportok elvesztésével keletkeznek. Ez a vízkilépés megtörténhet egyrészt az „A” gyűrű fenolos hidroxilcsoportjánál vagy a „B” gyűrű egyik fenolos hidroxilcsoportjánál. Mindkét lehetőség eredményét 210,9 m/z értéknél látnánk. A 192,9 m/z értékű fragmens ion pedig abban az esetben keletkezhet, ha két vízkilépés is történik egyrészt az „A” gyűrű fenolos hidroxilcsoportjánál másrészt a „B” gyűrű egyik fenolos hidroxilcsoportjánál. A másik lehetőség a két vízkilépésre a „B” gyűrű mindkét fenolos OH csoportjánál van, ekkor azonban a „B” gyűrű felnyílása fordulhat elő. Ebben az esetben a gyűrű felnyílásának helyén egy szén atom leválhat a keletkezett fragmens pedig 182,9 m/z értéknél jelenik meg. Mivel ez a fragmens még tartalmaz egy darab fenolos hidroxilcsoportot, itt is lehetőség van víz kilépésére, mely folyamat eredménye a 164,9 m/z-nél látható csúcs. Ugyanakkor azonban, mivel olyan fragmentációs mintázatot, amely az intakt stilbén struktúrából történő háromszoros vízkilépéssel keletkezne sem mi nem detektáltunk, sem pedig az irodalomban nem írtak le feltételezhetjük, hogy a „B” gyűrűben történő kettős vízkilépés a gyűrű említett módon történő felbomlásával jár (14. ábra).

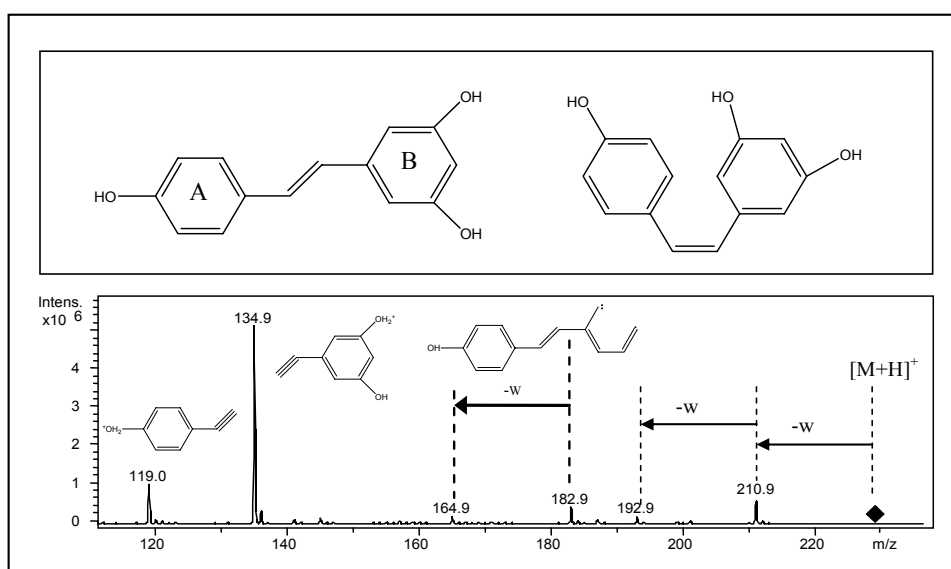
A 134,9 és 119,0 m/z értéknél látható fragmentek a rezveratrol molekula kettéhasadásával keletkeznek. Mind a két fragmens tartalmaz egy-egy fenolos gyűrűt, és egy rövid alkiláncot a rezveratrol molekula centrális alkiláncából. A 134,9 m/z értéknél detektálható fragment a rezveratrol molekula „B” gyűrűjét tartalmazza, két fenolos hidroxilcsoporttal, míg a 119,0 m/z értékű fragment az „A” gyűrűt, egy darab fenolos OH-val.

A cisz-rezveratrol fragmentációs mintázata mindenben megfelelt a fentieknek, a jelentősebb fragmensek ebben az esetben is megtalálhatók voltak. Az eltérő sztereoizoméria okán tehát, nem találtunk eltérést a két molekula fragmentációjában.

A 226,2 Da (227,2 m/z) tömeg MS/MS analízise is hasonló mintázatot adott, mint a rezveratrol molekula esetében. A korábban azonosított fragmenteket az ismeretlen komponens fragmentációja során is sikeresen detektáltuk, de ezek tömege azonban részben eltérő volt. A 119 m/z, 134,9 m/z, 164,9 m/z, és 182,9 m/z értékeknél detektált fragmentek nem változtak, a vízkilépéssel keletkezett fragmentek azonban igen. A 210,9 m/z és 192,9 m/z értékeknél látható fragmens ionokat az intakt molekulához hasonlóan 2 Da-al kevesebb tömegűként detektáltuk, mint a transz-, vagy a cisz-rezveratrol molekula

esetében. Ezt a két, vízkilépéssel keletkezett fragmentet 209 m/z és 191 m/z értékeknél detektáltuk.

A tandem MS vizsgálatok eredményei alapján azt a megállapítást tehetjük, hogy az MS vizsgálat során megállapított -2Da tömegkülönbség akkor is látszik, ha egy, vagy két vízkilépés történik az ismeretlen komponens szerkezetéből. Azonban abban az esetben, ha a stilbén struktúra törése a két fenolos gyűrűt összekötő alkilláncban következik be (119 m/z és 134,9 m/z értékű fragment ionok), ez a -2Da tömegkülönbség nem mutatható ki. Összefoglalva megállapítható, hogy az ismeretlen komponens esetében tapasztalt, rezveratrolhoz viszonyított -2 Da tömegkülönbség az MS/MS fragmentációt követően is kimutatható, bár kizárólag a vízkilépéssel keletkezett fragmentek esetében.



14. ábra Mindhárom komponens (transz-rezveratrol, cisz-rezveratrol, ismeretlen) esetében megfigyelt fragsmens ionok összefoglalása.

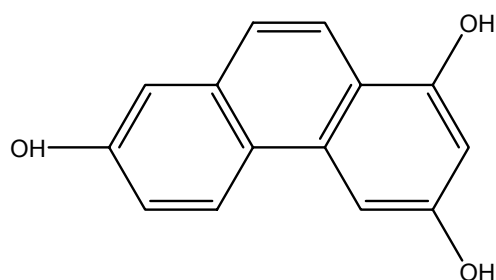
4.2.1. Az eredmények értékelése

A 226,2 Da tömegű ismeretlen komponens esetében a két dalton különbség feltételezhetően két hidrogén hiányával keletkezik. A besugárzás legegyszerűbb következménye valamilyen destruktív hatás lehetne, mely a fenolos gyűrűk felnyílásával jár, magyarázatot adva két hidrogénnek megfelelő tömegvesztésre is. Ebben az esetben szembetűnő lenne az abszorpciós spektrum jelentős mértékű megváltozása, a fenolos gyűrűkre jellemző delokalizált elektronszerkezet felbomlása miatt. Az abszorpciós spektrumban ugyanakkor ilyen változást nem figyeltünk meg, az ismeretlen komponens abszorpciós spektruma nagy hasonlóságot mutatott a transz-rezveratroléval. Ezt a lehetőséget a tandem tömegspektrometriás vizsgálatok eredményei sem támasztják alá, mivel a 119 m/z és a 139,9 m/z értékeknél detektált fragmentek tömegében, melyek tartalmazzak egy-egy fenolos gyűrűt, nem tapasztaltunk változást. Ha a -2Da tömegkülönbséget a fenolos gyűrűk felnyílása okozta volna, az mind a két fragmens tömegében jelentkezett volna.

Másik lehetőség, hogy a két hidrogén egy oxidációs folyamat során vált le. A rezveratrol molekulán belül két helyen van lehetőség oxidációra, az egyik a fenolos hidroxilcsoportoknál, a másik a molekula közepén található kettős kötésnél. Az oxidáció folyamata a fenolos hidroxilcsoportoknál keton szerkezethez vezethet, a molekula közepén található alkilláncnál pedig egy hármas kötés alakulhat ki, hasonlóan az acetilén molekulához. Egy harmadik lehetőség pedig a stilbén struktúrákra jellemző fotociklizációs reakció, mely gyűrűzáródással fenantrén származék képződéséhez vezet.

A hidroxilcsoportok ketonná történő oxidációját kizárhatjuk, mivel az abszorpciós spektrumokban jelentős eltérést nem tapasztaltunk, holott ez a reakció a fenolos gyűrű elektronszerkezetének átrendeződésével jár. Az MS/MS vizsgálatok is kizárták ennek lehetőségét, mert ebben az esetben nem látnánk mind a két vízkilépéssel keletkező fragmentet (209,0 m/z és 191,0 m/z), az ismeretlen komponens esetében is, hiszen az oxocsoportokból víz kilépése nem valósulhat meg. A harmadik tényező, mely ellentmond a hidroxilcsoportok oxidációjának, a rezveratrol molekula kémiai szerkezetében keresendő. A rezveratrol molekulában a három fenolos hidroxilcsoport közül egy az „A” gyűrűn orto, kettő pedig a „B” gyűrűn meta pozíciókban helyezkedik el (14. Ábra). Két oxidációs folyamat, a fenolos hidroxilcsoportoknál tehát, mindenképpen érintené legalább az egyik meta pozíciójú hidroxilcsoportot. A fenolos hidroxilcsoportok meta pozícióban történő oxidációja azonban nem lehetséges.

A harmadik valószínű lehetőség egy fenantrén származék keletkezése, mely az irodalmi adatok (Vicinelli et al., 2004) alapján potenciális reakcióterméke a cisz-stilbének fotociklizációjának. A transz-rezveratrol, mely kémiaiilag az „E” stilbén szerkezetnek felel meg a fotoizomerizáció folyamata során cisz-rezveratrollá („Z” stilbén) alakulhat át, ez pedig gyűrűzáródással fenantrén (2,5',7-trihidroxi-fenantrén) származékká (15. ábra). Ez a reakció a fenantrén és származékainak szintézisének is használatos.



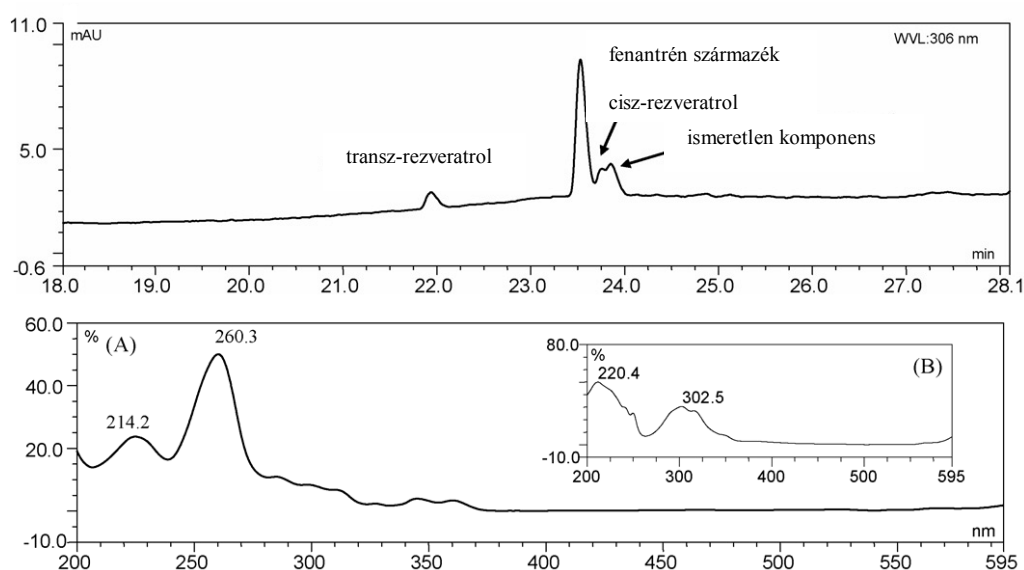
15. ábra Az „Z” stilbénekre, így a cisz-rezveratrolra is jellemző fotociklizációs reakció terméke.

A cisz-/transz izomerizáció folyamatához elég mindössze 10 perc UV besugárzás 313 nm-en, a fenantrén szerkezet kialakulása hasonló kísérletes körülmények között ugyanakkor két óra besugárzást követően várható. Mivel ennek a fotociklizációs reakciónak a körülményei adottak voltak, ezt a lehetőséget kísérletes körülmények között is megvizsgáltuk.

Kromatográfiás frakciógyűjtéssel egy olyan oldatot állítottunk elő mely nagy mennyiségben tartalmazta a cisz-rezveratrol mellett a transz-rezveratrolt, és az ismeretlen komponenst is. A keveréket az irodalomban leírt körülmények között 312 nm hullámhosszúságú UV fénnel sugároztuk be mintegy két órán keresztül. A változásokat az anyagok és módszerekben leírt HPLC elválasztás segítségével vizsgáltuk meg.

A keverék HPLC analízise során két óra besugárzást követően, a cisz-rezveratrol jelentős mértékű fogyását tapasztaltuk a kiindulási állapothoz képest, ugyanakkor a transz-rezveratrol mennyisége nem csökkent. Ez a megfigyelés szemben áll a 365 nm-es besugárzás esetében tapasztalt megfigyeléssel, miszerint az ismeretlen termék keletkezése inkább a transz-rezveratrol fogyásával jár, és már tíz perc besugárzást követően megfigyelhető. Detektáltunk a reakció eredményeképp, egy eddig még nem látott, negyedik komponenst is, mely 23,1 perc retenciós idővel eluálódott, közvetlenül megelőzve a cisz-rezveratrol csúcsát. Ezt a negyedik komponenst kizárólag legalább két órára, 313 nm-es UV besugárzást követően figyelhetjük meg. Ez a termék egyértelműen a cisz-rezveratrolból keletkezik, valamint az ismeretlen komponensből teljes mértékben

eltérő abszorpciós spektrummal jellemezhető 214 nm és 260 nm-nél található abszorpciós maximumokkal. Az abszorpciós spektrum irodalmi adatok alapján megfelel a várt fenatrén származéknak. Mivel a fenatrén származék retenciós ideje mellett, annak abszorpciós spektruma sem egyezett meg az ismeretlen komponenssel, kizárhatjuk, hogy az egy fotociklizációval keletkezett fenatrén termék. Ezt erősíti meg az a megállapítás is, hogy az ismeretlen komponenst már 10 perc besugárzást követően detektáltuk, holott a fotociklizációs reakció folyamatához legalább két óra besugárzás volt szükséges (16. ábra).



16. ábra A fotociklizációs reakció eredménye (HPLC analízis). A reakcióelegy a transz-, a cisz-reszveratrolt és az ismeretlen komponenst is tartalmazza. A reakció során keletkezett komponens retenciós ideje és abszorpciós spektruma (A) eltérő az ismeretlen komponenshez (B) képest.

A fotociklizációs reakció elvetésével, a másik lehetőség az oxidációra a rezveratrol molekulán belül, a két fenolos gyűrűt összekötő alkilánc kettős kötésénél van, mely reakció egy hármas kötést eredményez. Ezt a lehetőséget a tandem MS vizsgálatok eredményei is megerősítik. Az ismeretlen komponens esetében is megfigyelt két vízkilépésre (191 m/z és 209 m/z) csak akkor van lehetőség, ha az oxidáció a stilbén molekula centrális alkiláncában következik be. Látható az is, hogy a centrális alkiláncban bekövetkezett töréssel keletkező fragmentek 119 m/z és 134,9 m/z értéknél változatlanul voltak jelen mind a transz- és cisz-reszveratrol, mind pedig a harmadik, ismeretlen komponens MS/MS spektrumában is. Ez azzal magyarázható, hogy a rezveratrol struktúra alkiláncban bekövetkező fragmentációja egy háromszoros kötés

kialakulásával jár mindkét fragment alkillánc felőli végénél (Montoro et al., 2004). Ez a fenantrén struktúrából kiindulva nem képzelhető el. Feltételezve ugyanakkor, hogy az azonosítatlan komponens már a fragmentáció folyamata előtt tartalmazta a háromszoros kötést a struktúra közepén, az eredmény megfelel a vártnak. Valószínűsíthető tehát, hogy az oxidáció az alkilláncban kialakuló háromszoros kovalens kötésen keresztül valósul meg. A fenantrénszármazék keletkezésének lehetőségét kontroll kísérlettel zártuk ki.

Szemiempirikus quantummechanikai számítások

Az általunk feltételezett szerkezet bizonyítását az új komponens abszorpciós spektruma alapján tettük meg. Ehhez szemiempirikus quantummechanikai számításokat végeztünk a Hyperchem 7.03 (Hypercube Inc., FL, USA) szoftver segítségével. A szoftver a kívánt molekula szerkezetének megrajzolása után térbeli molekulamodellt készít geometriai, és energetikai optimalizáció segítségével. A modell a továbbiakban felhasználható molekulák közti kölcsönhatások (docking) modellezése mellett, molekulák spektroszkópiai jellemzőinek (UV, IR abszorpció) meghatározására is.

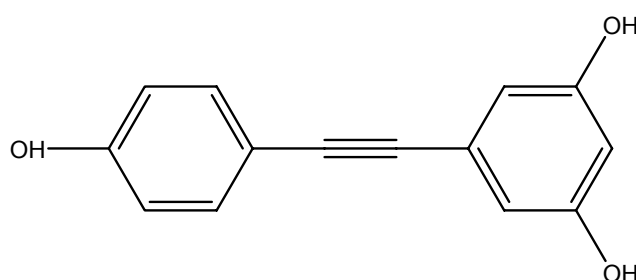
A szoftver által elvégzett számítások megbízhatóságát olyan vegyületek segítségével ellenőriztük le, melyek abszorpciós spektrumait magunk is megfigyeltük, illetve az irodalomból is ismertek voltak. A referencia vegyületek a transz-, és a cisz-rezveratrol, illetve a fotociklizációs reakció során keletkezett 2,5',7-trihidroxifenantrén molekulák voltak. A két rezveratrol izomer szoftver által számított abszorpciós maximumai, valamint a spektrumok lefutása igen jól egyezett a megfigyeltekkel. Az eredményeket az 5. táblázatban foglaltuk össze, a rezveratrol izomerek megfigyelt abszorpciós spektrumait a 12. ábra tartalmazza. A számításokat a fenantrén származék (2,5',7-trihidroxifenantrén) molekulára elvégezve, a Hyperchem szoftver által számított UV abszorpciós tulajdonságok szintén megegyeztek az irodalmi adatok alapján várt, valamint az általunk megfigyelt abszorpciós spektrumokkal. Itt a számítás két abszorpciós maximumot határozott meg 213 nm-nél és 263 nm-nél, melyek közül az intenzívebb elnyelés 263 nm-nél adható meg.

5. táblázat A Hypercem szoftver által számított és az általunk megfigyelt abszorpciós maximumok értékeinek összehasonlítása.

Megfigyelt	Számított
Transz-rezveratrol	
217.2	219.6
305.0	300.01
TDPA	
220.04	215.99
249.7	251.12
302.4	301.2
2,5',7-Trihidroxifenantrén	
214.2	213.0
260.3	263.6

Az acetilén származék esetében számított abszorpciós spektrum, feltételezve a centrálisan elhelyezkedő hármaskötést, szintén jól egyezett a megfigyelt spektrummal. A szoftveres modellezés három abszorpciós maximumot határozott meg (216 nm, 251 nm, és 301 nm), melyek közül a legnagyobb elnyelési intenzitás 216 nm-nél került meghatározásra. A megfigyelt abszorpciós maximumok 220, 249, és 302 nm-nél helyezkedtek el. A számított és a megfigyelt abszorpciós maximumok között a referencia vegyületek esetében is hasonló nagyságrendű eltérést figyeltünk meg.

A folyadékkromatográfiás, a tömegspektrometriás (MS, MS/MS) adatok, valamint az abszorpciós spektrumok alapján tehát megállapíthatjuk, hogy az ismeretlen harmadik komponens egy trifenil-acetilén származék, mely a transz-rezveratrolból keletkezik oxidatív úton. A folyamat során a transz-rezveratrol molekulában centrálisan elhelyezkedő kettős kötés hármaskötéssé alakul át. A terméket a hármaskötés, és a fenolos hidroxilcsoportok száma alapján 3,4',5-trihidroxidifenilacetilénnek (TDPA) neveztük el (17. ábra).



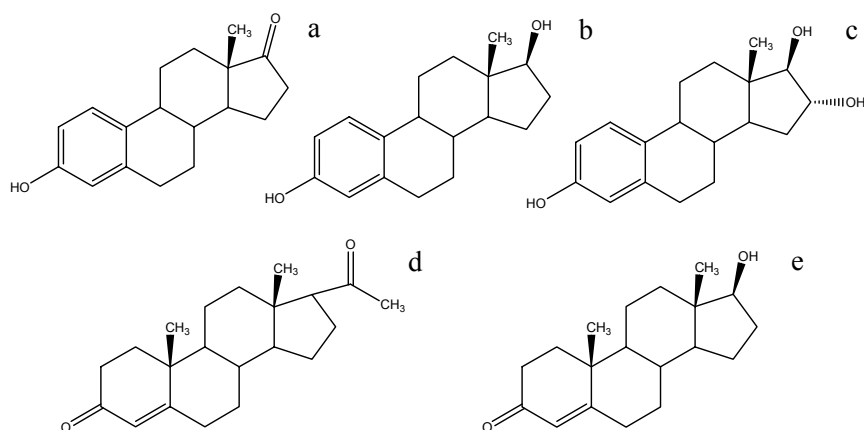
17. ábra Az azonosított 3,4',5-trihydroxy-difenilacetilén (TDPA) molekula szerkezeti képlete.

Eredményeink alapján továbbá azt is valószínűsítjük, hogy a bevezetőben említett szerzők (Hanzlíková, Hernández) által leírt két, *cisz*-rezveratrol mellett keletkező termék, is a fenantrén és az acetilén származékoknak felelhet meg. Hernández és munkatársai egy ismeretlen (*cisz*-rezveratrolból keletkező) komponens keletkezését figyelték meg 254 nm-es UV sugárzás hatására, melynek abszorpciós spektrumát is leírták. Ez pontosan a 2,5',7-trihidroxifenantrén molekula abszorpciós spektrumának felel meg. Hanzlíková és munkatársai ugyanakkor a *transz*-rezveratrol diffúz napfény hatására bekövetkező fotoizomerizációjának vizsgálata során két új komponens keletkezését is kimutatták. Mivel a napfény az UV spektrumot is tartalmazza mindkét (2,5',7-trihidroxifenantrén, 3,4',5-trihidroxidifenilacetilénnek) komponens keletkezésének feltételei adottak voltak.

4.3. Humán szexuálisztteroidok MALDI TOF tömegspektrometriás vizsgálata

Szexuálisztteroid hormonok MALDI TOF tömegspektrometriás kimutatása

A műszeres paraméterek beállítását és a megfelelő mátrix kiválasztását öt, gyakran előforduló szexuálisztteroid hormon standardjával végeztük el. A standardokat egy férfi, és négy női szexuálisztteroid hormonból állítottuk össze. A férfi hormonok közül az elsődleges androgén, a tesztoszteron, a női nemi hormonok közül pedig négy ösztrogén, az öszttron, öszttradiol és öszttriol, illetve egy progesztagén hormon, a progeszteron standardját használtuk fel. Az öt hormon szerkezeti képletét az 18. ábrán, összegképletüket az 6. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban az egyes hormonok monoizotópos tömegeit is feltüntettük.



18. ábra. Az öt vizsgált szexuálisztteroid szerkezeti képlete. a) öszttron, b) β -öszttradiol, c) öszttriol d) progeszteron és e) tesztoszteron.

A szerkezeti képletek alapján látható, hogy a standardsorhoz kiválasztott hormonok változatos funkciós csoportokat tartalmaznak a szterán alapvázon, melyek mind befolyásolhatják a tömegspektrometriás ionizáció folyamatát. Közös az öt hormonban, hogy metil-, oxo- és hidroxilcsoportokat tartalmaznak, ezek száma és elhelyezkedése a szteránvázon belül azonban eltérő. A tesztoszteron és a progeszteron két-két metilcsoportot tartalmaz a 10. és 13. szénatomon, a három ösztrogén pedig egyet-egyét a 13. szénatomon. Különbségek a tehát szteránvázon belül lévő kettős kötések mellett inkább az oxo- és hidroxilcsoportok száma és elhelyezkedése alapján vannak.

A mérések során az egyes hormonok tömegspektrumain a jel és zaj arányát, felbontást és a tömegpontosságot figyeltük az egyes műszerbeállítások függvényében. Valamennyi

mérést elvégeztük két fullerén mátrixszal (C_{70} , C_{60}), pozitív és negatív ionizációs módban is. A végleges, és legjobb eredményt adó MS beállításokat az anyagok és módszerek fejezetben foglaltuk össze.

Általában elmondható, hogy az ösztrogének kimutatása negatív ionizációs módban, míg a tesztoszteron és a progeszteron vizsgálata pozitív ionizációs módban volt sikeres. Ennek megfelelően az ösztrogénhormonok tömegspektrumait csak negatív, a tesztoszteron és a progeszteron tömegspektrumait pedig csak pozitív ionizációs módban mérve ábrázoltuk.

6. táblázat Az egyes hormonok összegképlete és monoizotópos tömegeik. A kimutatási határ ng-ban és pmol-ban kifejezve annál a koncentrációnál, amelynek jelintenzitása legalább a tömegspektrometriás zaj intenzitásának háromszorosa.

	Monoizotópos tömeg (Da)	Kimutatási határ (on plate ng)	Kimutatási határ (on plate pmol)
Ösztroon $C_{18}H_{22}O_2$	270,16	20	74
β -ösztradiol hemihidrát $C_{18}H_{24}O_2 \cdot 0.5H_2O$	281,18	11	39
Ösztroiol $C_{18}H_{24}O_3$	288,17	14	49
Progeszteron $C_{21}H_{30}O_2$	314,22	12	38
Tesztoszteron $C_{19}H_{28}O_2$	288,21	14	49

Szexualszteroidok MALDI TOF vizsgálata pozitív ionizációs módban C_{70} fullerén mátrixszal

A gyakrabban alkalmazott pozitív ionizációs módban az ösztroon, mely oxo (17. szénatom) és hidroxil (3. szénatom) csoportot is tartalmaz, pozitív töltésű kvázimolekuláris ionként $[M+H]^+$ detektálható 271,16 m/z értéknél. A mért tömeg a monoizotópos tömegnél (270,16 Da) 1 m/z értékkel nagyobb, mely az ionizációs folyamat során bekövetkező proton addíció eredménye. Ezt a MALDI ionforrás működésére jellemző folyamatot az összes pozitív ionizációs mérésnél megfigyeltük. Feltűnő volt azonban a tömegspektrumon, hogy a jel/zaj arány rendkívül alacsony volt. A pozitív ionizáció során kapott jel intenzitása nem haladta meg sokkal a zaj intenzitásának háromszorosát, sőt a hígítatlan, 0,1 mg/ml koncentrációjú törzsoldat is csak a kimutathatósági határ kritériumainak (Márk et al., 2006) megfelelő intenzitású jelet adott.

A tapasztalt jelenségre és az alacsony érzékenységre az ionizáció csekély hatásfoka adhat magyarázatot.

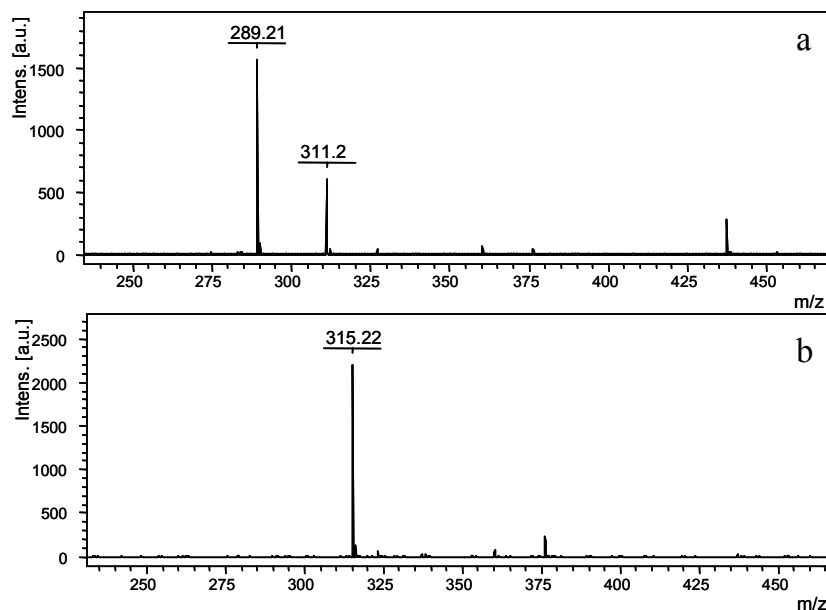
A 3. és a 17. szénatomokon, egy-egy hidroxilcsoportot tartalmazó β -ösztradiol (272,18 Da) esetében még alacsonyabb érzékenységet figyeltünk meg. Az β -ösztradiol hemihidrát standard formájában állt rendelkezésre, ennek monoizotópos tömege 281,18 Da. Az ionizáció során a hemihidrát egység leválását tapasztaltuk, a molekula kvázimolekuláris ionja $[M-0.5H_2O+H]^+$ 273,18 m/z-nél volt kimutatható. Itt a jel/zaj viszony az ösztroinnál is kedvezőtlenebb módon alakult, a β -ösztradiolt reprezentáló csúcs intenzitása egyik műszerbeállítás mellett sem haladta meg a zaj intenzitásának maximum kétszeresét.

A 3. 16. és 17. szénatomokon, összesen három hidroxilcsoportot tartalmazó ösztriol vizsgálata pozitív ionizációs módban pontosan az előbbihez hasonló eredményt adott. A jel maximális intenzitása itt sem haladta meg a zaj intenzitásának kétszeresét. A pozitív töltésű kvázimolekuláris iont 289,17 m/z értéknél figyeltük meg.

A pozitív ionizációs módban ugyanakkor, a tesztoszteron és a progeszteron vizsgálata is eredményes volt, a kimutatás során magas érzékenységet értünk el (6. táblázat). A három ösztrogénhez hasonlóan a progeszteront és az androgén tesztoszteront is pozitív töltésű kvázimolekuláris ionként $[M+H]^+$ detektáltuk egy proton addícióját követően. Szemben az ösztrogének pozitív ionizációs módú analízisével, az ionizáció hatásfoka és ezzel együtt a jel/zaj viszony és az érzékenység is megfelelő volt (6. táblázat).

A tesztoszteron az ösztroinhoz hasonlóan oxo- és hidroxilcsoportokat tartalmaz, azzal a különbséggel, hogy az oxocsoport a 3. míg a hidroxilcsoport a 17. szénatomon helyezkedik el. Monoizotópos tömege 288,21 Da, a kvázimolekuláris iont 289,21 m/z értéknél mutattuk ki. Egyedül a tesztoszteron vizsgálata során figyeltünk meg nátriummal alkotott addukt iont, $[M+Na]^+$ ezt 311,2 m/z értéknél detektáltuk. A tömegspektrum a 19a. ábrán látható.

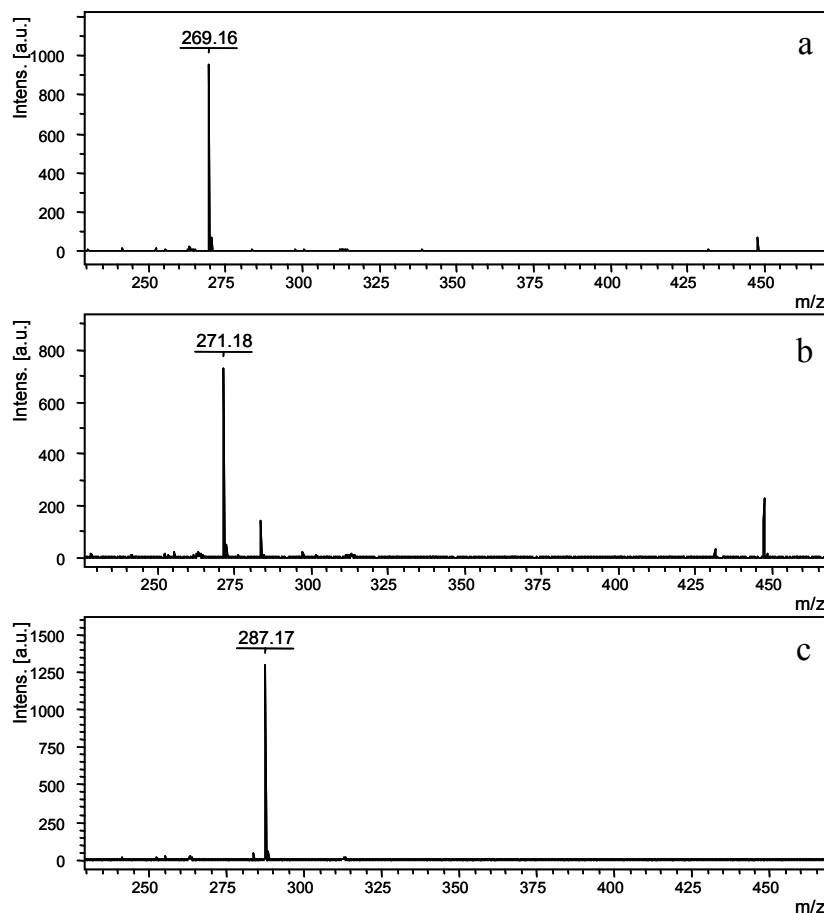
A 314,22 Da tömegű progeszteront, mely csak oxocsoportokat tartalmaz a 3. és a 20. szénatomon, a már ismert úton keletkező kvázimolekuláris ion alakjában $[M+H]^+$ mutattuk ki, 315,22 m/z értéknél. Az eredményt a 19b. ábra mutatja be.



19. ábra A tesztoszteron (a) és a progeszteron (b) pozitív ionizációs módú MALDI TOF tömegspektruma C_{70} fullerén mátrix alkalmazásával.

Szexualsteroidok MALDI TOF vizsgálata negatív ionizációs módban C_{70} fullerén mátrixszal

Szemben a pozitív ionizáció alkalmazásánál tapasztaltakkal a negatív polaritású ionizációs mód mind a három ösztrogén esetében jó eredményt adott. A hormonok tömegspektrumait a 20a, 20b és 20c ábrákon foglaltuk össze. A három hormont (ösztroon, β -ösztradiol, ösztriol) a negatív ionizációs módban negatív töltésű kvázimolekuláris ionként detektáltuk $[M-H]^-$, ekkor az egyes ionok tömegei 1 m/z értékkel adódnak kevesebbnek a hormonok monoizotópos tömegeinél. Itt a pozitív polaritású ionizációval ellentétben egy proton vesztese történik az ionizáció folyamata során. Hasonlóan a tesztoszteron és a progeszteron pozitív ionizációs módú vizsgálatához, a detektált jel intenzitása valamennyi esetben jelentősen meghaladta a zaj intenzitását.



20. ábra Az ösztрон (a) a β -ösztradiol (b) és az ösztриol (c) negatív ionizációs módú MALDI TOF tömegspektruma C_{70} fullerén matrix alkalmazásával.

Az ösztрон negatív polaritású ionizációja során a 270,16 Da monoizotópos tömegű molekulát 269,16 m/z értéknél detektáltuk. Ez a negatív töltésű kvázimolekuláris ionnak $[M-H]^-$ felel meg egy proton vesztesét követően (20a ábra).

A β -ösztradiol standardja, mint ahogy már korábban említésre került tartalmazott egy hemihidrát egységet is. Hasonlóan a pozitív polaritású ionizáció során megfigyeltekhez a β -ösztradiolt a hemihidrát egység nélkül detektáltuk, a hormon kvázimolekuláris ionját $[M-0.5H_2O-H]^-$ 271.18 m/z értéknél mutattuk ki (20b ábra).

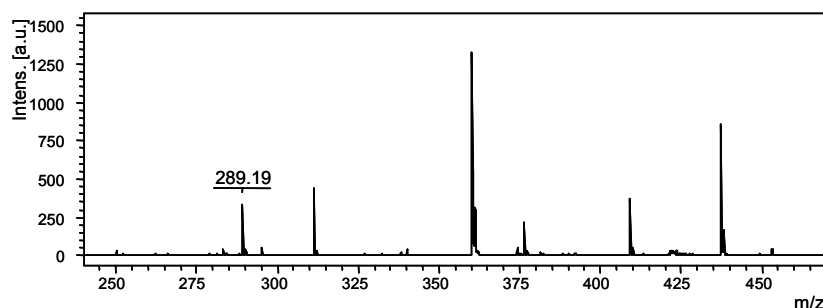
A 288,17 Da tömegű ösztриolt pedig 287,17 m/z értéknél detektáltuk $[M-H]^-$, a tömegspektrumot a (20c ábra) mutatja.

A progeszteron és a tesztoszteron vizsgálatokor negatív ionizációs mód alkalmazása esetén voltak hasonló tapasztalataink, mint az ösztrogének pozitív ionizációs módú analízisénel. A tesztoszteront sikerült ugyan negatív töltésű kvázimolekuláris ion $[M-H]^-$ alakjában, 287,21 m/z értéknél detektálni, de a jel intenzitása, hasonlóan az ösztронhoz

ebben az esetben sem haladta meg jelentősen a zaj intenzitásának maximum háromszorosát. Negatív ionizációs módban a progeszteront egyáltalán nem sikerült kimutatni. A megfigyelt alacsony érzékenységre itt is az ionizációs folyamat rossz hatásfoka adhat magyarázatot.

Szexualsteroidok MALDI TOF vizsgálata C₆₀ fullerén mátrixszal

A méréseket azonos műszerbeállítások mellett elvégeztük C₆₀ fullerén mátrix segítségével is. A két különböző, pozitív illetve negatív polaritású ionizációs módok alkalmazásakor tapasztaltakat a C₆₀ fullerén mátrix használata mellett is megerősíthetjük: az ösztrogének vizsgálata negatív, míg a tesztoszteron és a progeszteron kimutatása pozitív ionizációs módban lehetséges. A C₆₀ fullerénnel azonban a jel/zaj viszony romlását tapasztaltuk a C₇₀ fullerénnel történt mérésekhez képest. A másik tapasztalat, az azonos műszerbeállítások és azonos energiájú lézersugárzás alkalmazása mellett megfigyelt alacsonyabb hatásfokú ionizáció volt. Ez ugyan kompenzálható az ionizációhoz használt lézersugár intenzitásának növelésével, de ez a felbontás romlásával járt, mely alacsonyabb tömegpontosságot vont maga után.



21. ábra A tesztoszteron pozitív ionizációs módú MALDI TOF tömegspektruma C₆₀ fullerén mátrix alkalmazásával.

A felbontás értéke C₆₀ fullerén mátrix alkalmazásával egyik esetben sem lett 50 ppm-nél jobb, szemben a C₇₀ fullerénnel tapasztalt 3 ppm-el. Egy jellemző tömegspektrumot a 21. ábra mutat. A tapasztalatok tükrében az érzékenység meghatározását, és a biológiai minták vizsgálatát már csak C₇₀ fullerén mátrixszal végeztük el.

Érzékenység

A kimutathatósági határ (LOD) megállapítása hígítási sorozatok segítségével történt. A kimutathatóság minimumának azt a mennyiséget vettük alapul, ahol az adott hormon vizsgálatakor kapott jel intenzitása legalább a megfigyelt zajszint háromszorosát adta. Ezt az elfogadott arányt viszonyítási alapként használtuk, hiszen a MALDI tömegspektrometria elsősorban kvalitatív módszer. Az eredményeket ng, illetve pmol abszolút felvitt mennyiségben kifejezve a 6. táblázatban foglaltuk össze. A legnagyobb érzékenységet az ösztriol esetében tapasztaltuk, itt 11 ng felvitt anyagmennyiséget sikerült még megbízhatóan detektálnunk. A legkevésbé érzékeny az ösztroon kimutatása volt, minimum háromszoros jel/zaj arányt legkevesebb 20 ng hormon felvitelénél figyeltünk meg.

A mérések során meghatároztuk a módszerrel elérhető tömegpontosságot is, melynek értéke az ösztrogének negatív, illetve a tesztoszteron és a progeszteron pozitív ionizációs módú analízisének a már említett 3 ppm volt.

Eredmények értékelése

A szteroid hormonok tömegspektrometriás vizsgálata során felmerülő nehézség a nem kielégítő érzékenység, mely abból fakad, hogy a szteroidok nehezen ionizálhatóak az ismert technikákkal. A tömegspektrometriás mérés során elérhető érzékenység azonban jelentősen függ az alkalmazott ionizációs technika hatékonyságától. Ez igaz a MALDI folyamatára is, ahol az elterjedten alkalmazott mátrix vegyületekkel (DHB, CHCA, SA) szintén nem valósítható meg a natív szteroidok nagy érzékenységű kimutatása. További akadály, hogy a szteroid hormonok ugyanabban a tömegtartományban detektálhatók, mint a kis molekulatömegű mátrix vegyületek, és ez a tömegspektrumon esetlegesen interferenciákhoz vezet. E két probléma speciális reagensekkel hidalható át, melyekkel könnyebben ionizálható és nagyobb molekulatömegű származékok képzésére van lehetőség.

A MALDI tömegspektrometria során a magas érzékenységért és a hatékony ionizációért a megfelelően megválasztott mátrix vegyület a felelős, így mátrixként, a hagyományosan alkalmazott komponensektől eltérő vegyületet kerestünk. Szempont volt az is, hogy molekulatömegük magasabb legyen, mint a vizsgált szexuálszteroidoké. Megoldásként a

széleskörű analitikai alkalmazással jellemezhető hatvanas, illetve hetvenes szénatomszámú fullerének (C_{60} , C_{70}) szolgáltak.

A fullerének erős optikai abszorpciós tulajdonságokkal rendelkeznek és számos kémiai csoporttal képesek kölcsönhatásba lépni. A fulleréneket sikeresen alkalmazzák, mint LC állófázisokat (Jinno et al., 1992, 1997) szilárd fázisú extrakciós (SPE) szorbens anyagokat (Serrano A, Gallego M, 2006; Ballesteros et al., 2000), valamint a fullerén egységekből felépülő szén nanocsöveket (CNT) MALDI mátrixként is (Gholipour Y et. al., 2008). A fullerén alapú CNT mátrixszal egyes nehezen ionizálható vegyületek (pl. szénhidrátok) vizsgálata nagyobb érzékenységgel végezhető el a hagyományos mátrix vegyületekhez képest. A fullerének vízdékony származékai peptidek, fehérjék precipitációját is lehetővé teszik oldataikból, ekkor a precipitált fehérjék közvetlenül vizsgálhatóak MALDI TOF tömegspektrometriával, mátrix vegyület hozzáadása nélkül (Shiea et al., 2003).

A fullerének alkalmazását MALDI mátrixként a struktúrában belül található delokalizált elektronszerkezet teszi lehetővé, mely a fullerének már említett erős optikai abszorpciójáért is felel. Ez az elektronszerkezet képes az ionizációhoz használt lézer energiájának elnyelésére is, lehetővé téve a MALDI ionizáció folyamatát. A C_{60} és C_{70} fullerének további előnye, hogy más tömegtartományban detektálhatók, mint a szexuálszteroidok, mivel molekulatömegük (720Da C_{60} és 840Da C_{70}) jóval magasabb, mint a tipikus szteroid hormonok (250-350 Da) molekulatömegei. Így nem szükséges a szteroidok kémiai módosítása (származékképzés), mert tömegeik nem fognak átfedni a mátrixból származó csúcsokkal, mint az a gyakran alkalmazott, kis molekulatömegű (DHB, SA, CHCA) mátrixok esetében tapasztalható.

A két fullerént újdonságként egyszerű, telített toluolos oldatban alkalmaztuk, melyet az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon készítettünk. Ezt az oldatot az ismert mátrix anyagokhoz hasonlóan kezelve MALDI mintatartó plate-re cseppentettük fel, majd kristályosítottuk ki. A mintákat erre a kristályfelszínre cseppentve sikeresen mutattuk ki és vizsgáltuk az öt legáltalánosabb (ösztrom, β -ösztradiol, ösztrol, tesztoszteron és progeszteron) szexuálszteroid hormont pozitív és negatív ionizációs módokban.

Az ösztrogén hormonokat (ösztadiol, ösztrol, ösztrom) negatív ionizációs módban tudtuk vizsgálni, azonban az ösztrom, alacsonyabb érzékenységgel ugyan, de pozitív módban is kimutatható volt. Az ösztrogénnel ellentétben, a progeszteron és a tesztoszteron vizsgálatakor pozitív ionizációs mód alkalmazásával sikerült jó eredményeket elérnünk. A tesztoszteron, az ösztromhoz hasonlóan detektálható volt az ellentétes polaritású, (negatív)

ionizációs módban is, de mint azt az ösztrom pozitív ionizációs módú kimutatása során tapasztaltuk az érzékenység alacsony volt.

Az ionizációs jelenségekre az egyes hormonok szerkezete alapján kerestünk magyarázatot. Irodalmi háttérre ebben az esetben nem tudtunk támaszkodni, mert a szexuáliszteroidok származékképzés nélküli MALDI TOF analíziséről nem áll rendelkezésre adat.

Véleményünk szerint, az ionizációs folyamatokra leginkább a vizsgált hormonok szerkezetében található hidroxil- és keto csoportoknál van lehetőség. A MALDI ionizáció során ugyanis (Knochenmuss R, 2006) jellemzően kvázimolekuláris ionok keletkeznek az egyes vegyületekből, mind pozitív, mind pedig negatív ionizációs módban. Ekkor egy proton addícióját (pozitív mód), vagy leszakadását (negatív mód) figyelhetjük meg. A vizsgált hormonok esetében a három funkciós csoport közül (hidroxil-, oxo- és metil-) leginkább a hidroxil- és az oxocsoportoknál képzelhető el a fenti két folyamat.

Az öt szexuáliszteroid szerkezetét áttekintve látható, hogy az ösztrom egy keto- és egy hidroxilcsoportot is tartalmaz, a β -ösztrodiol és az ösztroiol pedig csak hidroxilcsoportokat. A tesztoszteron hasonlóan az ösztromhoz mindkét kémiai csoporttal rendelkezik, a progeszteron szerkezetében ugyanakkor csak ketocsoportokat találunk.

Mint már említettük a β -ösztrodiol és az ösztroiol, melyek csak hidroxilcsoportokkal rendelkeznek, csak negatív polaritású ionizációs módban voltak eredményesen kimutathatók. Negatív polaritású MALDI ionizáció során általában a vizsgált molekulából egy proton leszakadása figyelhető meg, negatív töltésű kvázimolekuláris ionok $[M+H]^-$ keletkezése mellett. Erre a folyamatra esetünkben a hidroxilcsoportoknál van lehetőség. A hidroxilcsoportok deprotonálódása tehát, magyarázhatja a hatékony ionizáció folyamatát negatív ionizációs módban. Itt ugyanakkor protonálódásra nincs lehetőség, ezért pozitív ionizációs módban kevésbé hatékony ionizációt és alacsonyabb érzékenységet várunk, az oxocsoportok hiánya miatt. Ez összhangban áll méréseink eredményeivel.

Hasonló logika alapján magyarázható az a megfigyelés is, mely szerint a progeszteron csak pozitív ionizációs módban volt kimutatható. A progeszteron ugyanis csak oxocsoportokat tartalmaz ahol deprotonálódásra nincs lehetőség. Itt az oxocsoportok protonálódásával, a pozitív polaritású ionizáció valósulhat meg pozitív töltésű $[M+H]^+$ kvázimolekuláris ionok keletkezésével. Méréseink során is ezt a jelenséget figyeltük meg. Az ösztrom és a tesztoszteron vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy korlátokkal ugyan, de mind negatív és mind pozitív ionizáció alkalmazásával kimutathatók. Ennek lehetséges háttere, hogy mind a két hormon rendelkezik oxo- és hidroxilcsoportokkal is. Mivel

mindkét funkciós csoport megtalálható a két hormonban, negatív $[M-H]^-$ és pozitív $[M+H]^+$ töltésű kvázimolekuláris ionok keletkezésére is van lehetőség. Szembetűnő volt továbbá az is, hogy mind a két funkciós csoport jelenléte ellenére az ősztron ionizációja negatív módon, a tesztoszteroné pedig pozitív módon volt hatékonyabb.

A két hormonban az említett funkciós csoportok elhelyezkedésében van különbség, a tesztoszteron aromás gyűrűben a 3. szénatomon oxocsoportot, a ciklopentán gyűrűben, a 17. szénatomon pedig hidroxilcsoportot tartalmaz. Ez az ősztron szerkezetében fordított, itt a 3. szénatomon hidroxil, 17. szénatomon pedig oxocsoport található. Feltételezéseink szerint a MALDI mátrix vegyületekhez hasonlóan, az aromás gyűrűben lévő funkciós csoportok hajlamosabbak részt venni az ionizáció folyamatában, mint a szteroidok telített ciklopentán gyűrűjében lévők. Mivel aromás gyűrűben a tesztoszteron oxocsoportot, az ősztron pedig hidroxilcsoportot tartalmaz, az előbbi esetében a pozitív, az utóbbinál a negatív polaritású ionizáció lehet hatékonyabb.

Igazságügyi leletek nem meghatározása szexuálszteroidok segítségével

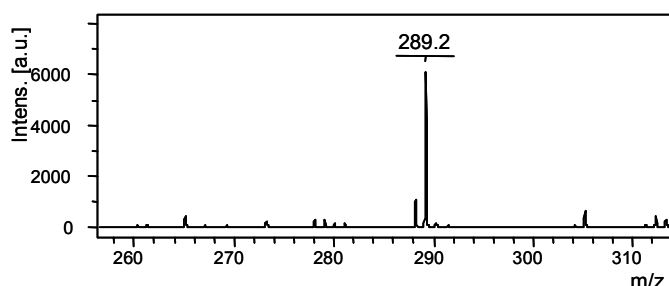
A mérési körülmények beállítása, és a várható érzékenység meghatározása után a módszer alkalmazásának lehetőségeit biológiai mintákon vizsgáltuk meg. A módszerrel elvégeztük két igazságügyi lelet, tömegspektrometriás vizsgálatát is, esetleges nemi hovatartozásra specifikus markereket keresve. Kíváncsiak voltunk egyrészt arra, hogy az általunk kifejlesztett módszerrel lehetséges-e szexuálszteroidok kimutatása csontszövetből, valamint arra is, hogy az eredmények összhangban vannak-e a vizsgált anyag nemével. A csontszövet esetünkben igazságügyi leletekből származott. Az első igazságügyi eset (22. ábra), egy használaton kívüli pincehelyiség elbontása során felfedezésre került mumifikálódott emberi torzó volt. A lelet legalább egy éven keresztül volt az említett helyiségben, ahol is rendkívül száraz és meleg körülmények uralkodtak, lehetővé téve a mumifikálódás folyamatát. Ennek megfelelően az anyag tartalmazott mumifikálódott lágyrész komponenseket is, azonban ezeket az mintaelőkészítés során eltávolítottuk. Általában ugyanis a csontos állomány vizsgálható a kétséges nemi identitású igazságügyi leletek esetében, mivel a csontozat képes a legtovább ellenállni a környezeti hatásoknak. Továbbá, a nem meghatározására hagyományosan alkalmazott antropometriás módszerek is a csontállomány vizsgálatára koncentrálnak. Ezen okokból kifolyólag a tömegspektrometriás vizsgálatokhoz is a lelet csontszövetét használtuk fel, a folyadék-folyadék extrakciót a maradvány felkarcsontjának őrleményéből végeztük.

Esetünkben a csontállomány rendkívül jó megtartása a lelet nemének pontos antropológiai meghatározását is lehetővé tette, mely kétséget kizáróan férfi nemet állapított meg. Az extraktumokat pozitív és negatív ionizációs módban is megvizsgáltuk.



22. ábra A Pellérden talált mumifikálódott emberi torzó (A). A hormonextrakciót a lelet felkarcsontjának (B) felhasználásával végeztük.

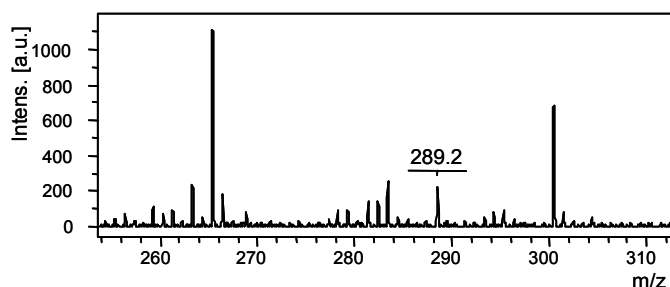
Pozitív ionizációs módban, a legnagyobb mennyiségben előforduló androgént, a tesztoszteront mutattuk ki, kvázimolekuláris ionját 289,21 m/z értéknél detektáltuk. Az általunk keresett hormonok közül pozitív módban más komponenst nem találtunk (23. ábra) Negatív ionizációs mód alkalmazása mellett nem sikerült további, esetlegesen az ösztrogének közé tartozó hormonokat detektálni, ebben az ionizációs módban a tesztoszteron sem volt kimutatható. A lelet nemét a tömegspektrometriás analízis eredményei alapján is férfiként határoztuk meg.



23. ábra A Pellérden talált mumifikálódott emberi torzó csontextraktumának pozitív ionizációs módú MALDI TOF tömegspektruma. Az általunk keresett hormonok közül egyedül a tesztoszteront mutattuk ki.

A másik igazságügyi eset egy rendkívül rossz állapotú, roncsolódott torzó volt, amelyet a Duna árterében fedeztek fel. Itt lágyrész maradványok mellett a gerincoszlop, a bordák, illetve a szegycsont állt rendelkezésre. Az első esethez hasonlóan a csontszövet került feldolgozásra, itt azonban a hormonextrakciót a maradvány ágyéki csigolyáiból végeztük.

A tömegspektrometriás vizsgálat során pozitív ionizációs módban a tesztoszteront sikerült kimutatni 289,21 m/z értéknél (24. ábra). A lelet vizsgálata során női szexuálisztteroidokat a keresett komponensek közül negatív ionizációs mód alkalmazásával sem detektáltunk. A lelet nemét férfiként állapítottuk meg, amelyet az igazságügyi antropológiai vizsgálat is megerősített.



24. ábra A Duna árterében talált emberi torzó csigolyaextraktumának pozitív ionizációs módú MALDI TOF tömegspektruma. Az általunk keresett hormonok közül itt is csak a tesztoszteront mutattuk ki.

Ösztrogének és progeszteron kimutatása terhesség alatt

Második lépésben a terhesség időszakára jellemző szexuálisztteroid markerek kimutatását végeztük el vizeletben. Mivel a terhes állapot igazolására szolgáló gyors tesztek vizelet felhasználásával készülnek, a hormonok tömegspektrometriás kimutatását is ebben a mátrixban végeztük el. A hormonokat nem csak szabadon, hanem konjugáltan is kerestük, ugyanis a vizelettel kiválasztott szteroidok elsősorban ebben az alakban fordulnak elő. A konjugáció általában glükuronid, vagy szulfát egységekkel történik, mely megkönnyíti a hormonok vizelettel történő kiválasztását (Gomes R L et al., 2009). A vizeletmintákat, melyeket egy 29 éves terhes nőtől gyűjtöttünk, diklórmetános folyadék-folyadék extrakciót követően vizsgáltuk. A mintákat párban, pozitív és negatív ionizációs módot is alkalmazva mértük le, mivel a terhesség során ösztrogének mellett a progeszteron kimutatása is várható volt.

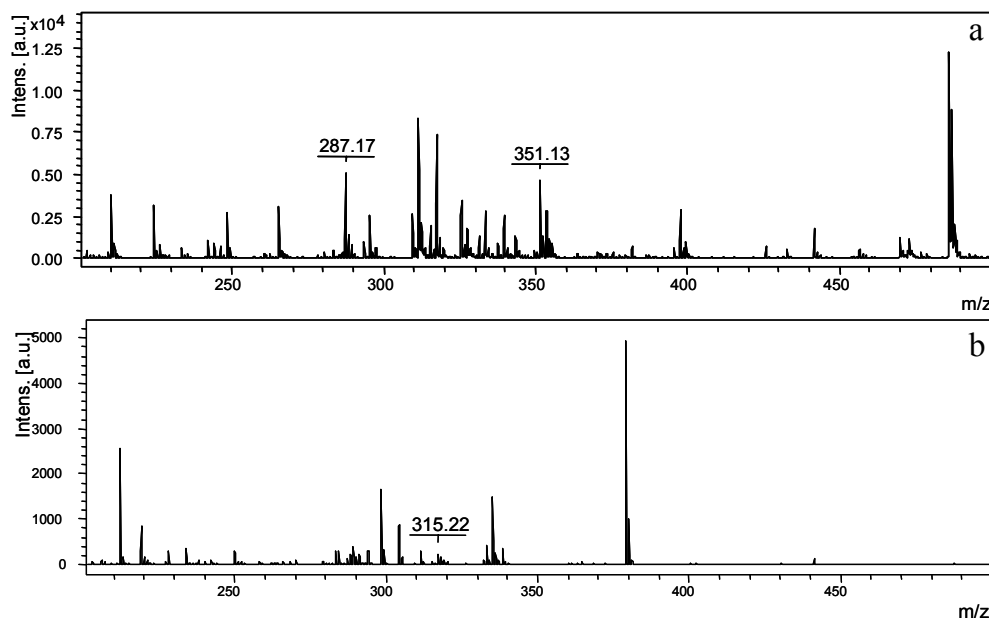
Negatív ionizációs módot alkalmazva, a ösztradiol, valamint az ösztriol kimutatására számítottunk, konjugált, vagy konjugálatlan formában.

A vizsgált ösztrogén hormonok közül elsődlegesen a feto-placentáris egység által termelt ösztriolt kerestük, mely hormon a terhesség kimutatásán túl a terhesség menetének nyomonkövetésére is használható (Feinshtein et al., 2010). Az ösztriolt negatív ionizációs módban $[M-H]^-$, jó relatív intenzitással, konjugálatlan alakban mutattuk ki, 287,17 m/z

értéknél. Az ösztriol esetében ugyanakkor nem sikerült egyik ismert konjugátumot sem detektálni.

A másik ösztrogén, melynek vizeletből történő kimutatására mindenképpen számítottunk, a termékeny korú nőkben legnagyobb mennyiségben előforduló, de a placenta által is szintetizált ösztradiol (Barrera et al., 2007) volt. A hormont negatív módon, szulfáttal alkotott konjugátumként detektáltuk 351,13 m/z értéknél. Itt, szemben az ösztriollal konjugátatlan, szabad formát nem találtunk. A harmadik vizsgált ösztrogén az ösztron a menopauzát követően válik elsődleges ösztrogénné. Esetünkben ez nem állhatott fenn, így az ösztron vizeletből történő sikeres kimutatása nem volt valószínű. A vizsgálatok során sem a szabad hormont, sem annak konjugátumait nem detektáltuk.

Pozitív ionizációs módban a vizsgált hormonok közül, a placenta által szintetizált progeszteront detektáltuk. Ezt a progesztogén terhességi hormont kezdetben a sárgatest, a terhesség nyolcadik hetétől kezdve azonban a placenta termeli (Salazar López et al., 2007). Szerepe többek között a méhnyálkahártya terhességi állapotának fenntartásában van. A hormont pozitív ionizációs módban mutattuk ki konjugátatlan alakban, 315,22 m/z értéknél. Az ismert konjugátumokat az ösztriolhoz hasonlóan itt sem figyeltük meg (25. ábra).



25. ábra Terhesség szexuáliszetroid markereinek kimutatása MALDI TOF tömegspektrometria alkalmazásával. Az “a” ábra a negatív, a “b” ábra a pozitív ionizációs módú vizsgálat eredményét ábrázolja.

Eredmények értékelése

Az igazságügyi embertani anyag vizsgálata során csontszövetből végeztük el szexuáliszteroidok kimutatását, eredményeinket a nemi identitás meghatározásra használtuk fel. Jelenleg az emberi maradványok nemének meghatározása a csontozat vizsgálata alapján történik, antropometriás, illetve antropomorfológiai technikákkal. A vizsgálatok tárgya leggyakrabban a koponya, illetve a medencecsont, ahol is a nemi dimorfizmus a legerőteljesebben kifejezett. Meghatározott paraméterek továbbá a hosszú csöves csontok, mint például a femur méretei is. A rossz megtartású leletek nem meghatározása azonban a klasszikus, antropológiai módszerekkel nehezen megoldható feladat, ugyanis ha a lelet egésze töredékes, vagy ha a csontozat hiányos, nincs lehetőség az antropometriás paraméterek meghatározására. A gyermekkorú maradványok vizsgálatakor pedig az okozhat problémát, hogy a serdülőkor előtti életkorokban nincsenek olyan kifejezett különbségek a két nem csontozatában, amelyek lehetővé tennék az egyértelmű elkülönítést. Ezen korlátok miatt kerestünk a nemi identitásra specifikus, molekuláris markereket a nem csontszövet alapján történő meghatározására. A vizsgálat során finomra őrölt csonttöredékekből végeztünk folyadék-folyadék extrakciót, majd a kivonatokat bepárlás és metanolban történő visszaoldást követően mértük le. A tömegspektrometriás analízis során a keresett hormonok közül egyedül a tesztoszteron (289,21 m/z) kimutatása volt lehetséges, így mindkét lelet nemét férfiként határoztuk meg, melyet az igazságügyi szakértői vizsgálat is alátámasztott.

A mérések során töredékes csontállományt is feldolgoztunk, illetve esetenként mesterségesen állítottunk elő a meglévő, jó megtartású leletből. Ezzel olyan körülményeket teremtettünk, amelyek gyakran előfordulnak, és lehetetlenné teszik a szokványos, antropológiai nem meghatározást. Feltételezzük, hogy a szexuáliszteroid összetétel tömegspektrometriás meghatározását követően, a rossz megtartású emberi maradványok nemi identitása is meghatározható lehet.

Vizsgálataink második sorozata során sikeresen mutattunk ki a terhes állapotra (ösztriol és progeszteron), illetve a fiziológiai női nemi működésre (ösztadiol) jellemző szexuáliszteroidokat vizeletből. A magasabb érzékenység elérése, illetve a mátrix hatás csökkentése érdekében folyadék-folyadék extrakciót alkalmaztunk a méréseket megelőzően. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy módszerünk alkalmas lehet több szexuáliszteroid biológiai mintákban történő gyors, egyidejű kimutatására is. További, például SPE alapú extrakciós módszerek segítségével pedig esetleg a komplexebb mátrixok, mint például a szérum szteroid profilja is meghatározhatóvá válik.

5. Összefoglalás

A záratermőkben széleskörűen előforduló fitoösztrogének közé tartozó transz-rezveratrol bizonyítottan számos pozitív élettani hatással bír. A transz-rezveratrol glikozidjához, a transz-piceidhez hasonlóan borokban is megtalálható. A jelen munka egyik célja magyar borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának vizsgálata volt HPLC analízis segítségével. Munkánk során az egri és a villányi bortermő régiót, valamint több évjáratot hasonlítottunk össze.

Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy nemzetközi irodalmi adatokkal való összehasonlításban, mind az egri, mind pedig a villányi bortermő régió esetén jelentős transz-rezveratrol és transz-piceid mennyiségekkel találkozhatunk. A nemzetközi átlag mind a transz-rezveratrol, mind a transz-piceid esetében jellemzően 0,5 mg/l és 3 mg/l között alakul. A két vizsgált régió közül különösen az ország déli, napos részén elhelyezkedő villányi bortermő régióban figyeltünk meg kiemelkedő értékeket mind a transz-rezveratrol, mind a transz-piceid esetében. A villányi régióból két pincészet borainak összehasonlítása is megtörtént, a Bock és a Polgár pincészetek közreműködésének köszönhetően. Mind a két pincészet borainak átlagos transz-rezveratrol tartalma 3 mg/l feletti értéknek adódott, 3,2 mg/l a Bock és 3,3 mg/l a Polgár pincészet esetében. Mind a két pincészet borai között találtunk továbbá figyelemreméltó, 4 mg/l, sőt 5 mg/l feletti értékeket is, egy esetben pedig (Bock Cabernet Sauvignon 2006) 10,4 mg/l mennyiséget is. A hűvösebb, és csapadékosabb egri bortermő régióban található Korona Borház boraiban ennél alacsonyabb, 1,5 mg/l átlagos értéket mutattunk ki. Az egyes régiókat összehasonlítva megállapítottuk, hogy a szárazabb, melegebb klíma jobban kedvez a borok transz-rezveratrol és transz-piceid tartalmának. Az egyes évjáratok összehasonlításával pedig következtettünk arra is, hogy az erőteljes *Bothrytis cinerea*-val történt fertőzöttség (rossz bortermő évek) nem kedvez a transz-rezveratrol előfordulásának, valószínűleg a szürkepenész stilbén-oxidáz enzimjének hatására, mely a rezveratrol és a piceid lebomlásához vezet.

A transz-rezveratrol molekulával kapcsolatban is ismert a stilbénekre jellemző cisz/transz UV fotoizomerizáció folyamata. Megvizsgáltuk, hogy ezen reakció során mindössze a transz-rezveratrol átalakulása figyelhető meg cisz-rezveratrollá, vagy esetleg további komponensek is keletkeznek. Megállapítottuk, hogy a cisz-rezveratrol mellett egy másik komponens is azonosítható a fotoizomerizáció folyamatának eredményeként, melyet egyes irodalmi adatok is megerősítenek. E molekula azonosítása azonban, ez idáig nem történt meg. Tömegspektrometriás vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az ismeretlen komponens tömege 2Da-al kevesebb a transz- vagy a cisz-rezveratrolénál.

Mivel ezt a tömegkülönbséget két proton hiánya okozhatja, a terméket egy oxidációs folyamat következményének tekintettük. A pontos molekuláris azonosítást az egyes komponensekhez tartozó abszorpciós spektrumok értékelése mellett tandem tömegspektrometriás vizsgálatok segítségével tettük meg. Az eredmények alapján a 2Da tömegkülönbség okát a rezveratrol molekula centrális alkilláncában történt oxidációban jelöltük meg. Ebben az esetben a struktúra közepén elhelyezkedő kettős kötés hármassá oxidálódik, egy acetilén származék keletkezéséhez vezetve. A két fenolos gyűrűt tartalmazó acetilén vegyületet 3,4',5-trihidroxi-difenilacetilénnek (TDPA) neveztük el.

A fitoösztrogének vizsgálata mellett humán ösztrogének és más szexuálszteroidok tömegspektrometriás analízisét is elvégeztük. A kifejlesztett MALDI TOF alapú módszerrel újdonságként a rutinszerűen alkalmazott származékképzési lépéseket kerültük el. A szteroidok tömegspektrometriás ionizációja ugyanis alacsony hatásfokú, ezért megfelelő reagensekkel hatékonyan ionizálható komponensekké alakítják őket. Ez a lépés pedig korlátozza az egyébként rendkívül gyors MALDI TOF MS analízis alkalmazásának előnyeit.

Ezt a problémát az ionizáció folyamatának optimalizálásával hidaltuk át, C₇₀ fullerént, mint MALDI mátrix vegyületet alkalmazva. A C₇₀ szénatomszámú fullerént toluolban oldva, sikerült a MALDI target plate-re egy olyan fullerén kristályokból álló felszínt felvinni, mely lehetővé tette a leggyakoribb ösztrogén, androgén és progesztagén szteroidok származékképzés nélkül történő hatékony tömegspektrometriás ionizációját, és érzékeny kimutatását. Fullerén vegyületet egyszerű oldat formájában először alkalmaztunk MALDI mátrixként. Méréseinket pozitív és negatív ionizációs módokban is elvégeztük, az egyes vegyületeket pozitív [M+H]⁺, vagy negatív [M-H]⁻ töltésű kvázimolekuláris ionként detektáltuk. Az ösztrogének kimutatása negatív, míg a progesztagén progeszteron, és az androgén tesztoszteron kimutatása pozitív ionizáció mellett volt hatékony. A kimutathatósági határ 38-74 pmol között volt.

A módszerrel biológiai minták analízisét is elvégeztük, mely során terhes vizeletből sikeresen mutattunk ki terhességre jellemző szteroid markereket (ösztriol, progeszteron). Ezen túl igazságügyi leletek szexuálszteroid profilját is meghatároztuk, mely során a hormonokat, mint a nemi identitás molekuláris markereit használtuk. Ezáltal az emberi maradványok nemének meghatározása analitikai módszerekkel is megvalósíthatóvá válhat, a klasszikus antropológiai technikák mellett. Módszerünk további előnye, hogy könnyen automatizálható, így klinikai felhasználásban nagyszámú biológiai minta gyors tömegspektrometriás elemzésére is alkalmas.

6. Köszönetnyilvánítás

Ez alkalommal is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkámat támogatták, és lehetővé tették PhD értekezésem elkészítését.

Mindenek előtt köszönettel tartozom Dr. Deli József professzor úrnak, programvezetőmnek, és Dr. Ohmacht Róbert professzor úrnak, témavezetőmnek. Értékes segítségük és szakmai vezetésük meghatározó volt disszertációm létrejöttében.

Köszönettel tartozom a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetből Prof Dr. Sümegi Baláznak, Dr. Márk Lászlónak, Dr. Lóránd Tamásnak, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézetből Dr. Kovács L. Gábor egyetemi tanár úrnak, hogy hasznos ötleteikkel éstevőleges segítségükkel támogatták előrehaladásomat. Köszönettel tartozom továbbá a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának, különös tekintettel Szemmelróthné Mátrai Erika és Molnár Erzsébet laboránsokra, akik nélkül kutatói tevékenységem nem valósulhatott volna meg. Köszönet illeti még közvetlen munkatársaimat is Dr. Takátsy Anikót és Böddi Katalint is támogatásukért, (és nem utolsósorban azért, mert elviseltek).

7. Irodalomjegyzék

Almeida C, Nogueira MJ.

Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection.

Pharm Biomed Anal. 2006; 41:1303-11.

Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F.

On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection.

J Chromatogr A. 2004; 1046:89-100.

Ballesteros E, Gallego M, Valcárcel M.

Analytical potential of fullerene as adsorbent for organic and organometallic compounds from aqueous solutions.

J Chromatogr A. 2000; 869:101-10.

Barrera D, Avila E, Hernández G, Halhali A, Biruete B, Larrea F, Díaz L.

Estradiol and progesterone synthesis in human placenta is stimulated by calcitriol.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;103:529-32.

Bravo MN, Silva S, Coelho AV, Vilas Boas L, Bronze MR.

Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal.

Analytica Chimica Acta. 2006; 424:19-25.

Bravo MN, Silva S, Coelho AV, Vilas Boas L, Bronze MR. Analysis of trans-resveratrol:

Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal.

J Food Compos Anal. 2008; 21:634-43.

Buiarelli F, Coccioli F, Merolle M, Neri B, Terracciano A.

Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification of natural androgen steroids and their conjugates in urine samples. Anal Chim Acta. 2004; 526:113-20.

Cai L, Koziel JA, Dharmadhikari M, Hans van Leeuwen J.

Rapid determination of trans-resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry.

J Chromatogr A. 2009; 2:281-7.

Courant F, Antignac JF, Maume D, Monteau F, Andersson AM, Skakkebaek N, Andre F, Le Bizec B.
Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors 1. Analytical strategy for
estrogens measurement in plasma at ultra-trace level.
Anal Chim Acta. 2007; 586:105-14.

Cowan DA, Kicman AT, Kubli-Garfias C, Welchman HJ.
Ion trap MS/MS of intact testosterone and epitestosterone conjugates-Adducts, fragile ions and the
advantages of derivatisation.
Steroids. 2008; 73:621-28.

D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Brianza S, Cristofaro MA, Tamone C, Giribaldi G, Ulliers D,
Pescarmona GP, Isaia G.
Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: A key mechanism in
osteoporosis.
Bone. 2008; 43:92-100.

Dang ZC, Lowik C.
Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone.
Trends Endocrinol Metab. 2005; 6:207-13.

Edward JF, Jeffry A, Sabo QE.
Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of
the epidermal growth factor receptor.
Steroids. 2008; 73:870-73.

Feinstein V, Ben-Zvi Z, Sheiner E, Amash A, Sheizaf B, Holcberg G.
Progesterone levels in cesarean and normal delivered term placentas. *Arch Gynecol Obstet*. 2010; 281:387-
92.

Flamini R.
Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols.
Mass Spectrom Rev. 2003; 218-50.

Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*. 2000, 66(8):663-73.
Fuh MR, Huang SY, Lin TY.
Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography–ion trap–mass spectrometer.
Talanta. 2004; 64:408-14.

Gholipour Y, Nonami H, Erra-Balsells R.

In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix.

Anal Biochem. 2008; 383:159-67.

Goldberg DM, Ng E, Karumanchiri A, Yan J, Diamandis EP, Soleas GJ.

Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography.

J Chrom A. 1995; 708:89-98.

Gomes RL, Meredith W, Snape CE, Sephton MA.

Analysis of conjugated steroid androgens: deconjugation, derivatisation and associated issues.

J Pharm Biomed Anal. 2009; 49:1133-40.

Griffiths WJ, Alvelius G, Sjoval J.

Derivatization for the characterisation of neutral oxosteroids by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry: the Girard P derivative.

Rapid Commun Mass Spectrom. 2003; 17:924-35.

Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y.

Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. Biochem J. 2001; 355:545-61.

Halls C, Yu O.

Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis.

Trends Biotechnol. 2008; 26:77-81.

Hanzlíková IK, Melzoch K, Filip V, Šmidrkal J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines.

Food Chem. 2004; 87:151-8.

Higashi T, Takayama N, Shimada K. Enzymic conversion of 3 β -hydroxy-5-ene-steroids and their sulfates to 3-oxo-4-ene-steroids for increasing sensitivity in LC-APCI-MS. Phar Biomed Anal. 2005; 39:718-23.

Higashi T, Yamauchi A, Shimada K. 2-Hydrazino-1-methylpyridine: a highly sensitive derivatization reagent for oxosteroids in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry.

J Chromatogr B. 2005; 825:214-22.

Honour JW.

Gas chromatography-mass spectrometry.

Methods Mol Biol. 2006; 324:53-74.

Hsu JF, Chang YC, Chen TH, Lin LC, Liao PC.

Evaluation of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for simultaneous detection of estrone and its metabolites using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.

J Chromatogr B. 2007; 860:49-56.

Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ.

Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes.

Cardiovasc Res. 2000; 47:549-55.

Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, Schnitzler JP.

Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. J Exp Bot. 1998; 49:953-65.

Jeandet P, Bessis R, Sbaghi M, Meunier P, Trollat P.

Resveratrol Content of Wines of Different Ages: Relationship With Fungal Disease Pressure in the Vineyard.

Am J Enol Vitic. 2004; 46:1-4.

Jinno K, Tanabe K, Saito Y, Nagashima H.

Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Various C₆₀ Fullerene Bonded Silica Phases in Microcolumn Liquid Chromatography.

Analyst. 1997; 122:787-91.

Jinno K, Yamamoto K, Fetzer J C, Biggs J.

C60 as a stationary phase for microcolumn liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Microcol. 1992; 4(3):122-28.

Johnson DW.

Ketosteroid profiling using Girard T derivatives and electrospray ionization tandem mass spectrometry: direct plasma analysis of androstenedione, 17-hydroxyprogesterone and cortisol.

Rapid Commun Mass Spectrom. 2005; 19:193-200.

Kampa M, Vassiliki P, Castanas E.

Membrane-initiated steroid action in breast and prostate cancer.

Steroids. 2008; 73:953-60.

Khan MA, Wang Y, Heidelberger S, Alvelius G, Liu S, Sjoball J, Griffiths WJ.

Analysis of derivatised steroids by matrix-assisted laser desorption/ionisation and post-source decay mass spectrometry.

Steroids. 2006; 71:42-53.

Kim Y S, Zhang H, Kim HY.

Profiling Neurosteroids in Cerebrospinal Fluids and Plasma by Gas Chromatography/Electron Capture Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry.

Anal Biochem. 2000; 277:187-95.

Knochenmuss R.

Ion formation mechanisms in UV-MALDI.

Analyst. 2006; 131:966-86.

Kuhnle GG, Dell'aquila C, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen content of cereals and cereal-based foods consumed in the UK.

Nutr Cancer. 2009; 61:302-9.

Kuhnle GG, Dell'Aquila C, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA.

Phytoestrogen content of beverages, nuts, seeds, and oils.

J Agric Food Chem. 2008; 56:7311-5.

Lee J, Rennaker C.

Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho.

Food Chemistry. 2007; 105:195-203.

Lee SS, Lee SM, Kim M, Chun J, Cheong YK, Lee J.

Analysis of trans-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea.

Food Res Int. 2004; 37:247-51.

Leövey A.

A klinikai endokrinológia és anyagcsere-betegségek kézikönyve.

Medicina Kiadó, Budapest, 2001.

Lin JK, Tsai SH.

Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol.

Proc Natl Sci Counc Repub China B. 1999; 3:99-106.

- Loredana La Torre G, Saitta M, Vilasi F, Pellicanó T, Dugo G.
Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection.
Food Chem. 2006; 94:640-50.
- Luan T, Li G, Zhang Z.
Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for rapid determination of trans-resveratrol in wine by gas chromatography-mass spectrometry.
Analytica Chimica Acta. 2000; 424:19-25.
- Mark L, Nikfardjam MS, Avar P, Ohmacht R.
A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines.
J Chromatogr Sci. 2005; 43:445-9.
- Mazur W, Adlercreutz H.
Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health.
Nutrition. 2000; 16:654-8.
- Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ.
Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects.
J Agric Food Chem. 2002; 50(26):7731-7.
- Mitamura K, Nagaoka Y, Shimada K, Honma S, Namiki M, Koh E, Mizokami A.
Simultaneous determination of androstenediol 3-sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate in human serum using isotope diluted liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry.
J Chromatogr B. 2003; 796:121-30.
- Miyoshi Y, Ando A, Shiba E, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S.
Involvement of up-regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. Int J Cancer. 2001; 94:685-9.
- Nikfardjam MS, Mark L, Avar P, Figler M, Ohmacht R.
Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region.
Food Chemistry. 2006; 98:453-62.
- Okamura K, Ando F, Shimokata H.
Serum total and free testosterone level of Japanese men: a population-based study. Int J Urol. 2005; 12:810-4.

Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T.

Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles.

Plant J. 2006; 45:133-43.

Palomino O, Gómez-Serranillos MP, Slowing K, Carretero E, Villar A.

Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

J Chromatogr A. 2000; 870:449-51.

Pan QH, Wang L, Li JM.

Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation.

Plant Sci. 2009; 176:360-66.

Poussier B, Cordova AC, Becquemin JP, Sumpio BE.

Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis. J Vasc Surg. 2005, 42:1190-7.

Rice S, Whitehead SA.

Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2008; 108:186-95.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, López-Hernández J, Ferraces-Casais P, Lage-Yusty MA.

Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection.

J Sep Sci. 2007, 30:1262-6.

Salazar López R, Ibarra Gallardo AL, Iduma Meléndrez M, Leyva Bojórquez R.

Specificity of biochemical markers of pregnancy second trimester.

Ginecol Obstet Mex. 2007; 75:608-14.

Sato T, Takabe K, Fujita M.

Immunolocalization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate-4-hydroxylase in differentiating xylem of poplar.

C R Biol. 2004; 327:827-36.

Schwartz H, Sontag G, Plumb J.

Inventory of phytoestrogen databases.

Food Chem. 2009; 113:736-47.

Seo J, Kim HY, Chung BC, Hong J. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry.

J Chromatogr A. 2005; 167:303-9.

Serrano A, Gallego M.

Fullerenes as sorbent materials for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers preconcentration.

J Sep Sci. 2006; 29:33-40.

Shackleton CHL, Roitman E, Philips A, Chang T.

Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry.

Steroids. 1997; 62:665-73.

Shiea J, Huang J P, Teng C F, Jeng J, Wang L Y, Chiang L Y.

Use of a water-soluble fullerene derivative as precipitating reagent and matrix-assisted laser desorption/ionization matrix to selectively detect charged species in aqueous solutions.

Anal Chem. 2003; 75(14):3587-95.

Stanczyk FZ, Cho MM, Endres DB, Morrison JL, Patel S, Paulson RJ.

Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits.

Steroids. 2003; 68:1173-78.

Strack D.

Plant Biochemistry.

Elsevier Academic Press, Burlington, USA, 1997.

Strahm E, Kohler I, Rudaz S, Martel S, Carrupt PA, Veuthey JL, Saugy M, Saudan C.

Isolation and quantification by high-performance liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry of androgen sulfoconjugates in human urine.

J Chromatogr A. 2008; 1196-1197:153-60.

Sun AY, Simonyi A, Sun GY.

The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols.

Free Radic Biol Med. 2002; 32:314-8.

Susan E, Hankinson A, Heather E

Endogenous estrogen, testosterone and progesterone levels in relation to breast cancer risk.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2007; 106:24-30.

Syed F, Khosla S.

Mechanisms of sex steroid effects on bone.

Biochem Bioph res Co. 2005; 328:688-96.

Taylor JJ, Grace PB, Bingham SA.

Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma.

Anal Biochem. 2005; 341:220-9.

Trela BC, Waterhouse AL.

Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability.

J Agric Food Chem. 1996, 44:1253-57.

Ugarov MV, Egan T, Khabashesku DV, Schultz JA, Peng H, Khabashesku VN, Furutani H, Prather KS, Wang HW, Jackson SN, Word AS.

MALDI Matrices for Biomolecular Analysis Based on Functionalized Carbon Nanomaterials.

Anal Chem. 2004; 76:6734-42.

Ugarov MV, Egan T, Khabashesku DV, Schultz JA, Peng H, Khabashesku VN, Furutani H, Prather KS, Wang HW, Jackson SN, Word AS.

MALDI Matrices for Biomolecular Analysis Based on Functionalized Carbon Nanomaterials.

Anal Chem. 2004; 76:6734-42.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.

Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.

Chem Biol Interact. 2006; 160:1-40.

Vicinelli V, Ceroni P, Maestri M, Lazzari M, Balzani V, Lee SK, Heyst Jv J, Vogtle F.

Photochemical and photophysical properties of a poly(propylene amine) dendrimer functionalized with E-stilbene units.

Org Biomol Chem. 2004; 2:2207-13.

Viñas P, López-Erroz C, Marín-Hernández JJ, Hernández-Córdoba M.

Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection.

J Chromatogr A. 2000; 871:85-93.

Wang Y, Hornshaw M, Alvelius G, Bodin K, Liu S, Sjövall J, Griffiths WJ.

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization High-Energy Collision-Induced Dissociation of Steroids: Analysis of Oxysterols in Rat Brain.

Anal Chem. 2006; 78:164-73.

Yu WC, Lin YK, Tai CT, Tsai CF, Hsieh MH, Chen CC, Hsu TL, Ding YA, Chang MS, Chen SA.
Early recurrence of atrial fibrillation after external cardioversion.
Pacing Clin Electrophysiol. 1999; 22:1614-9.

Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Doré S.
Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons.
Ann N Y Acad Sci. 2003; 993:276-86.

8. Tudományos közlemények

A témához kapcsolódó folyóirat cikkek:

1. Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC–APCI-MS.

Gergely Montsko, Martin S. Pour Nikfardjam, Zoltan Szabo, Katalin Boddi, Tamas Lorand, Robert Ohmacht, Laszlo Mark.

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2008; 196: 44-50.

IF:2.36

2. Analysis of nonderivatized steroids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using C70 fullerene as matrix.

Gergely Montsko, Alexandra Vaczy, Erzsebet Mernyak, Eva Frank, Zalan Kadar, Robert Ohmacht, Janos Wolfling, Laszlo Mark.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009; 395: 869-74.

IF: 3.48

3. Trans-resveratrol and trans-piceid content of Hungarian wines.

G. Montsko, R. Ohmacht, L. Mark

Chromatographia 2010; 71: 121-24.

IF: 1.31

4. Hormone Mass Fingerprinting: Novel possibility for high-throughput molecular sex determination of human skeletal remains by MALDI TOF mass spectrometry.

Gergely Montsko, Gabor Maasz, Zoltan Patonai, Istvan Bajnoczky, Brigitta Osz, Antonia Marcsik, Laszlo Mark

Forensic Science International (In press)

IF: 2.01

5. Investigation of phenolic components of Hungarian wines.

Avar P.; Pour Nikfardjam M.S.; Kunsági-Máté S.; **Montskó G.**; Szabó Z.; Böddi K.; Ohmacht R.; Márk L.

International Journal of Molecular Sciences 2007; 8: 1028–38.

IF: 1.1

A témához kapcsolódó konferencia előadások:

1. Mass spectrometric analysis of non-derivatized steroids in biological matrices

Montsko G., Patonai Z., Kovács GL., Márk L.

6th International Medical Postgraduate Conference

Hradec Kralove, Czech Republic, 2009

2. Trans-resveratrol and trans-piceid content of Hungarian wines

Montskó G., Jámboor É., Ohmacht R., Márk L.

15th International Symposium on Separation Sciences- Siófok, Hungary, 2009

3. Archeome: Complex biomarker analysis of ancient human remains with MALDI TOF/TOF mass spectrometry

Mark L., **Montsko G.**, Nemeth V., Marcsik A

Second International Symposium on Biomolecular Archaeology

Stockholm, Sweden, 2006

4. Determination of steroid hormones by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry with using fullerene as the matrix

Mark L., Makrai L., **Montsko G.**, Alexandra Vaczy

27th Informal meeting on mass spectrometry

Retz, Austria, 2009

A témához kapcsolódó konferencia poszterek:

1. Bioaktív polifenolok analitikai vizsgálata MALDI TOF tömegspektrometriával

Montskó G., Németh V., Pandur E., Nagy J., Márk L

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006

2. Szteránvázas hormonok kimutatása humán mintákból MALDI TOF tömegspektrometria alkalmazásával

Montskó G., Németh V., Pandur E., Nagy J., Márk L.

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006

Egyéb folyóirat cikkek:

1. Separation of Sesquiterpenes from Yarrow (Achillea millefolium L. s. l.) by LC-MS on Non-Porous Columns.

Gergely Montsko, Borbala Boros, Aniko Takatsy, Robert Ohmacht , Sabine Glasl, Liselotte Krenn, Laszlo Mark and Gottfried Reznicek

Chromatographia 2008; 67: 467-70.

IF: 1.31

2. Analysis of pathological and non-pathological human skeletal remains by FT-IR spectroscopy.

Gergely Nagy, Tamas Lorand, Zoltan Patonai, **Gergely Montsko**, Istvan Bajnoczky, Antonia Marcsik, Laszlo Mark

Forensic Science International 2008; 175: 55-60.

IF: 1.86

3. Use of fullerene-, octadecyl-, and triacontyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and in vitro glycated human serum albumin and fibrinogen.

Katalin Böddi, Anikó Takátsy, Szilvia Szabó, Lajos Markó, László Márk, István Wittmann, Róbert Ohmacht, **Gergely Montskó**, Rainer M. Vallant, Thomas Ringer, Rania Bakry, Christian W. Huck, Günther K. Bonn, Zoltán Szabó

Journal of Separation Science 2009; 32: 295 – 308. IF: 2.53

Egyéb konferencia posztterek:

1. Paleoproteomics: determination of proteins and pathological biomarkers from bone remains, using MALDI TOF/TOF mass spectrometry

Montskó G., Németh V, Pandur E, Nagy J, Patonai Z, Márk L

XVI. Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis – Budapest, Hungary, 2006

2. Biokompatibilis fullerén oldatok analitikai és toxicológiai vizsgálata

Montskó G., Vető S., Böddi K., Márk L

37. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2007

3. Ajak és szájpadhasadék specifikus fehérjék kimutatása nyálmintákból MALDI TOF/TOF tömegspektrometria segítségével

Montskó G., Tihanyi R., Szabó T. Gy., Szabó Gy., Németh V., Márk L

38. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2008

4. Intracellular regulation of hepcidin expression

Pandur E., Nagy J., Szabó A., **Montskó G.**, Radnai B., Sipos K

XVI. Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis – Budapest, Hungary, 2006

5. The function of human RNase L Inhibitor in translation

Nagy J., Pandur E., Szabó A., **Montskó G.**, Bognár Z., Sipos K

XVI. Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis – Budapest, Hungary, 2006

6. MALDI TOF/TOF tömegspektrometria alkalmazása a jelátviteli folyamatokban jelentős kis molekulatömegű fehérjék azonosítására

Németh V, **Montskó G.**, Vető S, Bognár E, Márk L

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006

7. A ferroportin egy hepcidin hormon által szabályozott vas transzporter

Nagy J., Pandur E., Szabó A., **Montskó G.**, Bognár Z., Peti M. A., Sipos K

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006

8. A mitokondrium jelentősége a transláció szabályozásában humán sejtekben

Pandur E., Nagy J., Szabó A., **Montskó G.**, Sipos K

36. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2006

9. A hepcidin, egy vasanyagcserét szabályozó hormon vizsgálata

Pandur E., Nagy J., **Montskó G.**, Peti M. A., Sipos K.

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006

10. Komplex biológiai minták GSH tartalmának meghatározása ioncsapdás tömegspektrometria segítségével

Németh V., **Montskó G.**, Solti I., Vető S., Tucsek Zs., Hocsák E., Márk L.

Magyar Biokémia Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése Pécs, 2006

11. Az A-1 antitripszin szerepe a hepcidin érésében

Pandur E., Nagy J., Poór V. S., **Montskó G.**, Sarnyai Á., Miseta a., Sipos K

39. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2009

12. LC-MS analysis of green tea polyphenols

Éva Jambor, Balázs Marics, Simon Armbruszt, **Gergely Montskó**, László Márk, Róbert Ohmacht

15th International Symposium on Separation Sciences- Siófok, Hungary, 2009