

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Levelek alkalmazkodása a napfényhez – polifenolos vegyületek lehetséges szerepei

Ph.D. értekezés

Csepregi Kristóf

Témavezető:

Dr. Hideg Éva

egyetemi tanár

Iskolavezető:

Dr. Gábrriel Róbert

egyetemi tanár

PÉCS, 2017

„Mert bölcsesség megy a te elmédbe és a tudomány a te lelkedben gyönyörűség lesz”

Példabeszédek könyve 2.10

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések listája.....	5
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1 Fenoloidok	9
3.1.1 A fenoloidok bioszintézise.....	9
3.1.2 A fenoloidok csoportosítása.....	11
3.1.3 Flavonoidok a szőlőnövény leveleiben.....	14
3.1.4 Reaktív oxigén származékok.....	15
3.2 Antioxidáns rendszerek.....	16
3.2.1 Nem enzimatis antioxiánsok	16
3.2.2 Enzimatis antioxiánsok	17
3.3 Antioxiáns kapacitások vizsgálata	18
4. Célkitűzések	20
5. Anyag és módszer	22
5.1 Szőlőlevél minták	22
5.2 Minta előkészítés	23
5.3 HPLC-MS analízis	23
5.4 Antioxiáns kapacitás vizsgálatok	24
5.4.1. Vasredukáló képességen alapuló antioxiáns kapacitás mérés (FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power).....	24
5.4.2. ABTS ^{•+} semlegesítésen alapuló antioxiáns kapacitás mérés (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	24
5.4.3. DPPH [•] semlegesítésen alapuló antioxiáns kapacitás mérés	25
5.4.4. H ₂ O ₂ semlegesítő képesség.....	25
5.4.5. ¹ O ₂ semlegesítő képesség.....	25
5.5 Flavonoid meghatározás spektrofotométerrel	26
5.5.1 Folin-Ciocalteu reaktivitás (FCR, Folin - Ciocalteu Reactivity).....	26
5.5.2 Flavanol tartalom meghatározás	27
5.5.3 Teljes flavonoid tartalom meghatározás alumínium-kloriddal	27
5.5.4 Teljes flavonoid tartalom meghatározás 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal.....	27
5.5.5 UV abszorbeáló pigment mennyiség meghatározás.....	28
5.6 Statisztikai módszerek.....	28
6. Eredmények és megvitatásuk	30

6.1 Flavonoid mennyiséget mérő eljárások szelektivitásának vizsgálata.....	30
6.1.1 Kromofórok abszorpcióján alapuló eljárások.....	30
6.1.2 UV abszorpción alapuló eljárások.....	33
6.2 Növényi polifenolok antioxidáns tulajdonságainak elemzése	35
6.2.1 Teljes antioxidáns kapacitás.....	35
6.3 Specifikus antioxidáns kapacitások.....	51
6.3.1 Nem enzimátikus H₂O₂ semlegesítő kapacitás mérő módszer fejlesztése növényi minták analíziséhez.....	51
6.3.2 UV abszorbeáló és specifikus ROS semlegesítő antioxidáns tulajdonságok.....	54
6.4 Pinot noir leveleinek speciális metabolit vizsgálatai.....	62
6.4.1 Környezeti tényezők és a Pinot noir levelében megtalálható speciális metabolitok összefüggései.....	65
6.4.2 A speciális metabolitok összefüggései a levelek UV abszorbeáló és antioxidáns tulajdonságaival.....	67
6.4.3 Flavonoid tartalmat becsülő spektrofotométeres eljárások hatékonyságának vizsgálata Pinot noir levélkivonatok segítségével.....	69
7. Összefoglalás	71
8. Summary	74
9. Irodalomjegyzék	77
10. Publikációs lista	90
10.1 A dolgozat alapjául szolgáló tudományos közlemények	90
10.1.1 Referált folyóiratban megjelent közlemények.....	90
10.1.2 Elbírálás alatt álló közlemények.....	90
10.1.3 Konferencia közlemények.....	91
10.2 Egyéb, a dolgozatban fel nem használt közlemények.....	92
11. Köszönetnyilvánítás.....	93
Függelék.....	94

1. Rövidítések listája

- $^1\text{O}_2$ - Szinglett oxigén
ABTS^{•+} - 2,2-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav kation gyök
 AlCl_3 - Alumínium-klorid
ASA - Aszkorbinsav
CA - Kaftársav
CAT - Katekin
DMACA - 4-dimetilamino-fahéjaldehid
DNPH - 2,4-dinitro-fenil-hidrazin
DPBF - 1,3-difenil-izobenzofurán
DPPH[•] - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök
ET - Elektron transzfer
EtOH - Etil-alkohol
FCR - Folin-Ciocalteu reaktivitás
FRAP - Vasredukáló képességen alapuló antioxidáns kapacitást mérő módszer
GAA- Galluszsav
GAL - Galangin
 H_2O_2 - Hidrogén-peroxid
HAT - Hidrogénatom transzfer
 HO^{\bullet} - Hidroxil gyök
ISO - Izoramnetin
KAE - Kaempferol
MeOH - Metil-alkohol
MYR - Miricetin
Myr-glc - Miricetin-3-O-glükózid
NAR - Naringenin
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ - Szuperoxid anion gyök
OH - Hidroxilcsoport
QUE - Kvercetin
QUE-glc - Kvercetin-3-O-glükózid
ROS - Reaktív oxigén származékok
SOD - Szuperoxid dizmutáz
TAC - Teljes antioxidáns kapacitás

TEAC - ABTS ^{•+} semlegesítésen alapuló antioxidáns kapacitás mérés

Trolox - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxilsav

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-S-triazin

UV - Ultraibolya sugárzás

UV-A - 315-400 nm

UV-B - 280-315 nm

2. Bevezetés

A napfénynek rendkívül fontos szerepe van a növények növekedésében, morfológiájában és nem utolsósorban a fotoszintézis energiaforrása. Az emberi szem felépítését tekintve a látható tartomány (380-780 nm) detektálására alkalmas, míg a növények és állatok az ultraibolya sugárzás (UV) érzékelésére is képesek. A nagy energiájú ibolyántúli sugárzásnak jelentős részét (UV-C 100-280 nm) az ózonréteg teljes mértékben kiszűri, azonban az UV-A (315-400 nm) illetve UV-B (280-315 nm) sugárzást átengedi, melyek ezáltal eléri a föld felszínét. Az ózonréteg elvékonyodása arra ösztönözte a kutatókat, hogy fokozottabban tanulmányozzák ezeket a káros sugárzásokat, különös figyelmet fordítva az UV-B tartományra, mely serkentőleg hat a reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezésére, sejtkárosodást, sejtelhalást okozva. Annak ellenére, hogy ezek káros hatások, a legtöbb növény jól alkalmazkodott a napfényhez és egyéb stressz körülményekhez. Ennek az alkalmazkodásnak egyik legfőbb komponensei a fenolos vegyületek, melyek ROS semlegesítő antioxidáns tulajdonságúak, valamint csökkentik a sejtekbe jutó UV sugárzást, egyfajta szűrőként funkcionálva. Ezek a védő szerepek azonban jelentősen függenek az egyes vegyületek fizikai, kémiai tulajdonságaitól, valamint elhelyezkedésüktől a sejtekben.

Munkánk során a látható fényt és ibolyántúli sugárzást is egyaránt tartalmazó, természetes napfényhez felettebb jól adaptálódott növényt, a szőlőt (*Vitis vinifera*) használtuk, melynek antioxidáns tulajdonságú vegyületeit vizsgálva átfogó képet kaptunk a fenolos tulajdonságú vegyületek napfényhez történő alkalmazkodást támogató szerepéről.

A PhD tanulmány során megvizsgáltuk az irodalomból jól ismert flavonoid tartalom, illetve antioxidáns kapacitás mérésére alkalmas módszerek érzékenységét. A teljes flavonoid tartalom meghatározását alumínium-kloriddal, illetve 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal, míg a flavan-3-olokat 4-dimetilamino-fahéjaldehid segítségével mértük. A teljes antioxidáns kapacitás mérésére a Folin-Ciocalteu reaktivitást, a vasredukáló képességen alapuló, a 2,2-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav kation gyök megkötésén alapuló, valamint az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök semlegesítésén alapuló antioxidáns kapacitást mérő módszereket használtuk, míg a specifikus antioxidáns tulajdonság mérésére a hidrogén-peroxid és szinglett oxigén semlegesítésén alapuló módszereket. Munkánk az ultraibolya sugárzást abszorbeáló pigment mennyiség meghatározására is kitér. A vizsgálatainkat az adott flavonoid csoportra legjellemzőbb tesztvegyülettel végeztük, mely során sikerült meghatározni számos, a levelekben megtalálható fenolos jellegű vegyület specifikus és nem specifikus antioxidáns

tulajdonságát, képet kapva eltérő specifitásukról, különféle szerkezet-hatás összefüggéseket megállapítva.

A tesztvegyületek méréseinek eredményeiből származó ismereteket felhasználtuk a levélkivonatok vizsgálata során, melyre egy nemzetközi kutatóhálózat, a COST Action UV4growth biztosított lehetőséget, melynek keretében sikerült eltérő környezeti körülmények között nevelkedett Pinot noir levélmintákat gyűjteni több európai országból. A növényminták antioxidáns tulajdonságainak meghatározása mellett UV abszorbeáló képességet és metabolit tartalmat mértünk HPLC-s eljárással, beazonosítva a *Vitis vinifera* legfontosabb fenolos vegyületeit.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Fenoloidok

A fenoloidok a növényi metabolizmus olyan speciális termékei, melyek a fenilpropanoid úton keresztül szintetizálódnak és halmozódnak fel a mezofil sejtek vakuólumaiban, a sejtfalban (Beckman, 2000; Bengoechea és mtsai., 1997) és a kloroplasztiszban (Saunders és McClure, 1976). A sejtfal fenoloidjai, úgymint a ligninek vagy hidroxifahéjsavak, különböző sejtkomponensekhez kapcsolódva, elősegítik azok mechanikai stabilitását (Wallace és Fry, 1994; Baucher és mtsai., 1998). Egyik legnagyobb csoportjukat a flavonoidok alkotják, melyek általánosan fordulnak elő gyümölcsökben, zöldségekben és különböző gyógynövényekben (Karakaya és Nehir, 1999). Fontos szerepet töltenek be az emberi egészség megőrzésében, mint gyulladáscsökkentők vagy antioxidánsok (Havsteen, 2002), valamint a szív és érrendszeri megbetegedések kialakulásának kockázatát is csökkenthetik (Rice-Evans és mtsai., 1995; Arts és Hollman, 2005).

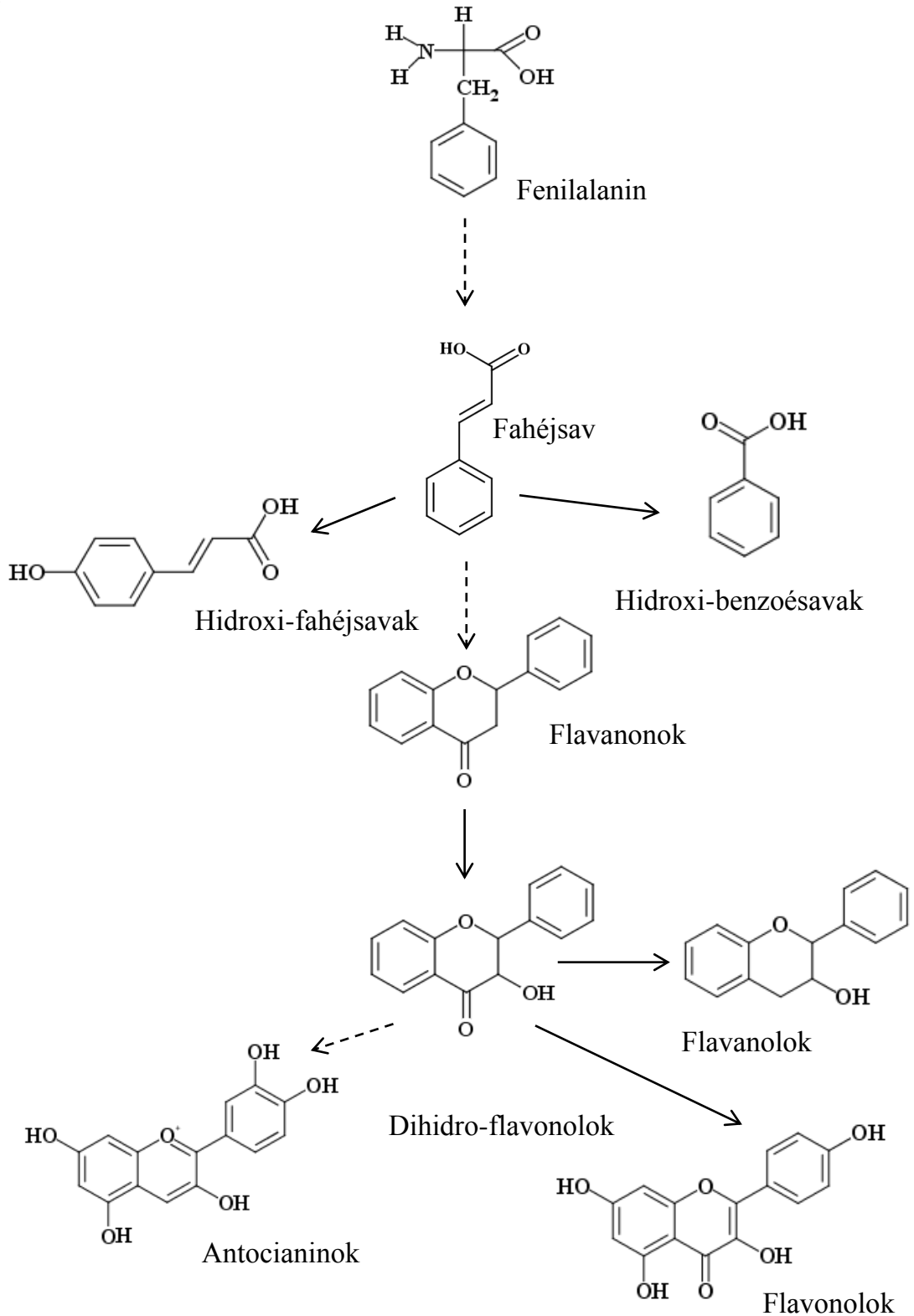
A flavonoidok a növények életében is nélkülözhetetlen szerepet játszanak, ugyanis a legjelentősebb UV abszorbeáló és antioxidáns tulajdonságú vegyületek. Részt vesznek az UV generálta ROS termékek semlegesítésében (Pietta, 2000), kelátképzőek (Rice-Evans és mtsai., 1997; Brown és mtsai., 1998; Mira és mtsai., 2002), védelmet nyújtanak a kártékony rovarok ellen (fanyar-keserű íz), segítik a megporzást (attraktív színek) és az auxinhoz hasonlóan növekedésszabályozóként is funkcionálnak (Agati és mtsai., 2012).

3.1.1 A fenoloidok bioszintézise

Szent-Györgyi Albert és munkatársai az 1930-as években egy addig ismeretlen anyagot izoláltak citrusféléből. Az új vegyület csökkentette a hajszálerek törékenységet és átjárhatóságát, ezért P-vitaminnak (P-permeábilis) nevezték el a vitaminokhoz való analógiájuk miatt. Évekkel később vált csak nyilvánvalóvá, hogy az akkor felfedezett anyag (rutin) egy flavonoid volt (kvercetin-3-O-rutinozid), melyből napjainkra már több ezret azonosítottak (Middleton, 1998) és humán egészségügyi szempontból is a legnagyobb és legdominánsabb vegyületcsoport (Irakli és mtsai., 2015).

A fent megnevezett fenolos tulajdonságú vegyületek olyan speciális növényi anyagcseretermékek, melyek a sikimisav útvonalon keresztül, aromás aminosavakból (fenilalanin, tirozin) képződnek. A szintézis során a fahéjsavak koenzim A (CoA) észtereihez

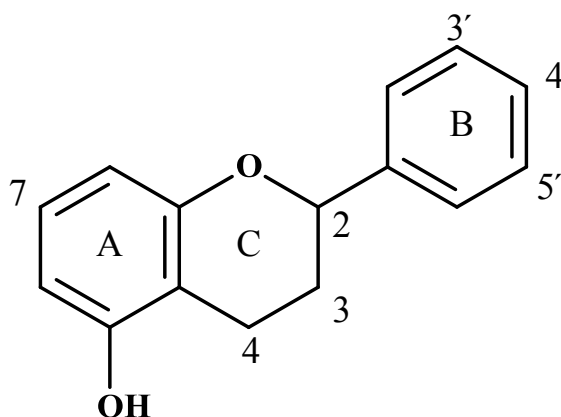
(C₆C₃) acetát egységek (C₂) kapcsolódnak, létrehozva a triketid cinnamoidok alosztályát, melynek két nagy csoportja a ciklizációval keletkező kalkonok és a velük egyensúlyban levő, már O-heterociklust is tartalmazó flavonoidok (Láng, 2007), melyek bioszintézise az 1. ábrán látható.



1. ábra
Flavonoidok bioszintézisének sémája

Alapvázuk ez által a difenil-propán váz (2. ábra), mely 15 szénatomból, 2 aromás és 1 pirán gyűrűből áll. Ezek közül a B gyűrű, valamint a C gyűrűnek 3 szénatomja a fahéjsav vázából származik, azonban az A gyűrűt felépítő szénatomok poliketid eredetűek és az acetát egységek összekapcsolódásával jönnek létre. A flavonoid csoportok oxidációs szintjükben és a C gyűrű szubsztitúciós csoportjaiban különböznek egymástól (flavon, flavonol, flavanon, stb.), míg a csoportokon belüli változatosságot az A és B gyűrű szubsztitúciós mintázata biztosítja (apigenin, kvercetin, heszperetin) (Pietta, 2000). Rendkívüli kémiai sokszínűségüket a B gyűrű lehetséges kapcsolódási helyei csak tovább növelik. A C gyűrű 3. szénatomjához kapcsolódva izoflavonoidok, míg a 4. szénatomjához kapcsolódva neoflavonoidok jöhetnek létre.

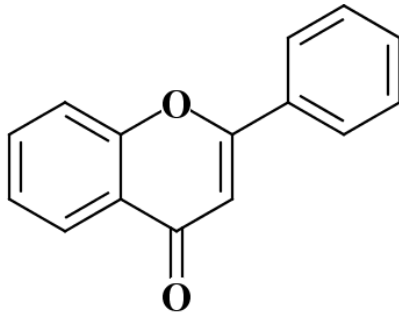
A konkrétan vizsgált vegyületek listája és szerkezeti felépítéseik később szerepelnek az eredmények és megvitatásuk című fejezetben.



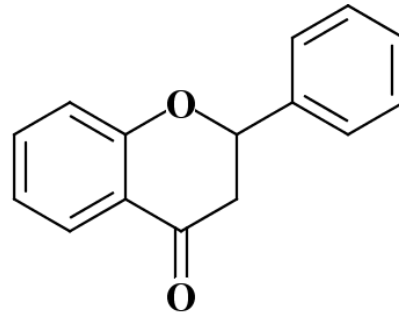
2. ábra
Difenil-propán váz

3.1.2 A fenoloidok csoportosítása

A leggyakoribb flavonok (3. ábra) a luteolin és az apigenin nagy számban találhatóak meg gabonafélékben, zöldségekben (petrezselyem, rozmaring, kakukkfű) és gyógynövényekben (Pietta, 1995), míg hidrogénezett analógjaik a flavanonok (4. ábra) kizárólagosan a citrusfélékre jellemzőek, úgymint naringenin, heszperetin és eriodiktiol, melyeknek magas antioxidáns értékeiről is beszámol az irodalom (Rocco és mtsai., 2014). Aglikonjaik mellett általában 7-O-glükozidokként fordulnak elő (Del Rio és mtsai., 2013; Crozier és mtsai., 2009).

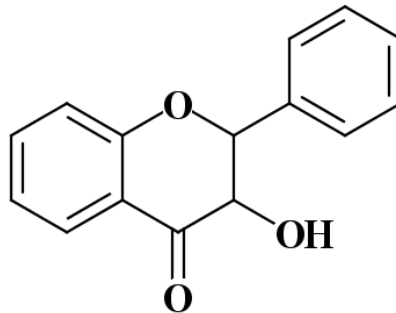


3. ábra
Flavonok



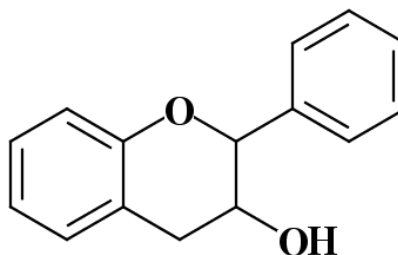
4. ábra
Flavanonok

A flavanonolok vagy dihidroflavan-glükozidok (5. ábra) fungisztatikus és gombaölő hatásukról a legismeretesebbek. Legfontosabb képviselőik a dihidro-kaempferol, dihidro-kvercetin és a dihidro-miricetin (Hegedűs és Stefanovitsné, 2012).



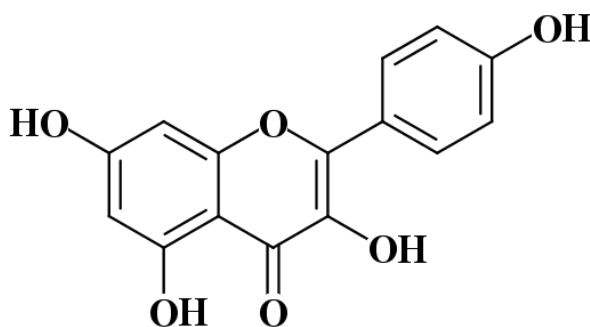
5. ábra
Flavanonolok

A flavanolok (6. ábra) vagy más néven flavan-3-olok, mint a katekin vagy epikatekin, a B gyűrűben, illetve a 3-OH csoport térbeli orientációjában különböznek egymástól. Monomerjeik mellett dimér és trimér polimerjeik formájában fordulnak elő. Megtalálhatóak különböző gyümölcsökben és a zöld, illetve a fekete teában (Hegedűs és Stefanovitsné, 2012).



6. ábra
Flavanolok

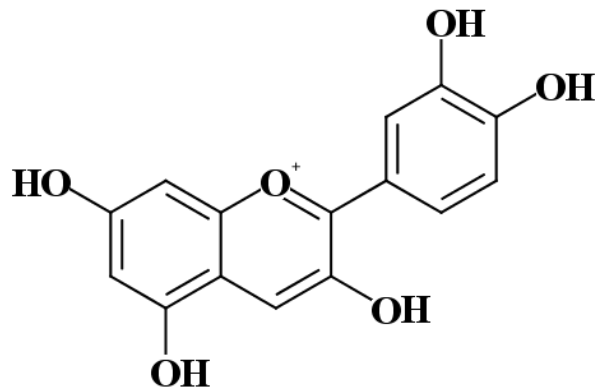
A flavonolok azon kívül, hogy az egyik legsokoldalúbb csoportja a flavonoidoknak, a legnagyobb csoportját is alkotják egyben (7. ábra). Általánosan fordulnak elő a növények különböző részeiben, úgymint a gyümölcsökben, valamint a levelek külsőbb szöveteiben (Herrmann, 1976; Pérez-Illarbe és mtsai., 1992), így ezek antioxidáns paraméterei erősen kutatottak (Re és mtsai., 1999; Pannala és mtsai., 2001; Agati és mtsai., 2012; Firuzi és mtsai., 2005). A kvercetin az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló flavonol vegyület a növényekben (Kähkönen és mtsai., 1999), feltételezett egészségre gyakorolt pozitív hatásaival (Formica és Regelson, 1995). A növényi szervezetekben leggyakrabban 3-O-glükozidokként fordulnak elő, mely által a flavonol alapmolekulához cukorkomponensek kapcsolódhatnak egy -OH csoporton keresztül éterkötéssel, vagy C-C kovalens kötéssel. A leggyakrabban előforduló cukorszármazékok a glükóz, ramnóz és glükuronsav.



7. ábra
Flavonolok

Az antocianidinek (8. ábra) elsősorban pigmentként funkcionáló molekulák, melyek szerkezete a C gyűrű oxidációs fokában tér el a flavonok alapszerkezetétől. Glükozidjaik az antociánok, elsősorban indikátor tulajdonsággal rendelkeznek, ugyanis savas közegben pirosas, míg lúgos közegben kékes színűek. A növényi sejtekben ezt az utóbbi színt nem a magas pH, hanem az antocianidinek bonyolult észterezési-glükozidálási viszonyai, valamint fémionokkal vagy makromolekulákkal alkotott komplexei hozzák létre (Láng, 2007). Az antocianidinekről kimutatták, hogy antioxidáns kapacitás értékeik hasonlóak a jól ismert antioxidánsokéhoz, az aszkorbinsavhoz vagy Troloxhoz (Kähkönen és mtsai., 1999; Frankel és Meyer, 2000).

Az izoflavonoidok a hüvelyesekre (szója, feketebab, csicseriborsó), valamint számos here fajra a jellemzőek.



8. ábra
Antocianidinek

3.1.3 Flavonoidok a szőlőnövény leveleiben

A *Vitis vinifera* L., mint bortermő szőlő kiváló kísérleti növény, ugyanis leveleinek polifenol tartalma magas és a szőlőültetvények klimatikus paraméterei jól nyomon követhetőek. Számos szőlőfajtát termesztenek a világon, melyek sok helyen előfordulnak, azonban csak néhány akad közülük, melyek az egész világon megtalálhatóak. Kísérleteinkhez ezek közül a Pinot noir-t választottuk, mely egy tradicionális, klasszikus bortermő szőlő és Európa szinte minden borvidékén előfordul a mediterrántól a hűvös kontinentális éghajlatig.

A *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir leveleinek összetett flavonoid profilját a kvercetin és kaempferol vegyületek különböző cukor származékai hozzák létre, úgymint kvercetin-3-O-glükozid, kvercetin-3-O-rutinozid, kvercetin-3-O-glükuronsav, kaempferol-3-O-glükozid, kaempferol-3-O-rutinozid és kaempferol-3-O-glükuronsav. Azonban a felsorolt cukorvegyületek mellett a fenolos savak (kaftársav, ferulasav) is jelentős szerepet játszanak a levelek fenolos összetételének kialakításában (Doshi és mtsai., 2006; Katalinic és mtsai., 2009; Csepregi és mtsai., 2016). A magban a flavan-3-olok (katekin, epikatekin), míg a bogyóban az antociánok találhatóak meg nagyobb mennyiségben. Utóbbiak antioxidáns tulajdonságukon kívül a kékszőlő bogyójának pirosas színét eredményezik (Castillo-Munoz és mtsai., 2007).

3.1.4 Reaktív oxigén származékok

A változatos növényi stresszhatások reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezéséhez vezethetnek, úgymint nagy fényintenzitás (Müller-Xing és mtsai., 2014), szárazság (Sanchez-Rodriguez és mtsai., 2010), só stressz (Mittova és mtsai., 2003), alacsony hőmérséklet (Król és mtsai., 2015), nehézfém felhalmozódás (Schützendübel és Polle, 2002), valamint UV sugárzás (Hideg és mtsai., 2013). A ROS-ok egy része szabad gyök, melyek külső elektronhéján egy párosítatlan elektron tartózkodik. Ezeknek a párosítatlan elektronoknak köszönhetően kémiai reaktivitásuk széles skálán változik. Képződésüket tekintve elektron vesztes (kation gyök), illetve elektron nyeres (anion gyök) során jöhetnek létre, valamint a kovalens kötés felbomlásakor, amikor töltés nélküli szabad gyökök keletkezhetnek (Halliwell és Gutteridge, 2007).

Az oxidatív stressz során képződő reaktív vegyületek nem mindegyike gyökös tulajdonságú, azonban összefoglaló néven reaktív oxigén származékoknak hívjuk őket. Az élő szervezetben leggyakrabban előforduló ROS-ok a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$), peroxil (ROO^{\bullet}), alkoxil (RO^{\bullet}), hidroxil (HO^{\bullet}), valamint a nem gyökös tulajdonságú szinglett oxigén (1O_2), hipoklórsav (HOCl), ózon (O_3) vagy hidrogén-peroxid (H_2O_2). A H_2O_2 sejten belüli lokalizációjától vagy koncentrációjától függően képes az oxidatív károsodás előidézésére (Halliwell és Gutteridge, 2007), következésképpen sejten belüli koncentrációjának szabályozásáért az antioxidánsok a felelősek, melyek nagyon fontos szerepet játszanak a növények (Neill és mtsai.; 2002), vagy más életformák életfolyamataiban (Halliwell és Gutteridge, 2007). A növényi szervezetekben a H_2O_2 semlegesítésében az aszkorbinsav, glutation (Noctor és Foyer, 1998), valamint a fenolos savak is részt vehetnek (Kähkönen és mtsai., 1999).

Szabad gyökök a normális életműködés során a kloroplasztiszokban és a mitokondriumokban jönnek létre az elektrontranszport lánc működése közben (Chance és mtsai., 1979; Foyer és mtsai., 1994), valamint a fotorespiráció folyamán a peroxiszómákban (Moller, 2001). Ennek ellenére a növények a reaktív oxigén származékok mennyiségét különböző semlegesítési folyamatok segítségével képesek alacsony szinten tartani (Larson, 1988). Termelődésük az élő szervezetben összefüggésben áll a sejtnövekedés szabályozásával, az intracelluláris jelátvitellel és biológiailag fontos vegyületek szintézisével (Halliwell, 1997, Biczak és mtsai., 2016).

Bizonyos környezeti körülmények hatására a szabad gyökök mennyiségének megemelkedése oxidatív stressz kialakulásához vezethet, károsítva a növények életfunkcióit,

oxidációt előidézve a sejtmembránban, szövetek enzimeiben, valamint a DNS-ben. További negatív tulajdonságaik közé tartozik, hogy az aminosavak oxidálása által gátolják az enzimek működését, lipidperoxidációt idéznek elő, extrém esetben sejthalált okoznak (Pietta, 2000, Rosalie és mtsai., 2015).

A speciális anyagcseretermékek más védelmi utakban is fontos szerepet játszhatnak az oxidatív stressz elleni védelemben, kedvezőtlen környezeti körülmények között. A növények törzsféjlődésük során folyamatosan ki voltak téve különböző kedvezőtlen hatású stressz faktoroknak, melyek kivédésére morfológiai, anatómiai és fiziológiai változásokkal alkalmazkodtak (Kenny és Harrison, 1992; Jenkins, 2009). A nagy fényintenzitás, illetve ultraibolya sugárzás hatására bekövetkező leggyakoribb stresszválasz az UV abszorbeáló pigment tartalom (Liu és mtsai., 1995; Garcia Macias és mtsai., 2007), valamint az antioxidáns tulajdonságú flavonoidok megváltozása (Agati és Tattini, 2010; Majer és mtsai., 2014).

3.2 Antioxidáns rendszerek

Az antioxidáns kutatás napjainkban reformkorát éli, ezért definíciójának ismerete nélkülözhetetlen. Általánosságban elmondható, hogy minden olyan anyag, mely késlelteti vagy gátolja az adott molekula oxidatív károsodását, antioxidánsnak tekinthetjük. A növények számos ilyen vegyület birtokában képesek az oxidatív stressz okozta károsodások kivédésére. Ezeket a vegyületeket két nagy csoportba sorolhatjuk, mint enzimátikus és nem enzimátikus antioxidánsok.

3.2.1 Nem enzimátikus antioxidánsok

A növények számos, relatíve alacsony molekulatömeggel rendelkező vegyületet szintetizálnak, melyek a védelmi rendszer egyik fő részét képezik. Működésük során gyakran alakulnak át gyökös vegyületekké, mint a koenzim Q (CoQ), mely a mitokondriális elektrontranszport esszenciális eleme. Redoxi kémiai folyamatok során alakul át gyökös természetű ubiszemikinonná (CoQH[•]), melyek egyéb sejtmembránokban és lipoproteinekben is megtalálhatóak. A növényi anyagcsere folyamán képződő intermedierek, mint például a ketosavak (piruvát, glioxalát, α -ketoglutársav), H₂O₂ semlegesítőként viselkedhetnek megvilágított zöld levelek peroxiszómáiban (Halliwell és Gutteridge, 2007).

Az aszkorbinsav (ASA) egy erősen vízdékony, tisztított formában fehér kristályos vegyület, mely kulcsfontosságú szerepet tölt be az aszkorbát-glutation ciklusban, mint antioxidáns enzimek kofaktora (Foyer és Noctor, 2011). A gyöksemlegesítésen kívül jelentős szerepet tölt be más antioxidáns tulajdonságú vegyületek regenerációjában. ROS semlegesítő reakciókban az ASA oxidációja révén képes regenerálni a flavonoid-gyököket, ez által enzimatis vagy nem enzimatis reakciókban állítódva helyre (Pérez és mtsai., 2002).

A tokoferolok lipidoldékony, membránhoz kötött E-vitamin analógok, melyek karakterisztikáját a hidrofób tulajdonságú kromán gyűrű, illetve az izoprén oldalláncok alakítják ki. Magasabb rendű növények plasztisztaiban, valamint néhány cianobaktériumban találhatóak meg, védelmet biztosítva a lipidperoxidáció ellen. A kromán gyűrű oxidációja révén képes tokoferoxil-gyökké alakulni, ezáltal gátolva a lipidperoxidációt, a lipidperoxil-gyökök semlegesítésével (Smirnoff, 2007).

A karotinoidok a fotoszintetizáló szervezetekben megtalálható kísérő pigmentek, melyek sárgák, pirosak vagy narancssárgák lehetnek. 40 C-atomos poliizoprének, melyek konjugált kettős kötések tartalmazznak. Szerkezetükből adódóan hidrofóbok, vízben teljesen oldhatatlanok. Közvetlen módon képesek reakcióba lépni az $O_2^{\bullet-}$ -al és más szabad gyökökkel (Krinsky és Yeum, 2003), hatástalanítva azokat. Védő szerepük a xantofill ciklus révén is érvényesülhet (Láng, 2007).

A nem enzimatis antioxidánsok legnagyobb csoportját a növényi fenoloidok alkotják, melyek legalább egy benzol gyűrűhöz kapcsolódó hidroxil (-OH) csoportot tartalmazznak. A meglévő aromás gyűrűhöz kapcsolódó -OH csoportok számától függően megkülönböztetünk mono-, di- és polifenolokat. Antioxidánsokként működve gátolják a lipidperoxidációt és semlegesítik a gyökös tulajdonságú vegyületeket (HO^{\bullet} , NO_2^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$), valamint egyéb reaktív származékokat, úgymint ONOOH, vagy HOCl. A fenolok többsége két szomszédos -OH csoporttal, vagy kelátképződéssel képes átmeneti fémionok (vas, réz) megkötésére is (Rice-Evans és mtsai., 1997; Brown és mtsai., 1998; Mira és mtsai., 2002).

3.2.2 Enzimatis antioxidánsok

Az oxidatív károsodást megelőző védelmi vonal másik részét az enzimatis antioxidánsok képezik.

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) attól függően, hogy hol fordul elő és milyen fémeket tartalmaz, megkülönböztetünk réz/cink, mangán és vas tartalmú SOD-ot. Néhány cianobaktériumban azonban nikkel tartalmú SOD található, melynek szerkezete különbözik a

fent említett enzimikus antioxidánsokétól. Legfontosabb feladatuk, hogy katalizálják az $O_2^{\bullet-}$ semlegesítését (Fridovich, 1986). Előfordulásukat tekintve a kloroplasztisban, mitokondriumban, glioxiszómában, peroxiszómában és az apoplasztban találhatóak (Alscher és mtsai., 2002).

Az $O_2^{\bullet-}$ semlegesítése az oxidáló enzimek működése során H_2O_2 -t termel, melynek hatástalanítása különböző reakcióutakon mehet végbe, különféle enzimek segítségével. A katalázok elektron donor nélkül, direkt módon képesek a H_2O_2 -t alapállapotú oxigénre és vízre bontani, ($2H_2O_2 - 2H_2O + O_2$). Olyan általánosan előforduló növényi antioxidáns tulajdonságú enzimek, melyek négy alegységből épülnek fel, általában vas tartalmúak és főként a peroxiszómákban fordulnak elő (Mhamdi és mtsai., 2012).

A peroxidázok olyan hem prosztetikus csoportot tartalmazó enzimek, melyek fontos szerepet játszanak fejlődés-, illetve növényélettani folyamatokban (Bela és mtsai., 2015). Részt vesznek a keletkezett H_2O_2 lebontásában, melyet egy oxidáló szubsztrát segítségével redukálnak vízzé ($SH_2 + H_2O_2 - S + 2H_2O$). Előfordulásukat tekintve az összes olyan növényi kompartmentben megtalálhatóak, ahol H_2O_2 keletkezhet. Napsugárzás hatására a legjellemzőbb H_2O_2 keletkezési hely a kloroplasztisz (Cheeseman, 2006), ahol egyéb peroxidázok mellett az aszkorbát-peroxidáz végzi a semlegesítést, az aszkorbát-glutation ciklusban (Foyer és Halliwell, 1976; Asada, 1992).

A peroxidázoknak egy csoportját fenolos peroxidázoknak nevezzük, ugyanis fenolos vegyületeket, flavonoidokat használnak szubsztrátként a H_2O_2 szintjének csökkentésére (Pérez és mtsai., 2002; Van Doorn és Ketsa, 2014), fontos szerepet játszva az UV védelemben (Jansen és mtsai., 2001).

3.3 Antioxidáns kapacitások vizsgálata

Az előző fejezetekben tárgyaltak szerint, az antioxidáns kapacitás megváltozása jellemezheti a növény stressz válaszát, a sikeres alkalmazkodást vagy a károsító oxidatív stressz kialakulását. Az egy fajta ROS semlegesítésére alkalmas enzimek mellett a nem enzimikus, teljes antioxidáns kapacitások (TAC) mérése is lehetséges, melyek meghatározása viszonylag gyorsan kivitelezhető. A TAC módszerek az antiradikális tulajdonságot mérik szintetikus szabad gyököket vagy fém ionokat használva, úgymint Fe^{3+} vagy Cu^{2+} komplexeket. A módszerek gyöksemlegesítő reakciói a fenolos vegyületek hidroxil csoportjaiból történő hidrogén (HAT), illetve elektron transzferen (ET) alapulnak (Huang és mtsai., 2005).

Az antioxidáns mérésekhez leggyakrabban alkalmazott szabad gyökök az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök (DPPH[•]) és a 2,2-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav gyök (ABTS^{•+}) (Re és mtsai., 1999). A vasredukáló képességen alapuló módszer alapjait a vérplazma antioxidáns kapacitásának mérésére tervezték (Benzie és Strain, 1996), azonban növényi kivonatokra is sikerült adaptálni (Szöllősi és Szöllősi-Varga, 2002). Míg az ABTS^{•+} kioltásán és a vasredukáló képességen alapuló módszerek ET reakciókként ismeretesek, addig a DPPH[•] semlegesítő eljárás ennél lényegesen komplexebb. Kísérleti eredmények támasztják alá a HAT (Goupy és mtsai., 2003) és az ET reakcióutakat polifenolok és a DPPH[•] között (Foti és mtsai., 2004), mely által a leginkább elfogadott leírás a lejátszódó reakcióra a protonkapcsolt elektron transzfer (Foti, 2015).

A TAC módszerek nem csak szubsztrátjaikban különböznek egymástól, hanem a reakció körülményeinek és kvantifikációjának módjában is. Ezért szükségszerű a standardizálásuk mind az élelmiszertudományokban (Frankel és Meyer, 2000), a farmakológiában (Clarke és mtsai., 2013) és az orvosi kémiában (Huang és mtsai., 2005) egyaránt. A probléma megoldásához a teljes fenolok mérésének módszerét javasolják (Singleton és Rossi, 1965; Singleton és mtsai., 1999) a polifenolok elektron transzferén alapuló Folin-Ciocalteu módszerrel (Folin és Ciocalteu, 1927), ugyanis ez az eljárás viszonylag könnyen és gyorsan elvégezhető (Huang és mtsai., 2005). Különböző vizsgálatok trópusi növények eltérő antioxidáns aktivitását értékelték és arra a következtetésre jutottak, hogy a TAC értékek erősen redundánsak, ezért elegendőnek tartották egyetlen módszer, a DPPH[•] semlegesítésén alapuló eljárást alkalmazni limitált mintamennyiségű kísérletekben (Clarke és mtsai., 2013).

A fenoloid profil megállapítására a HPLC-MS (Neugart és mtsai., 2012) mellett különböző spektrofotométeres módszerek is léteznek, melyek azonban kémiaiilag kevésbé specifikusak, viszont gyorsan kivitelezhetőek és jól reprodukálhatóak. Általános, hogy ezek az eljárások az irodalomban rendkívül elterjedtek, viszont nem szabad őket flavonoid specifikus módszerként kezelni. A vizsgált levelek HPLC profilja mellett spektrofotométeres fenoloid csoportokat azonosító, specifikus mérési eljárásokat is megvizsgáltunk, melyekről megállapítottuk, hogy többségük az általánosan leírtakhoz képest korrekcióra szorul.

4. Célkitűzések

Munkánk során a bortermő szőlő napfényhez való alkalmazkodását vizsgáltuk, melyhez a levelek fenoloid és antioxidáns profiljának ismerete nélkülözhetetlen. Ehhez célul tűztük ki, hogy

- gyors, könnyen reprodukálható analitikai módszereket találjunk, melyekkel mérhetővé és értékelhetővé tesszük levélmintáink flavonoid csoportjait
- a tesztvegyületek mérései során kapott eredmények segítségével tanulmányozzuk különböző fenoloidok antioxidáns tulajdonságait, többféle teljes és specifikus kapacitást mérő módszerekkel
- megvizsgáljuk szőlőlevelek speciális anyagcsere termékeinek összetételét HPLC-MS módszerrel, és az eredményeket összehasonlíthatjuk az antioxidáns kapacitás értékekkel

A fenoloidok szerkezete, mint ahogyan az irodalmi bevezetőben olvashattuk, rendkívül változatos. Ezért azt terveztük, hogy

- megvizsgáljuk a flavonoidok szerkezet-hatás összefüggéseit: hogyan befolyásolja szerkezetük az antioxidáns tulajdonságokat
- a flavonoidokkal párhuzamosan a fenolos savak (hidroxibenzoésavak, hidroxifahéjsavak) paramétereit is megmérjük, hasonló összefüggéseket keresve, mint a flavonoidoknál

A napsugárzás a levelekben mind a $^1\text{O}_2$, mind a H_2O_2 mennyiségének megemelésével oxidatív stresszt indukálhat, melynek kivédésében fontos szerep jut az UV abszorbeáló és a specifikus szabad gyök kioltó vegyületeknek. Munkánk során szerettük volna megállapítani, hogy

- a különböző flavonoidok, illetve fenolos savak között melyek lehetnek felelősek a levelek specifikus ROS semlegesítéséért, vagy az UV abszorbeálásáért
- ezeknek a vegyületeknek a szerkezete hogyan befolyásolja a semlegesítés vagy abszorbeálás tulajdonságát

A dolgozat kitér az eltérő klimatikus körülmények között nevelkedett szőlő leveleinek a tanulmányozására, hogy megtudjuk

- hogyan befolyásolja a növényeket ért fotoszintetikusan aktív fény, UV sugárzás, hőmérséklet és csapadékösszeg a levelek antioxidáns, illetve UV abszorbeáló képességét

- hogyan befolyásolják a fenoloidok a szőlőnövény napfényhez történő alkalmazkodását
- a környezeti változásokhoz alkalmazkodás során van-e kapcsolat a levelek UV (UV-A, UV-B) abszorbeáló képességének és antioxidáns kapacitásának változása között

A munkánk során használt tesztvegyületek és a szőlőlevél kivonatok mérései feltételezhetően lehetővé teszik az irodalomból ismert spektrofotométeres flavonoid mérő módszerek és a HPLC-MS közti összefüggések vizsgálatát, hogy felülvizsgáljuk az egyszerűbb és kevésbé költséges fotométeres eljárások szelektivitását.

5. Anyag és módszer

5.1 Szőlőlevél minták

A *Vitis vinifera* L., vagyis a bortermő szőlő ideális teszt növény, ugyanis leveleinek polifenoltartalma magas és a szőlőültetvények klimatikus paraméterei jól nyomon követhetőek. Számos szőlőfajtát termesztenek a világon, azonban csak néhány akad közöttük, mely a mediterrán éghajlattól a hűvös kontinentális éghajlatig előfordul. Kísérleteinkhez ezért a *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noirt választottuk, mely azon kívül, hogy egy tradicionális, klasszikus bortermő szőlő, a szőlészek és borászok között is nagyon népszerű magas hozama, korai szüretelhetősége, jó alkalmazkodóképessége, valamint széles körben való elterjedtsége miatt.

A leveleket Pécsen a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetében gyűjtöttük, ezen felül egy nemzetközi kooperáció (COST Action UV4growth) keretében további 11 európai szőlészetből is kaptunk leveleket. A levelek begyűjtése valamennyi helyszínen egy élettani szempontból jól meghatározott időpontban, a zsendüléskor történt (Bényei és mtsai., 1999), teljes napsütésben, délben. A zsendülés időszaka pontosan meghatározható, több napos időszakra korlátozódik. Annak alapján állapítható meg, mikor a szőlőbogyók már elérik a fajtára jellemző nagyságot, elkezdenek puhulni és színesedni a fürtzáródás fenofázist követően, de még nem teljesen érettek.

Minden szőlészetből 3 minta származott. A többi helyszínhez hasonlóan, a pécsi mintavétel folyamán is 3 különböző tőkéről gyűjtöttünk 15 db levélmintát úgy, hogy minden tőkéről 5 db-ot szedtünk. A minta előkészítés folyamán az ugyanazon tőkéről származó 5 levelet együttesen dolgoztuk fel. Ez biztosított elegendő mennyiségű anyagot ahhoz, hogy valamennyi (HPLC, antioxidáns és UV abszorbeáló kapacitás) mérést el lehessen végezni ugyanazon a mintán. Egy adott mérési eljárás esetében a 3 különböző tőkéről származó mérés átlaga jellemezte az adott területről származó leveleket, így egy vizsgált paraméter vonatkozásában a 12 szőlészetből ugyanabban az évben 12 adatpontunk volt, valamennyi 3 biológiai ismétlés átlaga. A begyűjtés után a levelek azonnal cseppfolyós nitrogénbe kerültek, laboratóriumunkba pedig liofilizált formában érkeztek. A mintagyűjtést két egymást követő évben megismételtük.

5.2 Minta előkészítés

A szőlő leveleit a liofilizálás (fagyasztva szárítás) után finom porrá őrölve, a mérés kezdetéig szobahőmérsékleten, fénytől védve, sötét helyen tároltuk. A spektrofotométeres mérések levélkivonataihoz etil-alkoholt (EtOH), míg a HPLC-MS mérések levélkivonataihoz metil-alkoholt (MeOH) használtunk a jobb elválasztás érdekében.

Az antioxidáns mérések során alkalmazott tesztvegyületeket (Extrasynthase, Lyon, France), abszolút EtOH-al elegyítettük. A fenolos tulajdonságú vegyületek többsége jól oldódik abszolút EtOH-ban, azonban a nehezen vagy rosszul elegyedőket (heszperidin, izoramnetin, hiperozid, miricetin-3-O-glükozid) abszolút EtOH és dimetil-szulfoxid (DMSO) hozzáadásával oldottuk fel, ugyanis ez a szerves oldószer önmagában nem reagál az antioxidáns módszerek reagenseivel, a kiértékelést nem befolyásolta. A tesztvegyületek és a levél extraktumok méréseihez használt kivonatokat egyaránt a vizsgálatok megkezdéséig fagyasztó szekrényben, -20°C -on tároltuk.

5.3 HPLC-MS analízis

A Pinot noir levelek HPLC-MS analízisét Németországban, a grossbeereni Leibniz Institute-ban végeztük a COST Action UV4growth nemzetközi együttműködés keretében. Az analízishez szükséges kivonat készítés során 20 mg száraz anyagot oldottunk fel 600 μL MeOH-ban (60%). Ez az első extrakció 30 percig tartott, melyet 10 perc (12100 x g) centrifugálás követett. A csapadék frakciók további második (20 perc+centrifugálás) és harmadik (10 perc+centrifugálás) extrakciója 400 μL és 200 μL MeOH hozzáadásával történt. Az összegyűjtött felülúszót bepároltuk, majd 200 μL desztillált vízben újra feloldottuk, végül PTFE filteren (0.20 μm) átszűrtük.

A vizsgált fenolos tulajdonságú vegyületek analízise az eredeti procedúrához képest módosításokkal valósult meg. A szétválasztás Supelco Ascentis Express F5 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) oszlopon, illetve egy C18 (4mm x 4.6 mm, 5 μm , 100 Å) előtétoszlopon ment végbe, egy Agilent 1100 HPLC-DAD-ESI-MS készülék segítségével. A vegyületek szétválasztása 30°C -on, két fajta eluens ((A: víz (99.5% víz és 0.5% ecetsav), B: acetonitril)) segítségével történt 0.85 mL perc^{-1} áramlási sebesség mellett, az alábbi gradienst alkalmazva. B eluens 5-12% (0-3 perc), 12-25% (3-46 perc), 25-90% (46-49.5 perc), 90% izokratikus (49.5-52), 90-5% (52-52.7 perc) végül 5% izokratikus (52.7-59 perc). A detektornak a

pásztázó hullámhosszai 320, 330 és 370 nm-re voltak beállítva. A mennyiségi vizsgálat negatív ionizációs módban, ESI ionforrás segítségével történt. A tömeg spektrométer ion optikája pedig kvercetinre volt kalibrálva (Neugart és mtsai., 2012).

5.4 Antioxidáns kapacitás vizsgálatok

5.4.1. Vasredukáló képességen alapuló antioxidáns kapacitás mérés (FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power)

A mérési elv a mintában lévő antioxidánsok vasredukáló képességén alapszik, melyben a vas (III) ionok vas (II) ionokká redukálódnak az antioxidáns tulajdonságú vegyületek hatására, kékes színű terméket eredményezve (Benzie és Strain, 1996). A vizsgálatokat az eredeti módszer módosításaival végeztük el (Szöllősi és Szöllősi-Varga, 2002), ami alapján a FRAP reagens 25 mL acetát puffer (300 mM, pH 3.6), 2.5 mL 2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ) oldat (10mM TPTZ feloldva 40 mM HCl-ben) és 2.5 mL FeCl₃ (20 mM FeCl₃ feloldva desztillált vízben) oldat hozzáadásával készült. 190 µL FRAP reagenshez hozzáadtuk a 10 µL megfelelően kihígított kivonatot. A mérés 620 nm hullámhosszúságon (Multiskan FC plate reader, Thermo Fischer Scientific, Shanghai, China) történt, 30 perces szobahőmérsékletű inkubáció után. A módszer tradicionális kalibrálását ASA-al végeztük.

5.4.2. ABTS^{•+} semlegesítésén alapuló antioxidáns kapacitás mérés (TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

A módszer a 2,2-azino-bisz-3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav kation gyök (ABTS^{•+}) oxidációján alapszik (Re és mtsai., 1999). Első lépésként ezt a szintetikus kation gyököt hoztuk létre 19.4 mL foszfát pufferben (50 mM, pH 6), 200µL ABTS (10 mM ABTS feloldva EtOH-ban), 200 µL peroxidáz enzim (HRP) (0.0125 mU HRP feloldva 50 mM foszfát pufferben) és 200 µL H₂O₂ (100 mM) hozzáadásával. A 15 perces szobahőmérsékletű inkubáció során az ABTS^{•+} kialakulását annak kékeszöld színe jelezte. Az így elkészített TEAC reagenshez adott levélkivonat vagy más antioxidáns a kation gyök oxidációjával csökkenti az oldat abszorpcióját. A mérendő kivonatok és a kékeszöld színű TEAC reagens elegyítését követően meghatároztuk az ABTS^{•+} csökkenését, 651 nm hullámhosszon történő abszorpció méréssel. A kalibráció 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-kromán-2-karboxilsav (Trolox)

segítségével történik, mely az E vitamin vízdékony analógja és antioxidáns kapacitás mérések széles körben elterjedt kalibrálószerre.

5.4.3. DPPH[•] semlegesítésen alapuló antioxidáns kapacitás mérés

Az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök (DPPH[•]) ibolyakék színű oldatának elszíntelenedésén alapuló mérése az egyik legrégebbi antioxidáns kapacitást mérő módszerek közé sorolható (Blois, 1958). Reakciókinetikáját tekintve sokáig vitatott volt elektrontranszferen alapuló működése, mostanra viszont széles körben elterjedt teória a reakció mechanizmusára a proton-kapcsolt elektrontranszfer (Foti, 2015). A mérés során 0.75 mM DPPH[•]-t MeOH-ban feloldottunk, melyet acetát pufferben tovább hígítottunk (100 mM, pH 5.5). A 20 µL kivonathoz hozzáadott 180 µL DPPH[•] oldatot 30 percig 37°C hőmérsékleten inkubáltuk majd annak színváltozását figyeltük 517 nm hullámhosszon. A kalibráció a FRAP módszerhez hasonlóan, hagyományosan ASA-val történt.

5.4.4. H₂O₂ semlegesítő képesség

A módszer a kálium-jodid (KI) oxidációján alapszik, azonban a jód (I₂) abszorpció maximuma helyett (Junglee és mtsai., 2014) a reakciót 405 nm hullámhosszon értékeljük, ugyanis ebben a tartományban a vegyületek magas UV abszorpciója kevésbé zavaró (Csepregi és mtsai., 2016). A KI oldat (0.85 M) elkészítése kálium-foszfát pufferben (100 mM, pH 7) történik, melynek 140 µL-éhez 10 µL mintát, végül 50 µL H₂O₂-t adunk. A H₂O₂ (25 µM) hozzáadása után narancssárga színreakciót figyelhetünk meg, amit egy 405 nm-en történő abszorpció kétszeri (0 és 3 perc) mérésével jellemezhetünk, ezáltal az abszorpciócsökkenés arányaiból következtethetünk az antioxidáns aktivitás mértékére. A mintának több különböző koncentrációjú oldatsorozatával kiszámítható annak 50%-os gátló koncentrációja (IC₅₀), melyet Trolox ekvivalensben fejeztünk ki.

5.4.5. ¹O₂ semlegesítő képesség

A ¹O₂ semlegesítő antioxidáns tulajdonság mérése az 1,3-difenil-izobenzofurán (DPBF) oxidációján alapszik (Zhang és Li., 2011). A módszer egyik legfontosabb része a MeOH és desztillált víz arányának (70: 30) megtartása az egész reakció során. A mérést

szűkített küvetében végeztük desztillált víz, MeOH és az előre elkészített metilénkék, valamint DPBF törzsoldatokkal, ahol a DPBF 100 μM , míg a metilénkéknek 20 μM a végkoncentrációja. A DPBF optikai denzitásának mérése 410 nm hullámhosszon (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) történik megvilágítás nélkül, majd a metilénkékből fotodinámiás úton szinglett oxigént keltő 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton fluxus sűrűségű vörös fényel (Schott KL 1500 LCD, Fehraltorf, Switzerland). A DPBF oxidációjának mértéke kiszámítható az abszorpció csökkenésének mértékéből. Amennyiben a mérőelegy más, $^1\text{O}_2$ reaktív anyagot is tartalmaz (növényi mintát vagy más antioxidáns vegyületet), az csökkenti a DPBF oxidációjának mértékét. A vizsgált minta koncentrációsorozatával kiszámítható annak 50%-os gátló koncentrációja (IC_{50}), melyet a Trolox IC_{50} értékéhez viszonyítottunk.

5.5 Flavonoid meghatározás spektrofotométerrel

Számos módszer létezik az irodalomban különböző flavonoid csoportok vagy éppen teljes flavonoid tartalom meghatározására. Munkánk során több mérési eljárással dolgoztunk, azonban néhol elengedhetetlen volt a módosítások elvégzése a növényminták értékelhetősége szempontjából. A kapott adatok tájékoztató jellegűek, megbízhatóságuk nem vethető össze a HPLC analízissel, azonban egyszerű és olcsó módszerekről van szó, melyek jól reprodukálható eredményeket adnak, ezáltal támpontot szolgáltatva a vizsgálni kívánt mintáról.

5.5.1 Folin-Ciocalteu reaktivitás (FCR, Folin - Ciocalteu Reactivity)

A teljes polifenol tartalom meghatározás Folin-Ciocalteu (FC) reagenssel történik (Folin és Ciocalteu, 1927) az eredeti módszer (Singleton és Rossi, 1965) módosításával (Csepregi és mtsai., 2013). A 20 μL mintához 90 μL (1:10 arányban desztillált vízzel hígított) FC reagenst adunk, majd 5 perc múlva hozzáadunk további 90 μL Na_2CO_3 (6% w/v) oldatot. A szobahőmérsékleten történő 90 perces inkubációt követően megmérjük az oldat abszorbanciáját 651 nm hullámhosszon. A reakcióban az FC reagens molibdén (VI) ionja a kivonatban előforduló antioxidáns tulajdonságú vegyületektől elektront vesz fel, létrehozva a kékes színű molibdén (V) iont. Ez által egy elektrontranszferen alapuló antioxidáns kapacitás mérés válik lehetővé, mely nem csak a polifenolok, hanem az összes, a FC-nak

elektronátadásra képes antioxidáns tulajdonságú vegyület vizsgálatára alkalmas. A kalibrációs görbét galluszsav (GAA) oldatával készítettük, a fenti módszert alkalmazva. A koncentrációt galluszsav ekvivalens egységben kifejezve adtuk meg (Velioglu és mtsai., 1998).

5.5.2 Flavanol tartalom meghatározás

A 4-dimetilamino-fahéjaldehid (DMACA) reagens segítségével színes kondenzációs termékek jönnek létre flavan-3-olok jelenlétében. Különböző indolok vagy terpének is képesek reagálni a DMACA vegyülettel, azonban gyenge reaktivitást mutatnak (Treutter, 1989; Di Stefano és mtsai., 1989). A DMACA oldódását elősegítve savas EtOH-os oldószert használtunk (EtOH: H₂O: HCl 70:29:1 v:v:v) a mérésekhez, melyben 930 µL DMACA (0,1 % w/v) oldatot elegyítettünk 70 µL kivonattal. A 30 perc és 30°C-os vízfürdön történő inkubálás után, a reakció során keletkező színes kondenzációs termékek abszorbanciáját 640 nm hullámhosszon olvastuk le. A DMACA-val vizsgált minták reaktivitását katekin ekvivalens egységben fejeztük ki.

5.5.3 Teljes flavonoid tartalom meghatározás alumínium-kloriddal

Magas polifenoltartalmú minták (pl. bor, szőlőlevél kivonatok) teljes flavonoid tartalmának meghatározására a legelterjedtebb eljárás az AlCl₃ módszer, mely egy stabil komplex kialakulásán alapuló színreakció (Ivanova és mtsai., 2010). A reakcióelegy 300 µL NaNO₂ oldat (5% w/v), 400 µL desztillált víz és 100 µL vizsgálni kívánt minta keverékéből áll, melyet 5 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. Ezután 30 µL AlCl₃ oldatot (10% w/v) adtunk hozzá, majd újra inkubáltuk 5 percig és hozzáadtunk 200 µL NaOH oldatot (1M) és 240 µL desztillált vizet. Végül a minta abszorpcióját 510 nm hullámhosszon olvastuk le (Zhishen és mtsai., 1999) és a minta reaktivitását kvercetin ekvivalens egységben határoztuk meg.

5.5.4 Teljes flavonoid tartalom meghatározás 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal

Annak érdekében, hogy ez a módszer alkalmazható legyen a mintáinkra és összehasonlítható legyen a már felsorolt mérési technikákkal, az eredeti módszerhez képest (Chang és mtsai., 2002; Nagy és Grancai, 1996) változtatást kellett alkalmaznunk a DNPH

oldószerének arányában, ugyanis a DNPH oldhatósága EtOH-ban sokkal gyengébb, mint MeOH-ban. A 100 μL tesztelni kívánt mintát összekevertük 200 μL DNPH (0,2% w/v MeOH-ban) és 200 μL EtOH: H_2O (70:30 w/v) oldószer elegyével, majd pontosan 50 percig 50°C-on inkubáltuk vízfürdőben. Ezt követően hozzáadtunk 500 μL KOH (1% w/v) oldatot és 10 percig centrifugáltuk, már az eredeti módszer szerint. A keletkező színes termék abszorpciós spektrumának maximuma 430 nm, így ezen a hullámhosszon történt a mérés, naringenin ekvivalens egységre kalibrálva.

5.5.5 UV abszorbeáló pigment mennyiség meghatározás

A szakirodalom az UV abszorbeáló tulajdonságot előszeretettel használja a fenolos tulajdonságú anyagok jellemzésére különféle oldószerekben, úgymint savas EtOH (Arnous és mtsai., 2001; Poudel és mtsai., 2008), aceton (Ivanova és mtsai., 2010) vagy desztillált víz (Kosar és mtsai, 2007). Munkánk során a vizsgálni kívánt mintákat savas EtOH elegyével hígítottuk és mértük meg abszorpciós spektrumukat 280-400 nm között. Reagenst nem használtunk a mérésnél, csak a minta saját abszorpcióját mértük. A spektrofotométerrel megmért görbe alatti területet az UV-A (315-400 nm) és UV-B (280-315 nm) tartományban külön-külön határoztuk meg és az integrált abszorpciós értékeket a tartományok szélességével (85, illetve 35 nm) elosztva jellemeztük a minta UV abszorbeáló képességét. A vizsgált testvegyületeket ennek megfelelően az integrált UV-A vagy UV-B abszorpció $\text{mM}^{-1} \text{nm}^{-1}$ adatokkal jellemeztük. A levélkivonatok abszorpcióját kvercetin ekvivalens egységben kifejezve adtuk meg, száraz tömegükre viszonyítva.

5.6 Statisztikai módszerek

A dolgozatban szereplő tiszta hatóanyagokat vizsgáló méréseket háromszori (technikai) ismétlésben végeztük el. Ezekben a vizsgálatokban az egyes vegyületeket jellemző átlagos értékek összehasonlítására nem került sor, az ezeket tartalmazó teljes adatsorokat hasonlítottuk össze a módszerek illetve a szerkezet-hatás vizsgálatok során. A levélminták esetében az 5.1-5.2 fejezetben leírtak szerint három biológiai ismétlésben gyűjtöttünk mintákat. Egy biológiai minta 5 levelet tartalmazott, ezeket egybegyűjtve dolgoztuk fel és egy mérési adat tartozott hozzájuk. A szőlőlevél mintákat a három biológiai minta adatainak átlaga és standard deviációja jellemezte. Az átlagokat a normál eloszlású minták esetében

kétmintás t-próbával, míg a normál eloszlást nem követők esetében Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze. A normalitás ellenőrzésére Shapiro-Wilk próbát használtunk.

Az antioxidáns kapacitás vizsgálatok eredményei közötti összefüggések vizsgálatára a Pearson féle korrelációs koefficiens (R) használtuk, és azokat a korrelációs koefficienseket tekintettük szignifikánsnak, melyeknél a hipotézis vizsgálat során kapott p érték kisebb volt, mint 0.05. A TAC módszerek eredményeinek páronkénti összehasonlításához lineáris regresszió analízist alkalmaztunk, ahol a lineáris illeszkedés jóságát a determinációs együttható (R^2) és a t-teszt p értéke mutatta. A TAC módszerek összehasonlítására a Bland-Altman és Passing-Bablok eljárásokat használtunk (részletek a Függelékben). A Bland-Altman próba azokat a módszereket tekinti hasonlóknak, melyek esetében a két különböző módszerrel ugyanazon mintán mért adatok különbségeinek átlaga nem tér el jelentősen nullától (Bland és Altman, 1986). Az ezt a kritériumot $p > 0.05$ szinten teljesítő TAC módszer párokat Passing-Bablok eljárással is megvizsgáltuk. Itt a módszerek azonosságának kritériuma, hogy a két különböző módszerrel mért adatpárookra illesztett regressziós egyenes meredekségének konfidencia intervalluma tartalmazza az 1-et, tengelymetszetének konfidencia intervalluma pedig a 0-t (Passing és Bablok, 1983).

A szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatait TAC módszerenként külön-külön végeztük el egyfaktoros ANOVA segítségével, faktorként az egyes szerkezeti elemek meglétét vagy hiányát használva. Az összehasonlítás elvégezhető úgy is, hogy a tesztvegyületeket két csoportba osztjuk aszerint, hogy tartalmazták vagy sem a vizsgált szerkezeti elemet, és a két csoportra jellemző tulajdonság (pl. antioxidáns kapacitás értékek) átlagait hasonlítjuk össze kétmintás t-próbával vagy Mann-Whitney teszttel. A szignifikáns p érték ($p < 0.05$) azt mutatta, hogy az adott szerkezeti elem hatással van a vizsgált tulajdonságra.

A számításokat Microsoft Excel és PAST programokkal, a Bland-Altman és Passing-Bablok eljárásokat MedCalc programmal végeztük.

6. Eredmények és megvitatásuk

6.1 Flavonoid mennyiséget mérő eljárások szelektivitásának vizsgálata

6.1.1 Kromofórok abszorpcióján alapuló eljárások

A fenolos tulajdonságú vegyületek nélkülözhetetlen összetevői a növényi sejteknek. Lényeges fizikai, kémiai, illetve biokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek közé tartozik a védelem a nagy intenzitású napsugárzással szemben (UV és látható tartomány), illetve a keletkezett ROS-ok semlegesítése (Berli és mtsai., 2008; Berli és mtsai., 2011; Pietta, 2000; Torel és mtsai., 1986). Az antioxidáns tulajdonság kutatásai jóval túlmutatnak a növényélettan témakörén, magába foglalva az élelmiszer kémiát és táplálkozástudományt (Hollman és Arts, 2000; Iacopini és mtsai., 2008; Leifert és Abeywardena, 2008; Monagas és mtsai., 2006).

A fenolos vegyületek stresszválaszokban betöltött szerepe, valamint egyéb tulajdonságainak vizsgálata igazán érdekes. A szerkezetileg hasonló felépítésű fenoloidok tartalom meghatározása spektrofotométeres eljárásokkal, minden bizonnyal értékes kiegészítése lehet más növényfiziológiai paramétereknek. A növényi fenoloidok egy rendkívül gazdag csoportja a növényi speciális anyagcseretermékeknek, mely azonosítása a nagyfokú szerkezeti hasonlóság miatt különféle folyadékkromatográfiás eljárásokkal a legcélszerűbb. Az azonos kémiai alapszerkezettel rendelkező vegyületek 1-1 csoportjának teljes mennyisége olcsóbb és egyszerűbb módszerekkel, például különféle spektrofotométeres eljárásokkal is meghatározható, azonban ezek mérési eredményei gyakran félreértelmezhetőek. A probléma fő forrása a vizsgálatok eredményeinek a túlértékelése és hozzárendelése egyes vegyületekhez, vegyület csoportok helyett. Másik hibaforrás a különböző fotométeres eljárások eredményeinek összehasonlításakor a különböző szerves oldószerek használata, figyelmen kívül hagyva a fenolos vegyületek oldhatóságát növényi anyagból (Ivanova és mtsai., 2010).

Munkánk egyik célja a fenolos vegyületek különféle csoportjainak azonosítására alkalmazott spektrofotométeres eljárások összehasonlítása, ezek keresztreaktivitásainak vizsgálata, valamint optimalizálása. Annak érdekében, hogy ezek az összehasonlítások megvalósíthatóak legyenek, minden vizsgálatban ugyanazt az oldószert használtuk.

A legismertebb biológiai eljárások közé tartozik a témában a Folin-Denis vagy más néven Folin-Ciocalteu módszer (Folin és Denis, 1912), mellyel a minta teljes fenol tartalmát lehet detektálni (Singleton, 1974). Alkalmazásukat tekintve szőlőlevél (Dani és mtsai., 2010; Kosar és mtsai., 2007), bogyóhéj és mag (Iacopini és mtsai., 2008) extraktumból történtek meghatározások ezzel az eljárással, melynek kalibrálása tradicionálisan galluszsavval történik. Egy másik módszerrel, mely nem alkalmaz indikátor vegyületet a mérés folyamán, 15 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után mérhetőek az EtOH-al kivonatolt minták különböző hullámhosszokon (280, 320, 360 és 520 nm). Ebben a munkában az egyes hullámhosszokon mért abszorbancia értékeket használták a fenolos tartalom (280 nm), a borkősav észtereinek (320 nm), a flavonol tartalom (360 nm) és az antocianinok (520 nm) becslésére. Ezen vizsgálati eljárást később módosították és áttértek a galluszsav használatára a kalibrálás során (Mazza és mtsai., 1999).

A fenolos vegyületeken belül egy nagy és fiziológiailag jelentős csoport a flavonoidoké, melyek több szerkezetileg markánsan elkülönülő csoportot alkotnak, ugyancsak mérhetőek spektrofotométer segítségével. Több fő kategóriába sorolhatóak, legjellegzetesebb képviselőik a kvercetin (QUE), naringenin (NAR) és katekin (CAT). Savas alkoholban kivonatolt must, bor és bogyóhéj mintákat 360 nm hullámhosszon megmértek, hogy mennyiségileg megbecsüljék a flavonolok mennyiségét, referenciának kvercetint használva, mely talán a legegyszerűbb és legkorábbi flavonoid mérő módszer volt (Mazza és mtsai., 1999). A szélesebb körben alkalmazott flavonoid mérő módszer (Ivanova és mtsai., 2010; Kosar és mtsai., 2007) az $AlCl_3$ színváltozásán alapszik (Nikolovska-Coleska és mtsai., 1994). Az $AlCl_3$ a komplexképződés során jobban reagál flavonokkal és flavonolokkal, mint más polifenolokkal (Chang és mtsai., 2002; Marghitas és mtsai., 2007).

Flavanonok és flavanonolok detektációját egy alternatív színreakción alapuló módszer támogatja DNPH-t használva a mérés folyamán (Nagy és Grancai, 1996). A flavanolok, mint például a CAT, kizárólagosan mérhető a DMACA reagens segítségével végbemenő színreakcióval (Chacón és mtsai., 2009; Di Stefano és mtsai., 1989).

Az 1. táblázat a különböző fenolos vegyületcsoportok azonosítására használt legelterjedtebb fotométeres eljárások szelektivitását vizsgálja, a különböző vegyület csoportokat képviselő kalibráló szerek segítségével. A különböző fenolos vegyületcsoportokat képviselő GAA (fenolos sav), CAT (flavan-3-ol), QUE (flavonol), NAR (flavanon) mellett a levelekben nagy mennyiségben megtalálható nem fenoloid antioxidáns, az aszkorbinsav (ASA) reaktivitását is megvizsgáltuk valamennyi módszerrel. Amennyiben a vizsgált vegyületek ugyanolyan mértékben reagáltak az adott testben, mint a kalibráló vegyület, a

relatív reaktivitás értéke 1. Ha az érték kisebb, mint 1, akkor kevésbé reaktív a vizsgált vegyület a kalibráló szerhez képest. Ha a módszer érzékenyebb a vizsgált vegyületre, mint a kalibráló szer, a reaktivitás nagyobb, mint 1.

Az első sor (1. táblázat) a Folin-Ciocalteu módszer (Singleton és Rossi, 1965) eredményeit mutatja. Megfigyelhető, hogy a különféle tesztvegyületek különböző mértékben reagáltak, nagy részük nagyobb mértékben, mint a GAA. Ez azért érdekes, mert például két azonos fenol tartalmú, de GAA-t és QUE-t különböző arányokban tartalmazó minta FCR módszerrel becsült eredménye nem lesz azonos. Az ASA egy nem fenolos jellegű vegyület, mely mM koncentrációban minden növényi mintában előfordul. A Folin-Ciocalteu reagens ASA érzékenységét már régóta ismerik (Singleton, 1974), ennek ellenére az FCR módszer használata igen elterjedt. Növényélettani szempontból fontos hangsúlyozni, hogy az ASA koncentrációjának változása gyakran kísérője a növény stressz válaszainak (Smirnov, 2000).

A táblázatban szereplő tesztvegyületek reaktivitását az adott módszer tradicionálisan használt tesztvegyületéhez képest adtuk meg, az ezeknél nagyobb ($1 <$) reaktivitásokat dőlt és félkövér számokkal jelöltük.

1. táblázat: Spektrofotométeres flavonoid tartalmat mérő módszerek összehasonlítása tesztvegyületek segítségével.

Alkalmazott eljárás	GAA	CAT	QUE	NAR	ASA
Folin-Ciocalteu (GAA ekvivalens egységekben)	1	2.15	1.90	1.35	0.30
AlCl ₃ módszer (QUE ekv. egys.)	0.22	4.66	1	0.22	<0.01
DMACA módszer (CAT ekv. egys.)	<0.01	1	<0.01	<0.01	<0.01
DNPH módszer (NAR ekv. egys.)	0.30	0.42	0.48	1	<0.01
Absz. 280 nm (QUE ekv. egys.)	1.52	1.60	1	2.58	0.06
Absz. 360 nm (QUE ekv. egys.)	<0.01	<0.01	1	0.32	<0.01
Absz. 280-400 nm (QUE ekv. egys.)	0.09	0.02	1	0.89	<0.01

GAA: galluszsav; CAT: katekin; QUE: kvercetin; NAR: naringenin; ASA: aszkorbinsav. A táblázatban szereplő értékek a vegyületek relatív reaktivitását mutatják a kalibráló tesztvegyülethez képest.

A különböző flavonoid csoportok legismertebb képviselői eltérő reaktivitásokat mutatnak a tesztvegyületekkel a módszerek érzékenysége alapján. Az AlCl_3 módszer képes különbséget tenni különféle flavonoid csoportok között (Chang és mtsai., 2002; Marghitas és mtsai., 2007), melyet a többszörös különbség (5x) a QUE és NAR között még jobban megerősít (1. táblázat). Adataink azt mutatják, hogy a módszer nem csak a flavonolokra szelektív. A flavanonok és más fenolok szintén mutatnak reaktivitást az AlCl_3 -dal, mint a GAA vagy NAR, azonban a módszer a CAT-re kimondottan érzékeny. Több publikációban is alkalmazták az AlCl_3 reaktivitásán alapuló módszert flavonoidok mennyiségi meghatározásra, például eperfa levelében (Zhishen és mtsai., 1999), valamint szőlő esetében (Ivanova és mtsai., 2010; Kosar és mtsai., 2007). Mindazonáltal az AlCl_3 CAT-nel és más flavonoidokkal való erős reaktivitása torzított a mintákban található CAT származékok és más flavonoidok magas koncentrációja miatt. Ellentétben az AlCl_3 módszer szelektivitás hiányával, a DMACA-t alkalmazó eljárások (Di Stefano és mtsai., 1989) CAT szelektívnek bizonyultak, amint az 1. táblázat is mutatja, gyakorlatilag nem reagál másik tesztvegyület az adott módszerrel.

A DNPH eljárást flavanon és flavanonol csoportokat tartalmazó fenoloidok mennyiségi meghatározására alkalmazzák (Nagy és Grancai, 1996), és szelektivitását vizsgálva Chang és mtsai., (2002) szerint más flavonoidokkal nem mutat reaktivitást. Eredményeink azonban ennek ellent mondanak. Kísérleteinkben a QUE, a flavonolok képviselőjének reaktivitása nem volt elhanyagolható, csaknem a fele volt a NAR flavanonének. A GAA és CAT is reagált a DNPH-val, a QUE reaktivitását megközelítő mértékben (1. táblázat). A különbség más szerzők eredményeihez képest a különböző hullámhosszon történő mérésből fakadhat, ugyanis a 495 nm (Chang és mtsai., 2002) vagy a 486 nm (Marghitas és mtsai., 2007) a kromofórok spektrális maximumától távol találhatóak. Viszont az adataink tisztán mutatják, hogy a DNPH módszer nem csak a flavanon illetve flavanonol tartalmat képes mérni (Csepregi és mtsai., 2013).

6.1.2 UV abszorpción alapuló eljárások

A fenolos tulajdonságú vegyületek antioxidáns tulajdonságukon kívül, csökkentik a szövetekbe jutó UV sugárzás mértékét, azonban a növények több más UV abszorpcióval rendelkező metabolitot is tartalmaznak. Az UV abszorbeáló tulajdonságot előszeretettel alkalmazzák fenolos anyagok tartalmának mérésére (Sisa és mtsai., 2010; Ivanova és mtsai., 2010). Ezek az eljárások általában egyetlen hullámhosszon határozzák meg a minta UV

abszorpcióját és ennek alapján következtetnek a fenoloid tartalomra. Egy pontosabb eljárással, különböző fenoloid reprezentáns vegyületek abszorpciós spektrumainak összehasonlításával vizsgáltuk meg, mennyire egyenletesen képviseltek az egy hullámhosszas eljárásokban az egyes vegyületcsoportok, melyet a 9. ábrán láthatunk. Ezek a normalizált adatok jól illusztrálják a spektrális változatosságot és a mennyiségi összehasonlításokat, melyek a 2. táblázatban szerepelnek. Az ASA spektruma az ábrán (9. ábra) azt mutatja, hogy nem rendelkezik jelentős UV-A, illetve UV-B abszorpcióval.

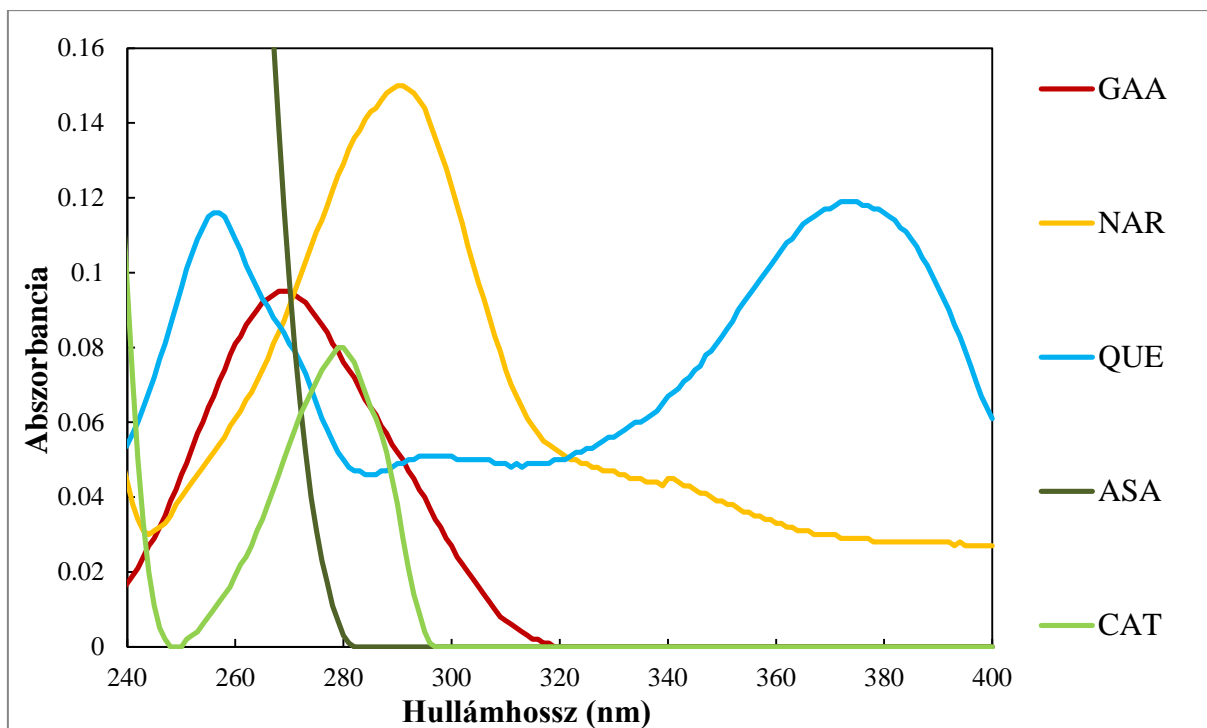
2. táblázat: Spektrofotométeres flavonoid tartalmat mérő eljárásokban használt tesztvegyületek UV abszorpciójának összehasonlítása.

Alkalmazott eljárás	GAA	CAT	QUE	NAR	ASA
Absz. 280-400 nm (QUE ekv. egys.)	0.09	0.02	1	0.89	<0.01

GAA: galluszsav; CAT: katekin; QUE: kvercetin; NAR: naringenin; ASA: aszkorbinsav.

Összehasonlítva a spektrumokat azt láthatjuk, hogy kizárólag a 280 nm hullámhosszra támaszkodva, a minták fenol tartalma megbecsülhető (Mazza és mtsai., 1999), ugyanis ezen a hullámhossz tartományon számos flavonoidnak van elnyelése. A CAT abszorpciójának maximuma 280 nm körül van úgy, mint a GAA-nak és a NAR-nek. A QUE relatív abszorpciója 280 nm-en kisebb, ezért a vizsgálatok során használt növényi kivonatokban lévő csekély flavonoid tartalom különbségek az egyes értékek túl- vagy alábecslését jelenthetik. Az abszorpciós spektrumok összehasonlítása alapján, a 360 nm-en történő méréssel a spektrumok alapján a flavanonok (NAR) és flavonolok (QUE) mérhetőek (9. ábra). A NAR abszorpciója 360 nm hullámhosszon harmada a QUE-nek (1. táblázat), mely jobban alátámasztja, hogy az egyetlen hullámhosszon való méréssel inkább a flavonolok becslését segítjük elő. A QUE és NAR példája azt mutatja, hogy a flavonolok és flavanonok abszorpciója fedésben van az UV tartományban, ezáltal nem lehet őket egyértelműen elválasztani egymástól egyetlen hullámhosszon.

Mindazonáltal az UV abszorpcióhoz a flavonolok vagy flavanonok hozzájárulása sokkal pontosabb összképet ad a mintánkról, amennyiben a teljes UV tartományban (280-400 nm) felvett spektrum alatti területet integráljuk és értékeljük. Az UV abszorbeáló spektrumok jól mutatják, hogy a fenolos tulajdonságú vegyületeknek különböző hullámhosszon van az elnyelési maximumuk, ezért nem adhat megbízható eredményeket a flavonoidoknak az egy hullámhosszon való mérése.



9. ábra

Növényi fenoloidok UV abszorpciós spektrumai.

GAA: Galluszsav (2.35 μM), NAR: Naringenin (1.47 μM), QUE: Kvercetin (1.65 μM),
ASA: Aszkorbinsav (227.1 μM), CAT: Katekin (68.9 μM).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a spektrofotométeres eljárások jó becslést, támpontot adnak flavonoid csoportokra, de sosem szabad őket flavonoid specifikus módszerként kezelni (Csepregi és mtsai., 2013)

6.2 Növényi polifenolok antioxidáns tulajdonságainak elemzése

6.2.1 Teljes antioxidáns kapacitás

A növényi polifenolok olyan erős antioxidáns tulajdonsággal rendelkező speciális anyagcseretermékek, melyek a növényi szervezetben a stressz elleni védelmet szolgálják (Michalak, 2006; Grace és Logan, 2000). Ezek a vegyületek a növényekből készült kivonatokban is megtartják antioxidáns képességüket, ezáltal hozzájárulva a gyógyszerészeti és élelmiszeripari termékek jótékony hatásaihoz (Havsteen, 2002). Ebből kifolyólag a polifenolok nem csak a növényi szervezetben hasznosak, mint antioxidánsok, hanem az emberi táplálkozásban is esszenciálisak. A flavonoidok, hasonlóan más növényi polifenolokhoz, olyan kémiai szerkezettel rendelkeznek, mely segíti a szabad gyökök

hatástalanítását (Rice-Evans és mtsai., 1996). Antioxidáns tulajdonságuk közé tartozik a különböző ROS-ok közvetlen semlegesítése (Robak és Gryglewski, 1988; Aust és mtsai., 1985; Bergman és mtsai., 2003; Majer és mtsai., 2014), kelátképzés bizonyos fémekkel (Rice-Evans és mtsai., 1997; Brown és mtsai., 1998; Mira és mtsai., 2002), továbbá egyes peroxidáz enzimek működését is támogatják elektron forrásként (Pérez és mtsai., 2002; Van Doorn és Ketsa, 2014). Ezeknek a vegyületeknek a TAC paraméterei jól jellemzik antioxidáns tulajdonságukat.

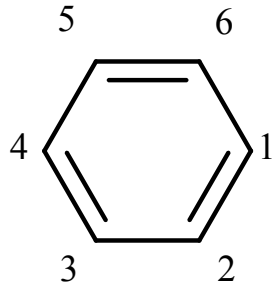
Munkánk során megvizsgáltuk és összehasonlítottuk különböző TAC mérő eljárások eredményeit, hogy megállapítsuk, a módszerek közül melyik jellemzi a legpontosabban az adott minta antioxidáns kapacitását. Kísérleteinkben antioxidáns mérések kalibrálószerait (ASA, Trolox) és 37 fenolos tulajdonságú tesztvegyület négy különböző ET módszerrel vizsgált eredményeit hasonlítottuk össze: TEAC, FRAP, DPPH és FCR. A módszerek változatossága azt feltételezi, hogy a különböző mérési eljárások nagy különbségeket eredményeznek ugyanabban a fenoloid csoportban, ugyanis a vizsgált fenoloidok szerkezete is rendkívül változatos. Ebből kifolyólag megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a vegyületek kémiai szerkezete a módszerek eredményét.

A szerkezet-hatás összefüggésekkel foglalkozó kutatások általában csak egy-egy TAC módszert alkalmaznak, például TEAC (Pannala és mtsai., 2001; Kähkönen és mtsai., 1999; Agati és mtsai., 2012), vagy FRAP (Firuzi és mtsai., 2005), és viszonylag kevés vegyületet vizsgálnak. Módszerek páronkénti összehasonlítását csak néhány vegyületcsoport esetében végezték el, pl. antociánok (FRAP és TEAC, Muselík és mtsai., 2007) és flavonolok (DPPH és TEAC, Nanjo és mtsai., 1996).

Munkánk során fenolos savakat és többféle flavonoid osztályba tartozó vegyületet is megvizsgáltunk. A négy TAC eljárás összehasonlításán túl kutatásaink újdonsága trendek megfigyelése helyett az adatok statisztikai analízise volt. A kutatási cél kitűzésével felmerül a kérdés, hogy a tesztvegyületek TAC értékei mennyire relevánsak az ezeket a vegyületeket tartalmazó növényi kivonatok antioxidáns kapacitás értékeivel. Az ebben a témában levő irodalmak ellentmondásosak, beleértve az antioxidánsok antagonista illetve szinergista hatásait (Samra és mtsai., 2011; Prieto és mtsai., 2015). Ennek ellenőrzésére szőlőlevél kivonatokot használtunk, melyek különböző polifenol profillal rendelkeztek. A levélkivonatok TAC értékeinek összehasonlítása mellett készítettünk olyan modell mintákat is, melyek a levélkivonat fő fenoloid komponenseit a levelekben mérttel megegyező moláris arányban tartalmazták. Ez lehetőséget adott arra, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolják a fenoloid összetétel kismértékű változásai a különböző TAC mérések eredményeit.

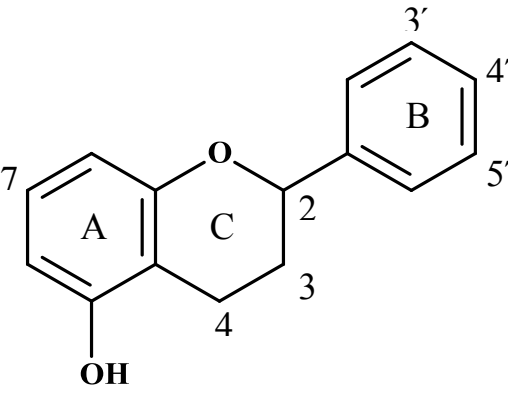
Az egyedi vegyületek tulajdonságait összehasonlító kutatásaink kivitelezésében a 3. és a 4. táblázatban lévő fenolos vegyületeket használtuk. Az 5. táblázat tartalmazza a fenoloidok két legnagyobb csoportjának, a flavonoidoknak és a fenolos savaknak antioxidáns paramétereit. A hidroxi-benzoésavak és hidroxi-fahéjsavak a fenolos savak két legnagyobb csoportja, a fenolgyűrű első pozíciójában különböznek. A fenolos savak elsősorban a növények leveleiben (Larson, 1988) találhatóak és nagyon jó antioxidánsok (Razzaghi-Asl és mtsai., 2013).

3. táblázat: A TAC módszerek összehasonlításakor vizsgált fenolos savak szerkezeti jellemzői.

						
	1	2	3	4	5	6
Hidroxi-benzoésavak						
2,3-dihidroxi-benzoésav	COOH	OH	OH	H	H	H
4-hidroxi-benzoésav	COOH	H	H	OH	H	H
Galluszsav	COOH	H	OH	OH	OH	H
Sziringsav	COOH	H	OMe	OH	OMe	H
Vanillinsav	COOH	H	OMe	OH	H	H
Hidroxi-fahéjsavak						
Kávésav	Acr	H	OH	OH	H	H
Kaftársav	AcrTa	H	OH	OH	H	H
p-kumársav	Acr	H	H	OH	H	H
transz-3-hidroxi-fahéjsav	Acr	H	OH	H	H	H
transz-ferulasav	Acr	H	OMe	OH	H	H
o-kumársav	Acr	H	H	H	H	OH

Acr: akrilsav; Gal: galaktóz; Glc, glükóz; Glu, glükuronsav; Me: metilcsoport; Rut: rutinóz; Ta: borkősav; s: egyes kötés; d: kettős kötés.

4. táblázat: A TAC módszerek összehasonlításakor vizsgált flavonoidok szerkezeti jellemzői.

							
	2-3	3	4	7	3'	4'	5'
Antocianinok							
Cianidin	s	H	OH	OH	OH	H	OH
Delfinidin	s	H	OH	OH	OH	OH	OH
Malvidin	s	H	OH	OMe	OH	OMe	OH
Pelargonidin	s	H	OH	H	OH	H	OH
Flavanonolok							
Dihidro-kaempferol	s	2H	=O	OH	H	OH	H
Dihidro-miricetin	s	2H	=O	OH	OH	OH	OH
Dihidro-kvercetin	s	2H	=O	OH	OH	OH	H
Flavanolok							
Katekin	s	OH	2H	OH	OH	OH	H
Epikatekin	s	OH	2H	OH	OH	OH	H
Flavanonok							
Heszperetin	s	2H	=O	OH	OH	OMe	H
Heszperidin	s	2H	=O	ORut	OH	OMe	H
Naringenin	s	2H	=O	OH	H	OH	H
Flavonok							
Apigenin	d	H	=O	OH	H	OH	H
Flavanolok							
Galangin	d	OH	=O	OH	H	H	H
Izoramnetin	d	OH	=O	OH	OMe	OH	H
Kaempferol	d	OH	=O	OH	H	OH	H
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükózid	d	OGlc	=O	OH	H	OH	H
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükuronsav	d	OGln	=O	OH	H	OH	H
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	d	ORut	=O	OH	H	OH	H
Miricetin	d	OH	=O	OH	OH	OH	OH
Miricetin-3- <i>O</i> -glükózid	d	OGlc	=O	OH	OH	OH	OH
Kvercetin	d	OH	=O	OH	OH	OH	H
Kercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	d	OGal	=O	OH	OH	OH	H
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükózid	d	OGlc	=O	OH	OH	OH	H
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükuronsav	d	OGln	=O	OH	OH	OH	H
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	d	ORut	=O	OH	OH	OH	H

Acr: akrilsav; Gal: galaktóz; Glc, glükóz; Glu, glükuronsav; Me: metilcsoport; Rut: rutinóz; Ta: borkősav; s: egyes kötés; d: kettős kötés.

A TEAC eredményeit Trolox, a FRAP és DPPH eredményeit általában ASA, míg az FCR módszert tradicionálisan GAA ekvivalens egységben adják meg. A kalibráló vegyület választása fontos a különböző módszerek összehasonlíthatósága szempontjából (Nenadis és mtsai., 2007), ezért munkánk során célul tűztük ki a leguniverzálisabb kalibráló vegyület megtalálását. Fontos szempontok voltak a TAC eredmények összehasonlításainál, hogy a közös kalibrálószer természetben előforduló vegyület legyen, magas antioxidáns kapacitást mutasson az összes módszerrel és hasonló reaktivitást mutasson mindegyik eljárás során. Ezek alapján sem az ASA, sem a Trolox nem felelt meg a támasztott követelményeinknek, helyettük a miricetin-3-O-glükozid (Myr-glc) volt a legalkalmasabb tesztvegyület, mely eleget tett a fenti feltételeknek. Az 5. táblázatban szereplő eredmények a miricetin-3-O-glükozidhoz, mint referencia vegyülethez képest meghatározott relatív TAC értékek. A tiszta hatóanyagok mérései jól reprodukálhatóak voltak, az egyes adatok (3 technikai ismétlés átlaga) relatív százalékos hibája 0.1%-nál kisebb volt.

5. táblázat: Fenoloidok különböző módszerekkel mért TAC értékei.

	TEAC	FRAP	DPPH	FCR
Antocianinok				
Cianidin	1.267	2.136	1.445	1.245
Delfinidin	2.030	2.043	1.585	1.173
Malvidin	1.402	1.066	0.714	0.942
Pelargonidin	0.998	1.155	0.577	0.597
Flavanonolok				
Dihidro-kaempferol	0.307	0.092	0.029	0.741
Dihidro-miricetin	1.256	0.747	1.003	0.603
Dihidro-kvercetin	0.598	0.962	0.741	0.785
Flavanolok				
Katekin	1.888	1.255	1.146	1.040
Epikatekin	2.081	1.082	0.178	0.987
Flavanonok				
Heszperetin	0.659	0.057	0.079	0.869
Heszperidin	0.769	0.031	0.016	0.856
Naringenin	0.326	0.000	0.000	0.760
Flavonok				
Apigenin	0.576	0.000	0.000	0.650

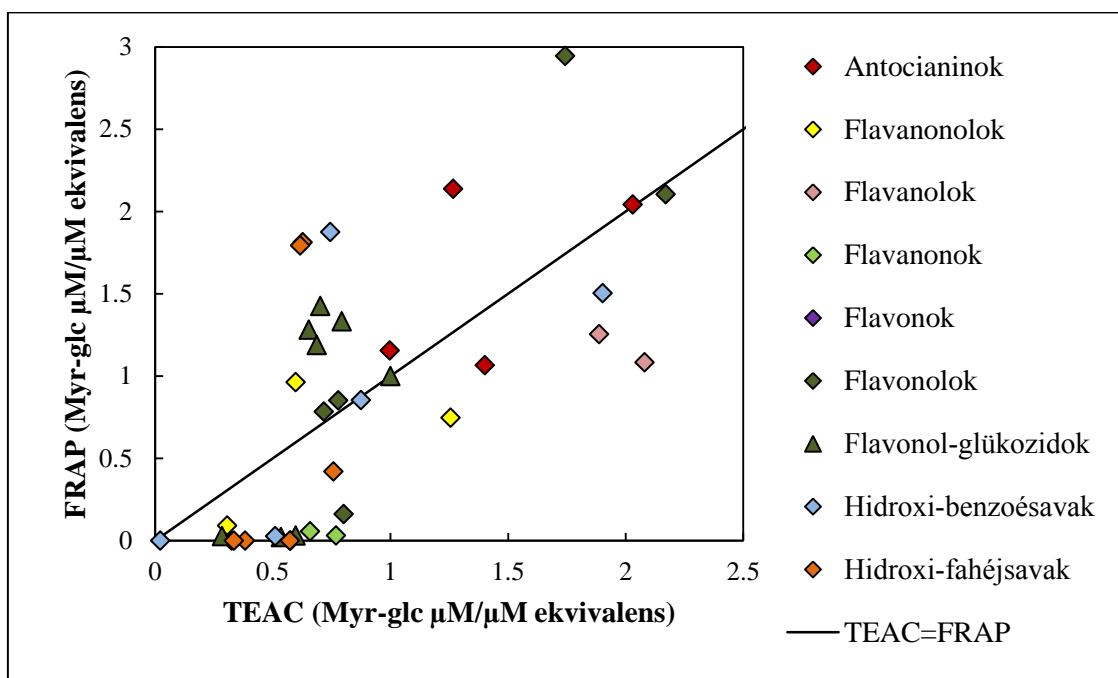
5. táblázat-folytatás

	TEAC	FRAP	DPPH	FCR
Flavonolok				
Galangin	0.801	0.161	0.255	0.586
Izoramnetin	0.718	0.783	0.423	1.145
Kaempferol	0.778	0.852	0.427	0.702
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükózid	0.598	0.031	0.000	0.491
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükuronsav	0.535	0.021	0.000	0.516
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	0.285	0.026	0.000	0.455
Miricetin	2.170	2.105	1.349	1.100
Miricetin-3- <i>O</i> -glükózid	1	1	1	1
Kvercetin	1.743	2.945	1.470	1.496
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	0.794	1.332	1.130	0.993
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükózid	0.702	1.425	1.067	1.124
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükuronsav	0.654	1.281	1.092	1.088
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	0.688	1.188	1.050	1.132
Hidroxi-benzoésavak				
2,3-dihidroxi-benzoésav	0.744	1.875	0.784	0.528
4-hidroxi-benzoésav	0.021	0.000	0.000	0.197
Galluszsav	1.903	1.503	1.098	0.535
Sziringsav	0.875	0.853	0.462	0.278
Vanillinsav	0.511	0.026	0.246	0.391
Hidroxi-fahéjsavak				
Kávésav	0.628	1.813	0.763	0.596
Kaftársav	0.617	1.792	0.852	0.537
p-kumársav	0.335	0.000	0.011	0.380
transz-3-hidroxi-fahéjsav	0.383	0.000	0.000	0.312
transz-ferulasav	0.759	0.419	0.370	0.508
o-kumársav	0.574	0.000	0.008	0.397
Egyéb				
Aszkorbát	0.629	0.666	0.457	0.234
Trox	0.661	0.903	0.438	0.231

A táblázatban szereplő eredmények a miricetin-3-*O*-glükózidhoz, mint referencia vegyülethez képest meghatározott relatív TAC értékek.

Különböző vegyületek TAC reaktivitását grafikusán is szemléltettük a 10. és 11. ábrán, melyek közül a 10. ábrán a különböző vegyületek TEAC és FRAP értékeit hasonlítottuk össze. Az egyenes vonal azt mutatja, hol lennének az ábrán azok a pontok, melyek azonos TEAC és FRAP értékkel rendelkező vegyületekhez tartoznának. A vonal alatt és felett $FRAP > TEAC$, illetve $FRAP < TEAC$ tulajdonságú anyagok értékei találhatóak. Hasonló grafikon szemlélteti a vizsgált vegyületek DPPH és FCR értékeinek kapcsolatát a 11.

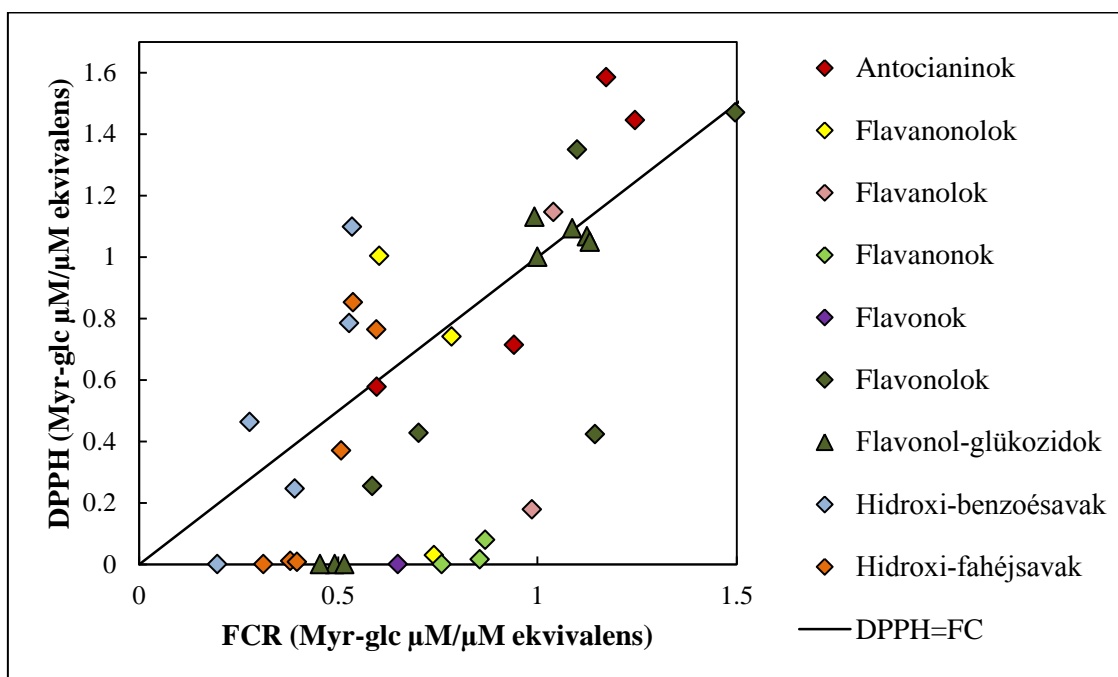
ábrán. Az ugyanahhoz a vegyületcsoporthoz tartozó fenolos vegyületek TAC értékei ugyanolyan színnel vannak megjelenítve az ábrákon.



10. ábra

Különböző fenoloidok TEAC és FRAP értékei.

A folytonos vonal a kétféle TAC módszerrel mért azonos értékek helyét jelöli az ábrán.



11. ábra

Különböző fenoloidok DPPH és FC értékei.

A folytonos vonal a kétféle TAC módszerrel mért azonos értékek helyét jelöli az ábrán.

Általánosságban elmondható, hogy egy vegyületcsoporton belül is változatos TAC értékek fordultak elő. Például egyes flavonol glükozidok nagyon alacsony DPPH és FRAP értéket mutatnak, míg mások sokkal nagyobb értéket adtak ezekkel a módszerekkel mérve. A valamennyi vegyület adatait tartalmazó TAC adatsorok összehasonlításai azt mutatják, hogy a különböző eljárással kapott eredmények páronként lineáris korrelációban vannak egymással (6. táblázat). A növénybiológiában kevésbé alkalmazott, azonban a klinikai diagnosztikában rendkívül elterjedt Bland-Altman és Passing-Bablok eljárásokkal is hasonló eredményt kaptunk, hogy a TAC módszerek nem felcserélhetőek (részletek a Függelékben).

6. táblázat: A 3. és 4. táblázatokban felsorolt vegyületek különböző módszerekkel mért TAC adatainak páronkénti összehasonlítása.

	TEAC	FRAP	DPPH
FRAP	0.4321 $p < 10^{-4}$	–	–
DPPH	0.4314 $p < 10^{-4}$	0.8137 $p < 10^{-4}$	–
FCR	0.3068 $p = 3.76 \cdot 10^{-4}$	0.3951 $p < 10^{-4}$	0.4499 $p < 10^{-4}$

Lineáris regresszió analízis determinációs együttható (R^2) értékei. A $p < 0.05$ értékek szignifikánsan lineáris kapcsolatot mutatnak.

A módszerek eredményei között jelentős a redundancia, ami azzal magyarázható, hogy valamennyi eljárás ET-on alapszik. A 6. táblázat jól szemlélteti, hogy bár a különböző módszerekkel mért TAC értékek kapcsolatát néhány párosításban relatíve alacsony determinációs együttható jellemzi (R^2), az összes lineáris regresszió statisztikailag szignifikáns volt ($p < 0.001$).

A következőkben a flavonoidokra és fenolos savakra összpontosítunk, melyek a fenoloidok két legnagyobb mennyiségben jelenlévő csoportjai a növények leveleiben. A flavonoidok TAC értékek szerinti rangsorolásával több munka is foglalkozott már, azonban egyetlen szempont alapján. Ezek egyféle TAC módszer eredményeinek megfigyelésével történtek, mint TEAC (Montoro és mtsai., 2005; Re és mtsai., 1999; Rice-Evans és mtsai., 1996) vagy DPPH (Burda és Oleszek, 2001; Das és mtsai., 2014), valamint statisztikai összefüggéseket sem állítottak fel. Az így megállapított trendek szerint az antioxidáns kapacitás értékeket a következő szerkezeti elemek befolyásolják: katekol (3'-4'-dihidroxi) szerkezet a B gyűrűben, oxocsoport vagy kettős kötés a C gyűrűben, illetve -OH csoport vagy

cukorrészek kapcsolódása az alapvázhoz (Williams és mtsai., 2004). A továbbiakban ezek szerepét vizsgáltuk meg mind a négy TAC módszer vonatkozásában.

A katekol szerkezet fontosságát mutatja, hogy jó antioxidáns képességgel ruházta fel a vegyületeket TEAC (Rice-Evans és mtsai., 1997) illetve DPPH (Burda és Oleszek, 2001) módszerekkel mérve, valamint, hogy a katekol csoport az egyetlen szerkezeti elem, ami pozitívan befolyásolja a FRAP értékek eredményeit (DeGraft és mtsai., 2007). DeGraft és mtsai. (2007) tanulmányában sokkal kevesebb (17) fenolos tulajdonságú vegyület antioxidáns értékeit vizsgálták. A mi elemzésünkben 26 flavonoidot vizsgáltunk, melyből 13 tartalmazott kettő -OH csoportot a B gyűrűn. Flavonoidokon kívül tanulmányunkban további 11 fenolos savat vizsgáltunk, valamint statisztikai összefüggések alapján próbáltunk újabb trendeket megállapítani.

A katekol szerkezet szignifikáns összefüggést mutat a magas TAC értékekkel mind az összes általunk vizsgált módszerrel (7. táblázat), ezáltal egy újdonságot megállapítva, miszerint az FCR módszernek jó a kapcsolata a katekol szerkezettel.

7. táblázat: A különböző flavonoid szerkezeti elemek és az egyes TAC-értékek közti kapcsolatot vizsgáló egyfaktoros ANOVA eredménytáblázata (n=26).

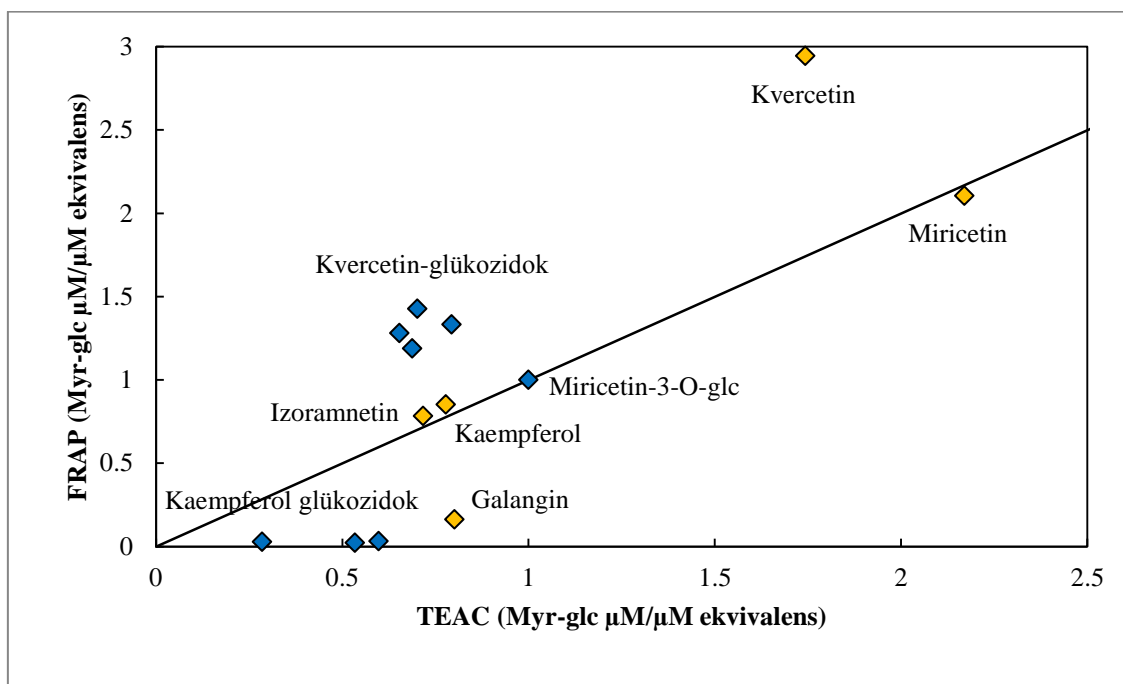
	TEAC	FRAP	DPPH	FCR
Flavonoidok				
3'-OH és 4'-OH együttes jelenléte a B gyűrűn (katekol szerkezet)	F=10.967 <i>p</i> = 2.93 10⁻³	F=30.006 <i>p</i> < 10⁻⁴	F=54.202 <i>p</i> < 10⁻⁴	F=14.935 <i>p</i> < 10⁻⁴
2,3 kettős kötés és 4-oxo jelenléte a C gyűrűben	F=1.504 <i>p</i> = 0.232	F=0.028 <i>p</i> = 0.868	F=0.0026 <i>p</i> = 0.874	F=0.006 <i>p</i> = 0.932
3-OH jelenléte a C gyűrűben	F=23.464 <i>p</i> < 10⁻⁴	F=10.279 <i>p</i> = 3.78 10⁻³	F=3.458 <i>p</i> = 0.075	F=3.836 <i>p</i> = 0.062

A félkövér betűkkel kiemelt esetekben a szignifikáns *p* érték (*p* < 0.05) azt mutatta, hogy az adott szerkezeti elem hatással van az adott TAC-érték alakulására.

A C gyűrűben található kettős kötés és az oxocsoport TEAC értékeket befolyásoló hatásáról szóló korábbi publikációk ellentétes következtetésekre jutottak. Bors és mtsai. (1990) 17 flavonoid gyök semlegesítő hatékonyságát vizsgálták és arra a következtetésre jutottak, hogy az oxocsoport jelenléte fokozza az antioxidáns kapacitást. Egy másik, 31 polifenolos vegyületen alapuló tanulmány megerősíti ezt, továbbá megállapítja, hogy a kettős kötés kevésbé fontos a magas antioxidáns érték kialakításában, mint a katekol szerkezet (Rice-Evans és mtsai., 1996). Saját adatbázisunkban mind a négy TAC módszer

eredményeinek segítségével megvizsgáltuk, hogy a C gyűrű kettős kötés és oxocsoport együttese korrelációban van-e a TAC értékekkel, de nem találtunk szignifikáns összefüggést egyik módszer esetében sem (7. táblázat). Az adataink között voltak olyan vegyületek, melyek csak az egyik szerkezeti tulajdonsággal rendelkeztek (26 flavonoidból 18-nak volt kettős kötése, míg 20-nak oxocsoportja és 14 tartalmazta mindkét szerkezeti elemet egyszerre).

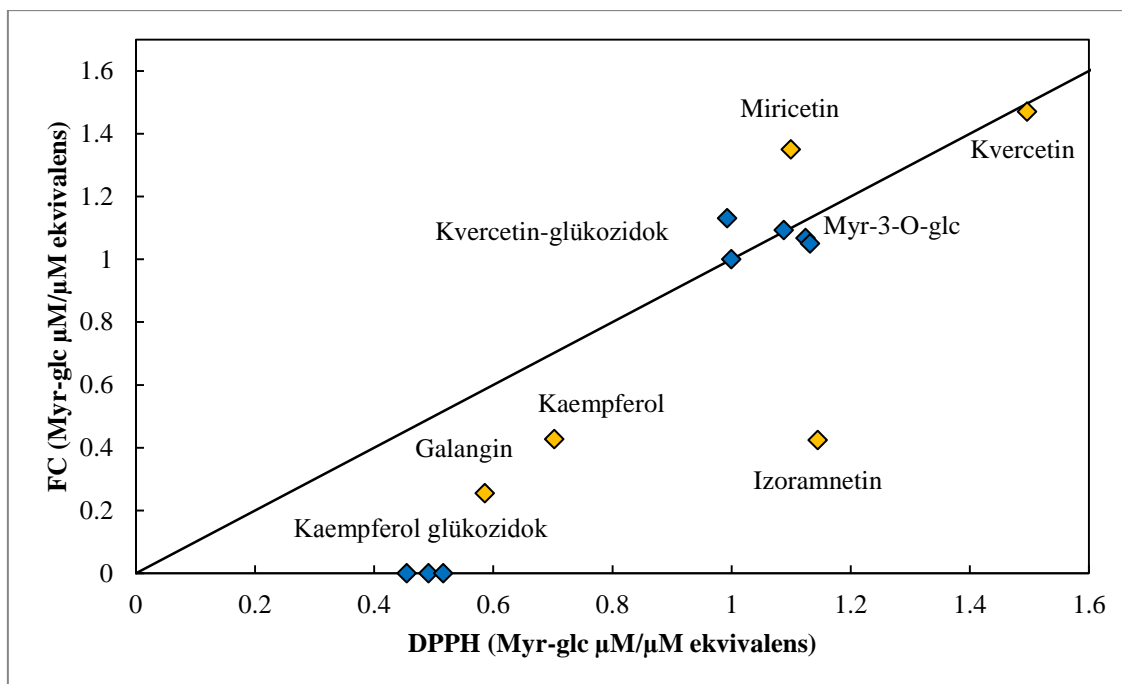
A flavonoidok a növényekben általában glükozidokként fordulnak elő (Manach és mtsai., 2004), melyeken a C gyűrű harmadik szénatomja cukor csoportot és nem -OH csoportot tartalmaz. Mivel ezek a vegyületek kiemelt fontosságúak a levelek környezeti hatásokra adott válaszaiban, a 10. és 11. ábrákon szereplő adatok egy részét kiemelve az egyes vegyületek megnevezésével ábrázoltuk a TAC értékpárokat (12. és 13. ábra). A korábbi irodalommal egybehangzóan a glükozilált flavonoidoknál alacsonyabb TEAC (Rice-Evans és mtsai., 1996) és DPPH (Burda és Oleszek, 2001; Fukumoto és Mazza, 2000) értékeket találtunk, mint aglikonjaiknál. A kaempferol, illetve a kaempferol-glükozidok DPPH módszerrel mért antioxidáns kapacitása közti jelentős különbséget már leírták (Fukumoto és Mazza, 2000), mi azonosítottuk ezt a különbséget a kvercetin és miricetin esetében is.



12. ábra

Flavonol aglikonok és glükozidjaik TEAC és FRAP értékei.

A folytonos vonal a kétféle TAC módszerrel mért azonos értékek helyét jelöli az ábrán.



13. ábra

Flavonol aglikonok és glükozidjaik DPPH és FC értékei.

A folytonos vonal a kétféle TAC módszerrel mért azonos értékek helyét jelöli az ábrán.

A B gyűrű -OH csoportjai, illetve a C gyűrű -OH csoportja közötti hidrogénkötés befolyásolja a molekula térszerkezetét, a C gyűrűn lévő -OH csoport eltávolításával csökken a molekula planaritása és ezzel az elektron delokalizációs képessége (Van Acker és mtsai., 1996), így az elektron transzferen alapuló TAC módszerekkel mérhető antioxidáns kapacitások értéke (Heim és mtsai., 2002). A C gyűrű harmadik szénatomján lévő -OH csoport, melynek jelenléte pozitív korrelációt mutatott a TEAC és FRAP értékekkel $p < 1\%$ -nál (7. táblázat), a DPPH és FCR értékekkel nem mutatott statisztikailag szignifikáns kapcsolatot.

A lipofil flavonoid aglikonok, valamint azok származékai a növényekben sokkal ritkábbak, mint a vízdékony glükozidok (Olszewska, 2008; Wollenweber és Dietz, 1981). Nincsen állásfoglalás annak tekintetében, hogy vajon az aglikonoknak a felhalmozódását a bioszintézis leállása okozza a glükozid-aglikon raktárak átalakításával, de annyi bizonyos, hogy az aglikonok jelenléte általában magyarázza a megemelkedett antioxidáns védelem szükségességét, például a rügyfakadás során *Picea abies* és *Abies alba* növények esetében (Lee és mtsai., 2014). Adataink alapján a TEAC 50%-kal mutat kevesebb értéket kvercetin és kaempferol-3-O-glükozidnál, mint aglikonjaik esetében (5. táblázat). Ugyanez a helyzet a kvercetin glükozidja és aglikonja között a FRAP vagy DPPH esetében is, azonban ezekkel a módszerekkel mérve a kvercetin-3-O-glükozidok TAC értékei elhanyagolhatóak (5. táblázat).

Az egyetlen kivétel a vizsgálataink során, amikor a glükoziláltság nem adott csökkent TAC értékeket a TEAC esetében a heszperetin és heszperidin között volt. Itt a glükozilált formának csaknem 10%-kal magasabb antioxidáns értéke volt, mint az aglikonnak. A többi módszernél a glükozilált származékokra kapott eredmények alacsonyabbak voltak. A glükoziláltságbeli különbségeket a TEAC eredményekben a heszperetin váz szerkezete magyarázhatja, ugyanis ennek a vegyületnek a cukorrésze nem a C gyűrűhöz kapcsolódik, hanem az A gyűrű hetedik szénatomjához. A heszperetin és heszperidin voltak az egyetlen nem flavonol aglikon és glükozid páros a munkánk során, így trendet nem tudtunk megállapítani. Ehhez további, több A-7 pozícióban glükozilált és aglikon vegyületpár elemzésére lenne szükség, ezek azonban csak nehezen, vagy egyáltalán nem érhetőek el kereskedelmi forgalomban.

Eredményeink azt mutatják, hogy sokféle flavonoidot tartalmazó növényi minták vizsgálatakor ugyanaz a tartalmi változás a polifenol kompozícióban (például kvercetin – kaempferol arányban) különböző mértékben jelenhet meg különböző TAC eljárásokkal vizsgálva. Ezeknek a vegyületeknek a mennyisége különféle abiotikus tényezők, például hőmérséklet vagy fény által szabályozott, természetesen különböző mértékben (Neugart és mtsai., 2013). Az UV erőteljesebb növekedést okoz a levelek kvercetin származékaiban, mint különféle kaempferol származékokban (Hofmann és mtsai., 2000; Jaakola és mtsai., 2004; Reifenrath és Müller, 2007; Winter és Rostás, 2008). A különböző TAC módszerekkel az ilyen metabolit változások nagyon jól nyomon követhetőek lennének, azonban a kaempferol-glükozidok gyakorlatilag láthatatlanok a DPPH és FRAP módszerekkel (4. táblázat), melyek azonban a kvercetinhez hasonlóan nagy mennyiségben találhatóak meg zöldségek, gyümölcsök és gyógynövények különféle szöveteiben (Sultana és Anwar, 2008; Calderón-Montano és mtsai., 2011; Devi és mtsai., 2015). Ez a két módszer csak a megnövekedett kvercetin szintet képes értékelni, míg a TEAC a kvercetin és kaempferol származékokat is képes kimutatni. Eredményeink ez által ellent mondanak Clarke és mtsai. (2013) megfigyeléseinek, miszerint a DPPH legyen az elsődlegesen alkalmazott antioxidáns kapacitást mérő módszer.

A legtöbb irodalmi adat a flavonoidokra koncentrál, mint növényi antioxidánsokra, azonban a fenolos savak is hozzájárulnak az antioxidáns kapacitás kialakításához. Hidroxifahéjsavak antioxidáns vizsgálatai alátámasztják az -OH csoportok fontosságát az antioxidáns kapacitás értékében (Razzaghi-Asl és mtsai., 2013). Tizenegy fenolos sav (5 hidroxibenzoésav és 6 hidroxifahéjsav) adatait megvizsgálva több esetben mértünk a flavonoidokéhoz hasonló mértékű antioxidáns kapacitást (5. táblázat).

Megállapítottuk, hogy a két csoportot elkülönítő oldallánc szerkezeti különbsége nem befolyásolta a TAC eredményeket szignifikánsan egyik módszer esetében sem. A további szerkezet-hatás vizsgálatokhoz a 11 fenolos savat egy adathalmazként kezeltük. A szubsztituensek eloszlása azonban a legtöbb tulajdonság tekintetében túl egyenlőtlen volt a statisztikai analízishez, kivéve a harmadik szénatomhoz kapcsolódó -OH csoportot, mely jelen volt 5 vegyületben és hiányzott 6-ból. Megállapítottuk, hogy a 3-OH struktúra hiánya negatív korrelációban volt a FRAP és DPPH módszerrel mért antioxidáns értékekkel, míg a TEAC és FCR eredményeket nem befolyásolta szignifikánsan (8. táblázat). Munkánk újdonsága annak megállapítása, miszerint a FRAP és DPPH módszer a másik két eljárással ellentétben alacsony TAC értéket ad a mono hidroxibenzoésvakra és a kumársavra.

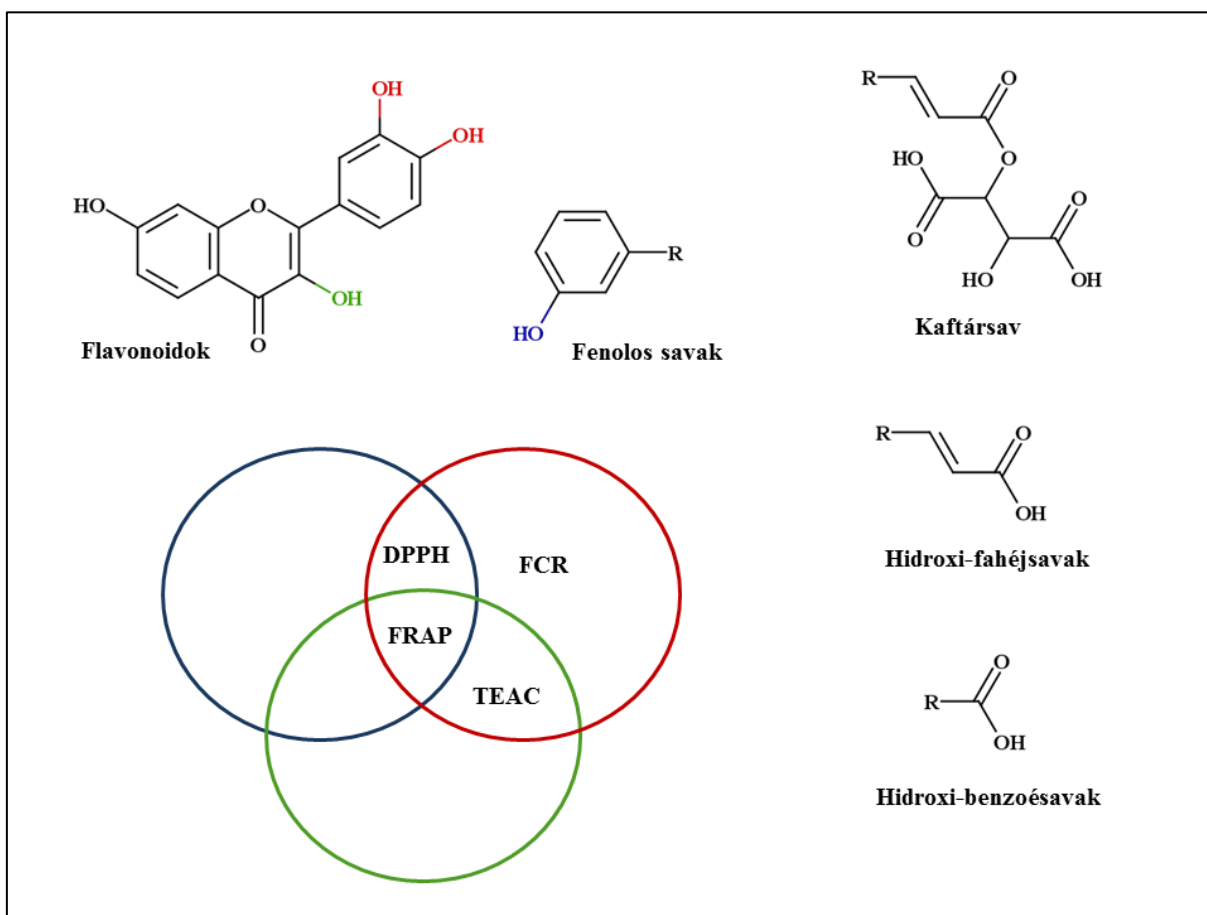
8. táblázat: A fenolos savak 3-OH csoportjának jelenléte és az egyes TAC-értékek közti kapcsolatot vizsgáló egyfaktoros ANOVA eredménytáblázata (n=11).

Fenolos savak	TEAC	FRAP	DPPH	FCR
3-OH jelenléte	F=1.511 <i>p</i> = 0.250	F=10.875 <i>p</i> = 9.26 10⁻³	F=7.339 <i>p</i> = 0.024	F=4.761 <i>p</i> = 0.057

A félkövér betűkkel kiemelt esetekben a szignifikáns *p* érték (*p* < 0.05) azt mutatta, hogy a vizsgált szerkezeti elem hatással van az adott TAC-érték alakulására.

A 14. ábra összefoglalja a szerkezet - TAC vizsgálataink eredményét. A különböző színekkel kiemelt hidroxilcsoportok járulnak hozzá szignifikánsan a megfelelő színnel jelzett TAC módszerrel mérhető magas antioxidáns értékekhez. Ugyanannak a szerkezetnek különböző antioxidáns tulajdonságait általában különféle TAC-ok mutatják meg. Ebből kifolyólag a fenoloidokban gazdag minták karakterizálhatósága érdekében szükségzerű a több szempontos megközelítés. Alapvetően különböző fenoloid profilú és különféle levélminták egy szempontos, egyféle eljárást (pl. csak TEAC-ot) alkalmazó összehasonlítása nem ajánlott, nem alkalmas az antioxidáns trendek megállapítására (Csepregi és mtsai., 2016).

Eredményeink statisztikailag is alátámasztották azt az irodalomban korábban felmerült javaslatot (Huang és mtsai., 2005), mely szerint az FCR módszert inkább ET-en alapuló antioxidáns kapacitást mérő módszernek tekinthetjük, mint a minták fenoloid tartalmát mérő eljárásnak. Ennek alapján félrevezető lehet az FCR és más TAC módszer eredményeinek szoros kapcsolatából arra következtetni, hogy az antioxidáns kapacitás főként a fenoloidoknak tulajdonítható a növényi eredetű mintákban.



14. ábra

A 7. és 8. táblázatban bemutatott fenoloid szerkezet-hatás összefüggések grafikus ábrázolása. Az ábrán lévő körök színei jelzik azokat az alapvázon található szubsztituenseket, melyek az adott tulajdonságot befolyásolják

További kísérleteinkben Pinot noir levélmintákat használtunk, melyeket két egymást követő évben gyűjtöttünk nyár közepén, a bogyóérés kezdetekor (zsendüléskor). Fenoloid összetételét a különböző környezeti hatások nagymértékben befolyásolják (Jones és Davies, 2000). A fenolos komponenseket HPLC-MS-sel detektáltuk és szignifikáns különbségeket találtunk a 2012-ben és 2013-ban gyűjtött levelek között (9. táblázat). Ez feltehetőleg az időjárás következménye, ugyanis 2012 jelentősen szárazabb volt, mint 2013.

9. táblázat: A 2012 és 2013 évben gyűjtött Pinot noir levelek fenoloid összetételének összehasonlítása.

Fenoloid összetétel (mg/g száraztömeg)	2012	2013 (2012-es adat %-ában)
Kaftársav	1.39 ±0.0511	1.60 ±0.0073 (113% $p=0.0173$)
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükozid	0.03 ±0.0006	0.03 ±0.0046 (100% $p=0.2341$)
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükuronsav	0.04 ±0.0022	0.05 ±0.0066 (120% $p=0.0786$)
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükozid	0.98 ±0.0272	1.38 ±0.3712 (129% $p=0.1995$)
Kvercetin-3-<i>O</i>-glükuronsav	3.57 ±0.2952	4.23 ±0.1352 (115% $p=0.0234$)
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	0.23 ±0.0113	0.22 ±0.0756 (96% $p=0.7826$)

A táblázat az átlagos értékeket és a szórásokat (SD) mutatja (n=3). A félkövér betűkkel kiemelt esetekben a p érték ($p < 0.05$) azt mutatta, hogy a két évben gyűjtött minták adatai szignifikánsan különböztek egymástól.

A szőlőlevelek ebből a két évből ideális modell alapot biztosítanak a minőségi összehasonlításhoz, ugyanis ugyanazon fenolos vegyületek találhatóak bennük, de különböző mennyiségekben.

Az egymást követő két évben gyűjtött Pinot noir levélminták TAC eredményei között szignifikáns különbségeket találtunk valamennyi módszerrel mérve (10. táblázat).

10. táblázat: Két különböző évből gyűjtött Pinot noir levélminták TAC eredményeinek összehasonlító táblázata.

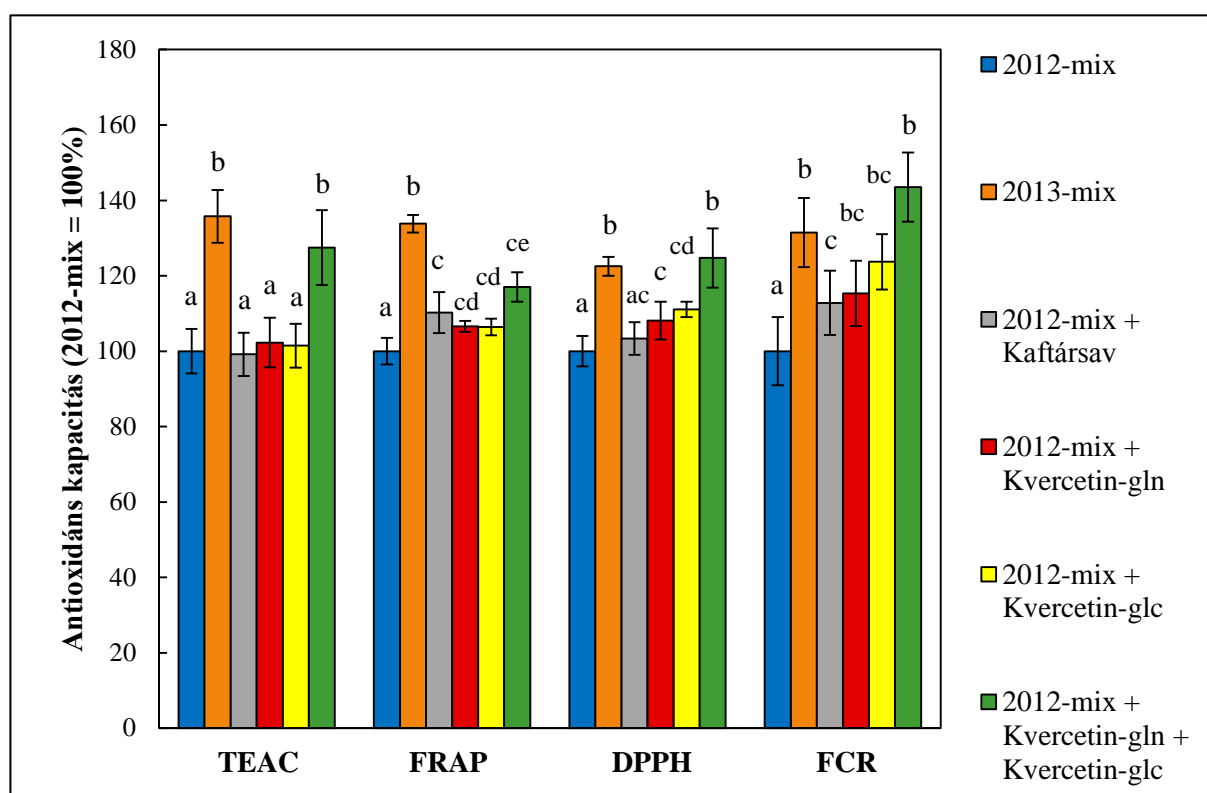
	TEAC	FRAP	DPPH	FCR
2013 átlag (2012-es átlag %-ában)	120.12%	126.13%	111.50%	132.16%
2012 és 2013 év átlagait összehasonlító kétmintás t-teszt p értékei	$< 10^{-4}$	$< 10^{-4}$	$1.55 \cdot 10^{-3}$	$< 10^{-4}$

A 2013-as mintákban a nagyobb fenoloid mennyiség nagyobb TAC értékeket eredményezett az összes antioxidáns mérő módszerrel mérve. Azonban ezeknél az értékeknél is szembeűnik, hogy a különböző módszerek különböző mértékben értékelik a két minta különbségét.

Habár a fenolos vegyületek elég gyakoriak a szőlő levelében, ezek több más antioxidáns tulajdonsággal rendelkező metabolitot is tartalmazhatnak, mint pl. ASA, α -tokoferol vagy β -karotin, melyek szintén hozzájárulhatnak a TAC módszerek eredményeinek kialakításához. Ehhez kapcsolódó kérdésünk az volt, milyen mértékben határozzák meg a TAC különbségeket a fenoloidok. Ennek tesztelésére elkészítettük a kétféle levélkivonat fő fenoloid komponenseinek a levelekben mérttel (9. táblázat) megegyező moláris arányú keverékét (2012-mix és 2013-mix). Ennek a két modell mintának a TAC paraméterei is

szignifikánsan különbözőek voltak (15. ábra), hasonló különbségeket mutatva, mint a levél kivonatok (10. táblázat).

A modell minták azt is lehetővé tették, hogy egyetlen komponens mennyiségét változtatva figyeljük meg, hogyan alakítja az antioxidáns kapacitást, azaz hogy a kisebb antioxidáns kapacitású, 2012. évi levélmintának megfelelő keverékben (2012-mix) csak egyetlen komponens mennyiségének megnövelésével elérhető-e a 2013. év levelének megfelelő antioxidáns kapacitása. Ezt úgy végeztük el, hogy a 2012-mix mintát kiegészítettük kaftársavval (CA), kvercetin-3-O-glükoziddal vagy kvercetin-3-O-glükuronsavval úgy, hogy mennyiségileg a 2013-mix mintát jellemezze.



15. ábra

Különböző fenoloid tartalmú keverékek antioxidáns kapacitásai különböző TAC módszerekkel mérve.

2012-mix és 2013-mix a 2012. és 2013. évben gyűjtött levelek fő komponenseinek megfelelő moláris arányú keveréke. Az egyes módszerek eredményeit a 2012-mix százalékában adtuk meg. Az eltérő betűk az ettől szignifikánsan $p < 0.05$ különböző antioxidáns értékeket jelölik.

A CA egyedüli megnövelése a mintában nem okozott változást a TEAC vagy DPPH eredményekben, viszont szignifikáns növekedést okozott a FRAP és FCR módszereknél. Ez a megfigyelés figyelemre méltó, ugyanis a CA TAC értéke nagyobb, mint a QUE-glc. Csak az egyik kvercetin származék mennyiségi megnövekedése a mintában nem okozott TEAC érték

változást, de megemelte az összes többi TAC értéket (15. ábra). Kétféle kvercetinrel kiegészített minták FRAP és DPPH eredményeiben szintén volt növekedés 2012. és 2013. mesterséges levélkivonata között, sőt az FCR szintje is megemelkedett a 2013. évi levélmintában. A 2012. évnek megfelelő mesterséges kivonatot mindkét kvercetin származékkal kiegészítve CA nélkül is elegendő volt, hogy a TEAC, DPPH és FCR szintjei elérjék a 2013. levélét, de a FRAP esetében nem (15. ábra). Eredményeink is mutatják, hogy számos tényező befolyásolhatja a növények antioxidáns profilját, és még az egyes flavonoidok kismértékű mennyiségi változása is képes változást okozni növények TAC értékeiben.

Különböző fenoloid profillal rendelkező szőlőlevelek segítségével megvizsgáltuk, hogy a fenoloid tesztvegyületek egyedi antioxidáns értékei mennyire vannak összhangban az ezeket a vegyületeket tartalmazó teljes növényi kivonatok tulajdonságaival. Megmutattuk, hogy a komponensek mennyiségi arányai az antioxidáns kapacitásokban is tükröződnek, azonban a különböző módszerekkel mért kapacitásokban a tesztvegyületek mérései során azonosított szerkezeti sajátosságai szerint eltérő mértékben.

A fenti levélkivonat vizsgálataink megerősítik a többféle módszer párhuzamos alkalmazásának, tesztvegyületek segítségével már megállapított szükségességét (Csepregi és mtsai., 2016).

6.3 Specifikus antioxidáns kapacitások

A TAC mérések általános információin túl a stressz élettani vizsgálatokban fontos az egyes reaktív származékokkal szembeni specifikus antioxidáns kapacitások ismerete. Ezért a fenolos vegyületek szerepét célzó munkánkat kiterjesztettük két, az UV és a látható fény okozta oxidatív stressz kialakulásában központi szerepet játszó ROS, a H_2O_2 és a 1O_2 semlegesítő antioxidáns kapacitás vizsgálatára is. Előbbi esetében a magas saját UV abszorpciójú fenolos vegyületek vizsgálataihoz módszertani fejlesztésre is szükség volt.

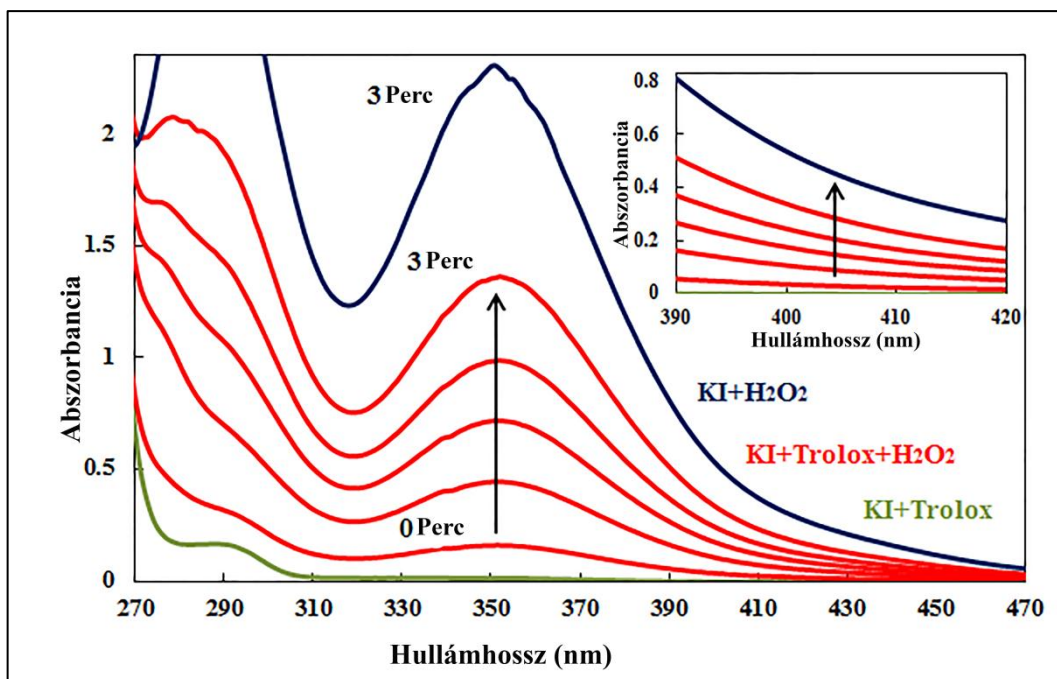
6.3.1 Nem enzimatis H₂O₂ semlegesítő kapacitás mérő módszer fejlesztése növényi minták analíziséhez

A növényi polifenolok olyan speciális anyagcseretermékek, melyek különböző funkciókkal bírnak, beleértve a ROS semlegesítést is. Ezért különösen érdemes lehet a ROS specifikus antioxidáns kapacitások tanulmányozása, mely nem csak a növényi

stresszfiziológiában, hanem az élelmiszertudományokban is hasznos tapasztalatokat hozhat. Munkánk során egy olyan fotometriás módszer kifejlesztésén dolgoztunk, mely a fenoloidokban gazdag minták H_2O_2 semlegesítésének aktivitását egyszerűen és költséghatékonyan értékeli. További szempont volt, hogy a mérés ne követelje meg peroxidáz enzimek jelenlétét, így a fenoloidok kivonására használt oldószerek (pl. alkoholok) ne gátolják a kivitelezhetőségét, valamint az alkalmazott kromofór abszorpció változását, továbbá ne legyen szükséges az UV tartományban mérni, ahol a detektálást a magas polifenoltartalmú minták saját UV abszorpciója hátráltathatja.

A specifikus H_2O_2 semlegesítő képesség egyik lehetséges mérése a H_2O_2 koncentrációjának változásán alapszik, mely direkt módon 230 nm hullámhosszon mérhető (Keser és mtsai., 2012). Ezek a módszerek nehezen alkalmazhatóak növényi mintákon, ugyanis az enzim katalizált H_2O_2 meghatározó módszerrel (Fernando és mtsai., 2015) az a probléma, hogy a szerves oldószerek, melyeket a növénykivonatok elkészítésekor használunk, gátolhatják a működésüket. Következésképpen, a fenti módszer nem alkalmazható ezekben a kutatásokban és más H_2O_2 + peroxidáz + kromofór reakción alapuló rendszerekben sem. Ezen kívül a H_2O_2 réz oxidáló képességén alapuló (CUPRAC) antioxidáns kapacitást mérő módszer továbbfejlesztett változata lehet alkalmas a magas polifenoltartalmú minták vizsgálatára (Özyürek és mtsai., 2010), azonban ennél egyszerűbb eljárást kerestünk.

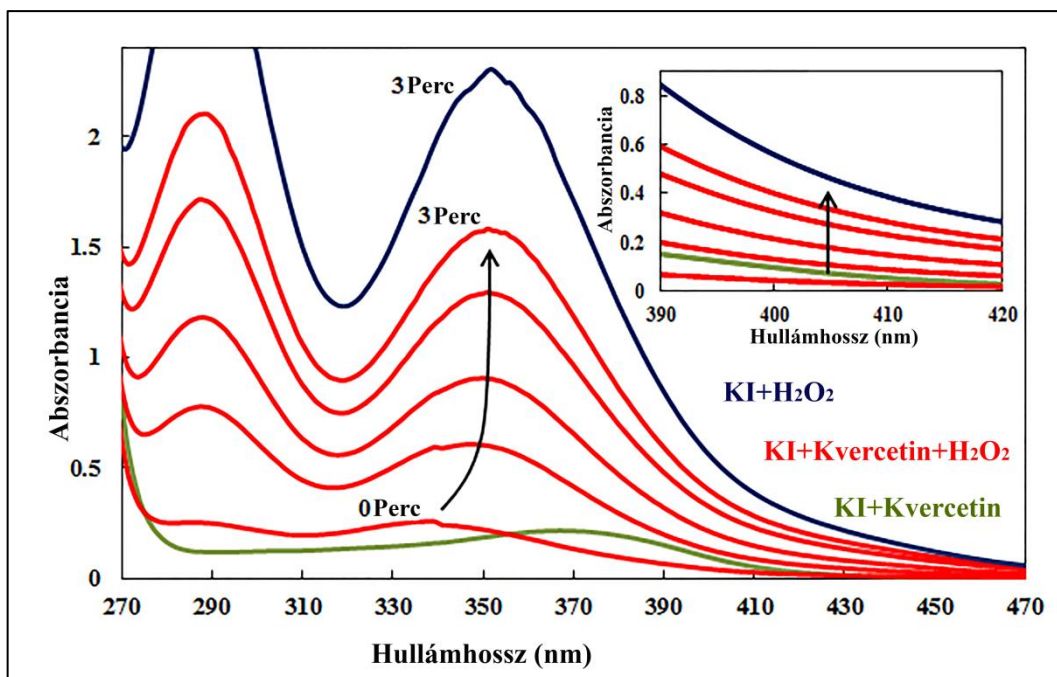
Módszerünk a KI H_2O_2 általi oxidációján alapszik, ahol a jód (I_2) 350-360 nm maximummal rendelkező (Junglee és mtsai., 2014) abszorpcióját a maximumtól távolabb, 405 nm hullámhosszon mérjük, ahol a kromofór abszorpciója nem fed át jelentősen a fenoloid vegyületekével (16. és 17. ábra). A mérés elvét illusztráló 16. ábrán a zöld vonal az antioxidánst, vagyis esetünkben a Trolox spektrumát mutatja, míg a piros görbék a KI-ot tartalmazó mérőoldat spektrumait az antioxidáns hozzáadása előtt és után, különböző időpontokban. A kék görbe egy antioxidáns nélküli spektrumot ábrázol 3 perces inkubáció után. A Trolox nem képes megakadályozni a KI H_2O_2 általi oxidációját, melyet az oxidált termék abszorpciójának a növekedése jól mutat. A Trolox nem abszorbeál 300 nm-nél nagyobb hullámhosszakon, ezért jelenléte nem befolyásolja a kromofór abszorpciós spektrumának alakját. A referencia molekula jelenlétében az abszorpciók 350 és 405 nm hullámhosszakon, 3 perc szobahőmérsékleten való inkubálás után csaknem 40%-kal voltak kisebbek, mint antioxidáns tulajdonságú vegyületek hiányában. A 16. ábra jól mutatja a módszer működését, miszerint a vegyületek H_2O_2 semlegesítő képességét jól jellemzi a kromofór abszorpció különbsége az antioxidánsok jelenlétében, illetve hiányában.



16. ábra

A KI abszorpció változáson alapuló H₂O₂ antioxidáns tulajdonságot meghatározó módszer működésének illusztrálása 300 μ M Troloxszal (5.4.4 fejezet).

A 17. ábra egy másik kísérletet is szemléltet, melyben Trolox helyett kvercetin használtunk tesztvegyületként. A Troloxszéval ellentétben, a kvercetin abszorpciós maximuma (370 nm) átfed a KI oxidált színes termékének abszorpciós spektrumával. Ennek eredményeként a KI + kvercetin + H₂O₂ mérőelegy abszorpciós maximuma a kvercetin H₂O₂ általi oxidációja közben eltolódik. Ez a spektrális eltolódás azonban nem befolyásolja a 405 nm hullámhosszon való mérést, amint azt a 17. ábra mutatja. Nagyszámú minták antioxidáns kapacitásainak analízise során túlságosan időigényes lenne a teljes abszorpciós spektrum vizsgálata (spektrális maximumok eltolódására történő korrekció céljából), a gyors mérésmenet érdekében célszerűbb egyetlen hullámhosszon nyomon követni az abszorpció változást.



17. ábra

A KI abszorpció változáson alapuló H₂O₂ antioxidáns tulajdonságot meghatározó módszer működésének illusztrálása 30 μ M kvercetinrel (részletek 5.4.4 fejezet).

A fentebb bemutatott ábrák (16. és 17. ábra) jól szemléltetik a 405 nm hullámhosszúságon történő mérés előnyeit, ami alkalmas a plate reader használatára is, mert az egyszerűbb készülékek is a legtöbb esetben gyári beállításként tartalmazzák a 405 nm-nek megfelelő szűrőt (Csepregi és Hideg, 2016).

A H₂O₂ antioxidáns tulajdonságot meghatározó módszer fenti fejlesztése jól kiegészítette az irodalomból ismert, fenoloidokra is alkalmazható ¹O₂ antioxidáns kapacitás mérést (5.4.5 fejezet).

6.3.2 UV abszorbeáló és specifikus ROS semlegesítő antioxidáns tulajdonságok

A polifenolos vegyületek rendkívül fontos szerepet játszanak a növények életében. Bioszintézisük különböző stresszhatásokra fokozódik, általános antioxidáns szerepük mellett abszorbeálhatják a napfény UV tartományát (3.1 és 3.2.1 fejezetek).

A fenolos vegyületek szerkezeti sajátosságai és TAC tulajdonságaik közötti összefüggések vizsgálata után (Csepregi és mtsai., 2016) felvetődött az a kérdés is, hogyan befolyásolhatja a szerkezet az UV abszorbeáló és ROS semlegesítő képességüket. A legtöbb

fenolos tulajdonságú vegyületnek széles UV abszorpciós spektruma van, érintve az UV-A és UV-B hullámhossz tartományt, ezáltal jó UV-szűrőként funkcionálva a növények különböző részeiben. A flavonoidokon kívül nem szabad elfeledkeznünk a fenolos savak csoportjáról sem, melyek közül a növényekben leggyakrabban előfordulók a ferula-, kumár-, kaftár- és kávésav (Clifford, 2000). A fenolos savak UV abszorpciója magasabb, mint a flavonoidoknak (Promkatkaew és mtsai., 2014), viszont az elnyelésük az UV-B tartományban jobb, mint az UV-A tartományban (Zhang és Li, 2011).

A nem enzimatis ROS semlegesítő tulajdonságok közül a H_2O_2 és $^1\text{O}_2$ antioxidáns kapacitásokat tanulmányoztuk, ugyanis a $^1\text{O}_2$ részt vesz a nagy intenzitású látható fény okozta fotoinhibícióban (Fischer és mtsai., 2013) és UV-A hatására is keletkezik a levelekben (Barta és mtsai., 2004), míg a H_2O_2 az UV-B stresszválaszok kulcsfaktora (Czégény és mtsai., 2016).

A ROS specifikus antioxidáns és UV abszorbeáló tulajdonságok vizsgálatához ugyanazokat a vegyületeket használtuk, mint a korábban tárgyalt TAC vizsgálatoknál (6.2.1 fejezet). Ilyen jellegű vizsgálatok eredményeiről már többen is beszámoltak, azonban jóval kevesebb vegyület bevonásával és statisztikai értékelés nélkül. Munkánk további újdonsága az antioxidáns és UV abszorbeáló képesség párhuzamos vizsgálata.

A vizsgált fenolos vegyületek UV abszorbeáló, $^1\text{O}_2$ és H_2O_2 semlegesítő antioxidáns tulajdonságait mérő módszerek eredményeit a 11. táblázat mutatja. Saját, TAC szerkezet-hatás összefüggés eredményeink és Tournaire és mtsai. (1993) $^1\text{O}_2$ semlegesítésen alapuló szerkezet-hatás vizsgálatai alapján a következő szubsztituensek befolyásolását vizsgáltuk: (i) az A és B gyűrű katekol struktúrája, a B gyűrű elektron delokalizációjáért felelős C gyűrűn elhelyezkedő (ii) kettős kötés és (iii) oxocsoport, valamint (iv) további -OH csoportok, melyek meglehetősen kritikus is lehet a molekula redukáló képességének szempontjából (Lotito és Frei, 2006). A három -OH csoporttal rendelkező pirogallol gyűrű magasabb antioxidáns aktivitást mutat a $^1\text{O}_2$ semlegesítésében, mint a kettős -OH csoporttal rendelkező katekol gyűrű (Mukai és mtsai., 2005), mely az UV abszorbeálását is támogatja (Agati és mtsai., 2012).

11. táblázat: Fenolos vegyületek UV abszorbeáló és ROS semlegesítő tulajdonságainak adatai.

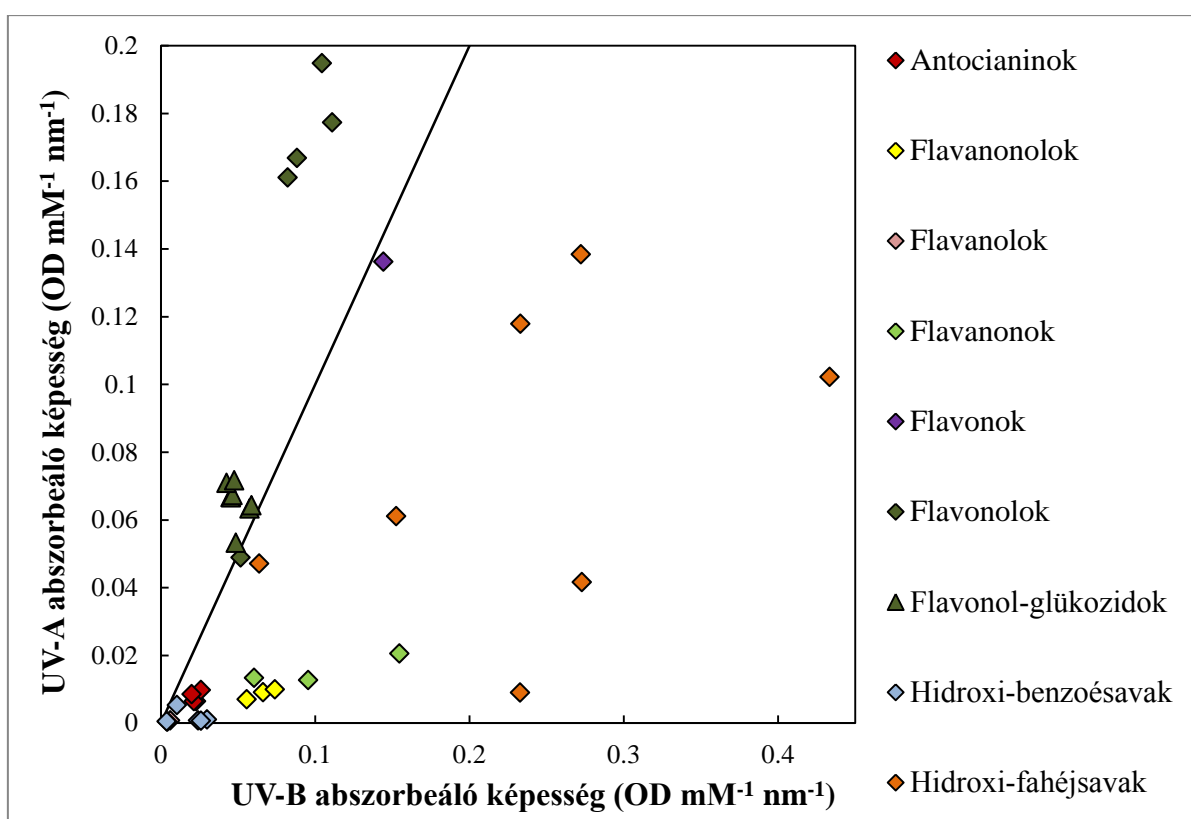
	UV-A	UV-B	¹ O ₂ semlegesítés	H ₂ O ₂ semlegesítés
Antocianinok				
Cianidin	9.7	26.0	1.770	1.745
Delfinidin	6.4	21.6	1.956	2.628
Malvidin	6.4	22.9	1.742	1.381
Pelargonidin	8.5	20.1	2.040	1.880
Flavanonolok				
Dihidro-kaempferol	7.0	55.7	0.000	0.819
Dihidro-miricetin	9.9	74.0	0.235	2.594
Dihidro-kvercetin	9.1	66.4	0.040	1.677
Flavanolok				
Katekin	0.4	4.2	0.136	2.046
Epikatekin	0.7	6.2	0.214	2.188
Flavanonok				
Heszperetin	20.5	154.7	0.0	1.319
Heszperidin	13.3	60.5	0.0	0.0
Naringenin	12.7	95.6	0.0	1.219
Flavonok				
Apigenin	136.2	144.3	0.119	0.0
Flavonolok				
Galangin	48.8	51.7	0.395	1.543
Izoramnetin	166.8	88.2	2.026	1.644
Kaempferol	177.3	111.1	1.231	2.619
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükózid	63.4	57.6	0.379	0.0
Kaempferol-3- <i>O</i> -glükuronsav	53.2	48.7	0.384	0.0
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	64.3	58.8	0.359	0.0
Miricetin	161.0	82.3	2.655	2.594
Miricetin-3- <i>O</i> -glükózid	70.9	42.6	1.224	1.621
Kvercetin	194.8	104.6	1.607	3.157
Kvercetin-3- <i>O</i> -galaktozid	71.6	47.7	0.777	2.174
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükózid	66.7	45.4	0.761	2.032
Kvercetin-3- <i>O</i> -glükuronsav	66.6	45.5	0.925	1.575
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	67.3	46.5	0.831	1.632
Hidroxi-benzoésavak				
2,3-dihidroxi-benzoésav	5.3	10.5	0.326	0.266
4-hidroxi-benzoésav	0.4	3.8	0.000	0.000
Galluszsav	0.7	26.1	0.165	1.958
Sziringsav	1.0	30.0	0.000	0.000
Vanillinsav	0.7	24.2	0.000	0.000

11. táblázat - folytatás

Hidroxi-fahéjsavak				
Kávésav	138.4	272.3	0.195	0.634
Kaftársav	47.0	63.9	0.251	0.462
p-kumársav	102.2	433.6	0.000	0.000
transz-3-hidroxi-fahéjsav	41.6	273.0	0.000	0.000
transz-ferulasav	117.8	233.1	0.112	0.000
o-kumársav	61.0	152.7	0.000	0.000
Egyéb				
Troxol	0.2	5.9	1.000	1.000

Az UV abszorbeáló tulajdonságot $\text{mM}^{-1} \text{nm}^{-1}$ egységekben (5.5.5 fejezet), míg a specifikus ROS semlegesítést μM Trolox ekvivalens egységekben határoztuk meg.

Az UV-A és UV-B abszorpciót összehasonlító 18. ábra a 11. táblázat adatait ábrázolja, és bemutatja, hogy a fahéjsav származékok rendkívül jó UV-B abszorbeáló tulajdonságot mutatnak a benzoésavakkal és az antocianinokkal szemben.



18. ábra

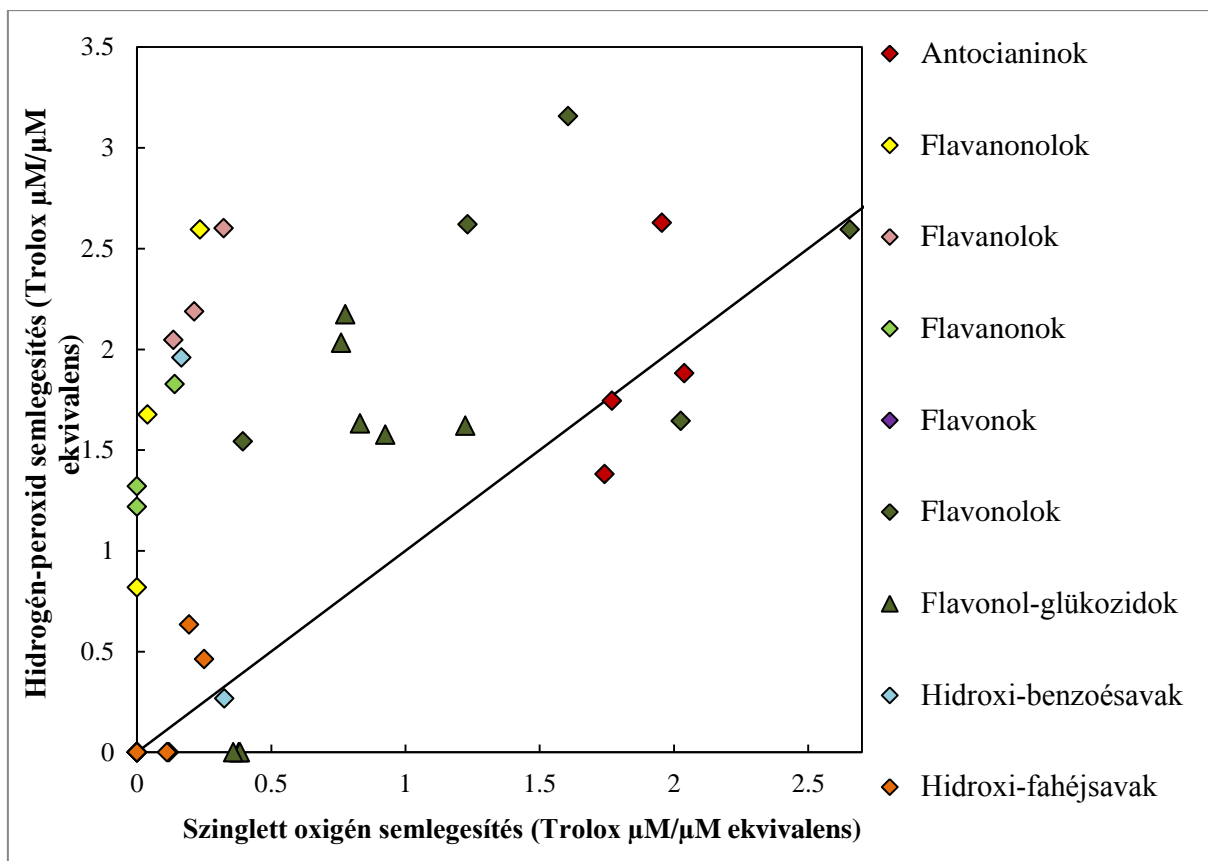
Fenolos vegyületek UV-A (315-400 nm) és UV-B (280-315 nm) tartományokra átlagolt moláris abszorpciós koefficienseinek összehasonlító grafikonja.

A vonal az egyenlő UV-A és UV-B abszorbeáló képességnek felel meg.

A flavanonok és flavanonolok szintén az UV-B abszorbeálásában vehetnek részt, ellenben a flavonoidok legnagyobb csoportját képviselő flavonolokkal és glükozidjaikkal, melyek sokkal jobb UV-A mint UV-B abszorbeálók (18. ábra). Az -OH és az -OCH₃ szubsztituensek egy batokromikus eltolódáshoz, míg a glükoziláltság hipszokromikus eltolódáshoz vezet a vegyületek abszorpciós spektrumában, melyet Harborne és mtsai. (1975) figyeltek meg, kvantumkémiailag számításokkal viszont Anouar és mtsai. (2011) támasztották alá. A B gyűrű katekol csoportja és az UV-B abszorbeáló tulajdonság közti negatív kapcsolatot sikerült statisztikai analízissel is alátámasztanunk (12. táblázat). Eredményeink arra is utalnak, hogy a kapcsolat ennél összetettebb, az -OH csoportok mennyiségén túl, azok elhelyezkedése is fontos, a flavonoidok UV-B abszorpciója például GAL < ISO, MYR < KAE < QUE sorrendet követ (11. táblázat). A -OCH₃ csoportok befolyásának vizsgálatához nem rendelkezünk megfelelő tesztvegyület párokkal.

Az UV-A abszorbeáló képességet a C gyűrű szubsztituensei befolyásolták. Megmutattuk, hogy mind a 4-oxocsoport, mind a 2,3 kettős kötés jelenléte erősítette ezt a tulajdonságot (12. táblázat). Méréseink szerint a flavonolok növényekben elsősorban előforduló (Manach és mtsai., 2004) cukorszármazékai sokkal rosszabb UV abszorbeáló tulajdonságot mutattak aglikonjaikhoz képest (11. táblázat), a glükozid csoport helyett a C-3 pozícióban jelen levő -OH csoport jelenléte és az UV abszorpció között azonban nem sikerült szignifikáns kapcsolatot találnunk (12. táblázat).

A vizsgált vegyületcsoportok H₂O₂ és ¹O₂ semlegesítő képességeit a 11. táblázat adatai alapján a 19. ábra szemlélteti. A ¹O₂ reakciója antioxidáns tulajdonságú vegyületekkel fizikai kioltáson vagy kémiai reaktivitáson alapulhat, a flavonoidok reakciói viszont alapvetően fizikai kioltás jellegűek, kémiai kioltásukat az irodalomban sokkal kisebbnek (Tournaire és mtsai., 1993) illetve elhanyagolhatónak (Mukai és mtsai., 2005) tartják. Ennek megfelelően az általunk alkalmazott, fizikai és kémiai kioltást együttesen mérő eljárás eredményei az előbbire vonatkoznak.



19. ábra

Fenolos vegyületek H_2O_2 és 1O_2 semlegesítő képességeinek összehasonlító grafikonja. A vonal az egyenlő H_2O_2 és 1O_2 semlegesítő képességnek felel meg.

A két különböző ROS semlegesítő kapacitásokat összehasonlítva megállapítottuk, hogy a fahéjsavak a kávésav és kaftársav kivételével nem rendelkeztek a H_2O_2 és 1O_2 semlegesítő tulajdonsággal. Utóbbiak nagy mennyiségben találhatóak meg növények különböző szöveteiben (Clifford, 2000), például méréseink szerint a Pinot noir levelek fenolos vegyületeinek kb. 20%-a kaftársav (9. táblázat). Így ezek a vegyületek szerepet játszhatnak az antioxidáns védelemben is. Az antocianinok alacsony UV abszorbeáló képességükkel ellentétben (18. ábra) kimagaslóan jó ROS semlegesítő antioxidánsok, közelítőleg azonos mértékben reagálnak mindkét vizsgált ROS-al (19. ábra). Ez a tulajdonság összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a levelek stresszválaszai többféle növényfajban is magukban foglalják az antocián tartalom növekedését (Chalker-Scott, 1999). A flavonolok kivételével a flavonoidok többsége nagyobb mértékű H_2O_2 mint 1O_2 semlegesítésre volt képes. A flavonol csoportot megvizsgálva azt találtuk, hogy az aglikonok sokkal jobb H_2O_2 és 1O_2 semlegesítők, mint a glükozidjaik (11. táblázat). A kaempferol cukorszármazékai például egyáltalán nem mutattak H_2O_2 semlegesítő képességet, és 1O_2 kioltó képességük is csak kb. harmada volt az

aglikonénak. Ez új megfigyelés, a flavonolokat legjobb tudomásunk szerint H₂O₂ antioxidáns tulajdonság tekintetében még nem vizsgálták, ¹O₂ reaktivitásuk vizsgálata is a kvercetin, kvercetin-rutinozid és miricetin mérésére korlátozódott (Tournaire és mtsai., 1993; Mukai és mtsai., 2005; Morales és mtsai., 2012).

Munkánk során a kvercetin-rutin pár vizsgálatán túl további méréseket végeztünk MYR, KAE és QUE glükozidokkal, és statisztikai analízissel is megerősítettük a korábban megfigyelteket: a C gyűrű -OH csoportja pozitívan befolyásolja a ¹O₂ antioxidáns tulajdonságot (12. táblázat). Új eredményünk, hogy ugyanez a szerkezet a H₂O₂ semlegesítést is elősegíti. A H₂O₂ antioxidáns tulajdonságot adataink alapján a katekol szerkezet is pozitívan befolyásolja (12. táblázat). Ezt a szerkezetet Tournaire és mtsai. (1993) a ¹O₂ semlegesítő képességgel hozták kapcsolatba 13 flavonoid (köztük 6 flavonol) mérése alapján. Vizsgálataink során egy ennél nagyobb adatbázisban (26 flavonoid, köztük 13 flavonol) statisztikai elemzéssel nem találtunk szignifikáns kapcsolatot.

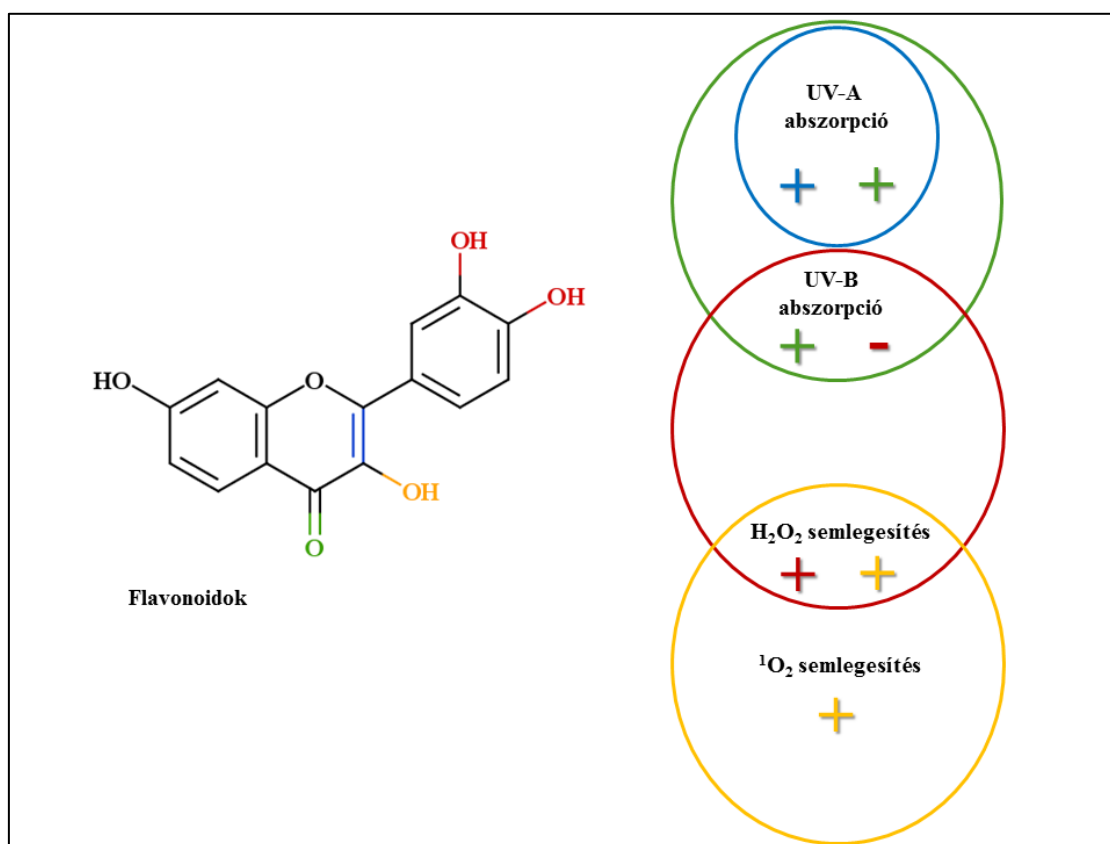
12. táblázat: Flavonoidok UV abszorbeáló és ROS semlegesítő antioxidáns értékeinek statisztikai összefüggései (n=26).

	UV-B abszorpció	UV-A abszorpció	¹ O ₂ semlegesítés	H ₂ O ₂ semlegesítés
3-OH jelenléte a C gyűrűben	0.114	0.955	(+) 0.020	(+) 6.68 10 ⁻⁴
4-oxo jelenléte a C gyűrűben	(+) 1.46 10 ⁻⁶	(+) 5.92 10 ⁻⁵	0.082	0.154
3'-OH és 4'-OH együttes jelenléte a B gyűrűn (katekol szerkezet)	(-) 0.036	0.970	0.213	(+) 1.92 10 ⁻⁴
2,3 kettős kötés a C gyűrűben	0.245	(+) 4.15 10 ⁻⁵	0.178	0.607

Az adott szerkezeti tulajdonság befolyását a vele rendelkező, illetve nem rendelkező vegyületek két csoportjának összehasonlításával vizsgáltuk. A táblázat a *p* értékeket tartalmazza (részletek az 5.6 fejezetben) *p*<0.05 szignifikáns hatások esetében azok irányát (+, -) is jelöltük.

Korábbi megfigyelések alapján a C gyűrű szubsztituensei és kettős kötése megnöveli a ¹O₂ kioltó képességet (Tournaire és mtsai., 1993; Morales és mtsai., 2012). Adataink alapján ezek közül a C gyűrű 3-OH jelenlétének pozitív hatását igazoltuk, az oxocsoport jelentőségére azonban nem találtunk bizonyítékot. A magyarázat az lehet, hogy Tournaire és mtsai. (1993) ezt a szerkezeti elemet csak a kémiai ¹O₂ kioltásban találták fontosnak, a fizikai kioltásban nem, így az utóbbi tulajdonság által dominált teljes kioltásban ez nem érvényesül.

A 20. ábra a 12. táblázatban bemutatott statisztikai elemzés eredményei alapján a flavonoidok szerkezet-hatás összefüggéseit szemlélteti.



20. ábra

A 12. táblázatban bemutatott flavonoid szerkezet-hatás összefüggések grafikus ábrázolása. Az ábrán lévő körök színei jelzik azokat az alapvázon található szubsztituenseket, amelyek az adott tulajdonságot befolyásolják.

A fenti szerkezet-hatás összefüggések a vizsgált vegyületek lehetséges UV abszorpciós és specifikus ROS semlegesítését mutatják, ezek megvalósulása a növényekben a flavonoidok lokalizációjától függ: az UV szűrésben játszott szerep attól, mennyire a felszín közeli rétegekben lokalizáltak a potenciálisan jó UV abszorbensek, az antioxidáns hatás pedig a ROS képzés helyéhez viszonyított elhelyezkedéstől.

Többféle növényfajban is megfigyelték, hogy az UV-B sugárzás hatására megnövekedik a flavonoidok, elsősorban a flavonolok mennyisége, még hozzá a kvercetin-glükozidoké jobban, mint a kaempferol-glükozidoké (Ryan és mtsai., 1998; Hofmann és mtsai., 2000; Reifenrath és Müller, 2007). Amennyiben a stressz válaszban ezek a vegyületek antioxidánsként vesznek részt, az a változás a TAC növekedés mellett ROS semlegesítésben is növekedést eredményez. Utóbbi sokkal nagyobb mértékű H₂O₂ mint ¹O₂ antioxidáns

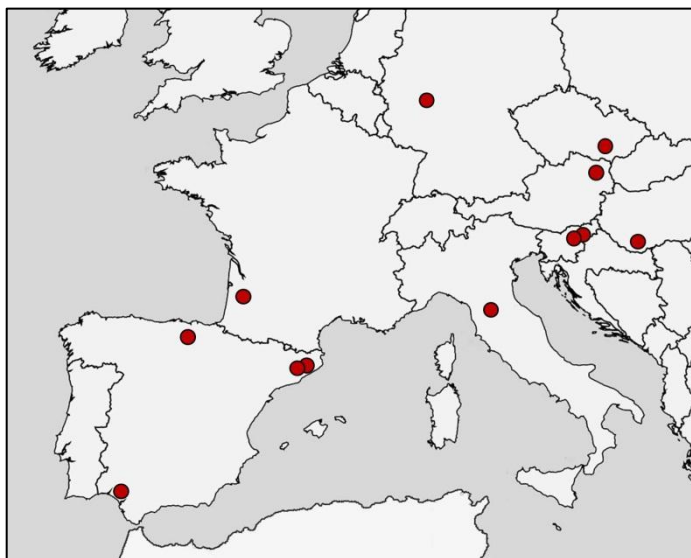
kapacitás növekedést tesz lehetővé (5. és 11. táblázatok), ami összhangban van a H₂O₂ központi szerepével az UV-B károsító hatásaiban (Czégény és mtsai., 2014). Érdekes, hogy bár a megfigyelt kvercetin/kaempferol származékok mennyiségi arány növekedése UV-B indukálható, ez a változás az UV-A abszorbeáló képességet növeli.

A napfény UV komponensének hatására a hidroxifahéjsavak mennyisége égerfa és nyírfa levelén végzett kísérletek alapján megemelkedik (Kotilainen és mtsai., 2008), melyek jobb UV-B, mint UV-A abszorbeálók. Antioxidáns tulajdonságaikat nézve azonban csekélyebbek, mint a flavonoidoknak. Az UV-B válaszok két aspektusa, a flavonol és a hidroxifahéjsav mennyiségi növekedése a bioszintézis útban kompetícióba kerülhet. A fokozott hidroxifahéjsav szintézis csökkentheti a flavonoid képződés prekursorainak mennyiségét, ezáltal támogatva az UV abszorpción alapuló védekezést. Amennyiben ez a védelmi út nem sikeres, és az UV eléri a mélyebben fekvő, fotoszintetizáló szöveteket, a ROS (elsősorban H₂O₂) semlegesítő flavonoidok szerepe kerül előtérbe. Ehhez a flavonoid bioszintézis fokozódása szükséges, ami a hidroxifahéjsavak szintézisétől von el prekursorokat.

6.4 Pinot noir leveleinek speciális metabolit vizsgálatai

A levelekben előforduló fenoloidok potenciális, tesztvegyületek vizsgálatai során megismert stressz ellen védő tulajdonságainak realizálódását szőlőlevél kísérletekben vizsgáltuk meg. A 6.2 fejezetben már bemutattuk két különböző évben ugyanabban a fejlődési stádiumban (zsendüléskor) gyűjtött minták összehasonlítását. Ebben a fejezetben egy átfogóbb tanulmány eredményeit mutatjuk be. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a napsugárzás UV tartománya, amely rügyfakadástól a zsendülésig éri a leveleket, erősebb fenoloid tartalmat szabályozó szereppel rendelkezik, mint egyéb környezeti tényezők, úgymint fotoszintetikusan aktív fény, csapadék vagy hőmérséklet. Utóbbiakról ismert, hogy szintén befolyásolhatják a levelek fenoloid tartalmát (Falvo és mtsai., 2011; Neugart és mtsai., 2013; Król és mtsai., 2015). PhD tanulmányaim során egy nemzetközi együttműködésben (COST Action UV4growth) vettem részt, melynek keretében vizsgáltuk a Pinot noir szőlő, különböző intenzitású és UV tartalmú, napfényhez alkalmazkodott leveleiben előforduló speciális anyagcseretermékek összetétel mintázatát. A levélmintákat különböző földrajzi szélességű helyekről gyűjtöttük egymást követő két évben (13. táblázat). A mintavételi helyeket a 21. ábra mutatja, ahol a legdélebbi mintavételi helyszín Spanyolország, Jerez városa, míg a legészakibb Németország, Geisenheim települése volt. A

kísérlet során meghatároztuk a Pinot noir levelének polifenol összetételét, melyet nem enzimatisz antioxiáns kapacitás és UV abszorbeáló pigment mérésekkel egészítettünk ki, kölcsönhatásokat keresve különböző metabolit csoportok és azok antioxiáns tulajdonságai között.



21. ábra

A dolgozatban vizsgált Pinot noir levelek mintavételi helyei.

13. táblázat: A 21. ábrán megjelölt Pinot noir mintavételi helyek adatai.

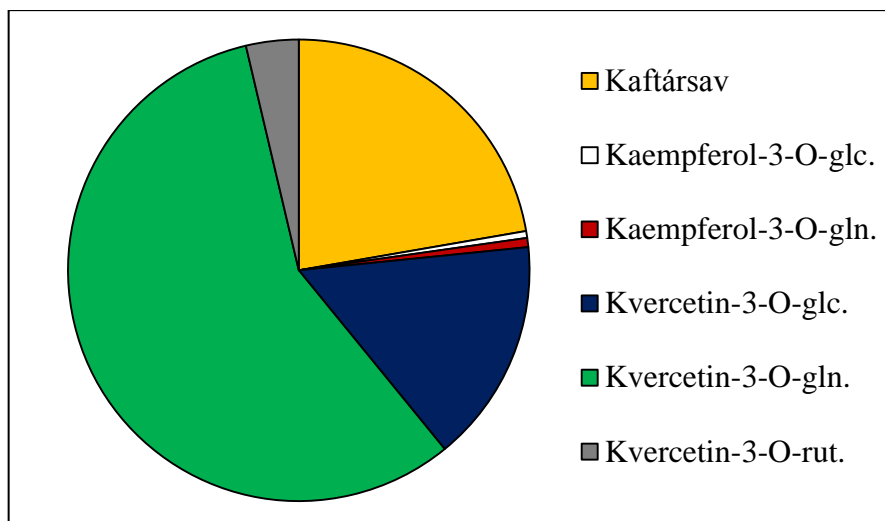
Mintavételi hely	Földrajzi szélesség (°N)	Mintavételi évek
Jerez, Spanyolország	36.69	2013
Cabanez, Spanyolország	42.24	2013
La Rioja, Spanyolország	42.29	2012, 2013
Girona, Spanyolország	42.47	2012, 2013
Villenave, Franciaország	43.36	2012, 2013
Firenze, Olaszország	43.77	2012, 2013
Potoce, Szlovénia	45.88	2013
Bilje, Szlovénia	45.89	2013
Pécs, Magyarország	46.07	2012, 2013
Retz, Ausztria	48.76	2012, 2013
Lednice, Csehország	48.80	2012, 2013
Geisenheim, Németország	49.99	2013

A rügyfakadás és a levélminták begyűjtése (zsendülés) közti legrövidebb levélfejlődési idő a gironai mintákhoz tartozott (98 nap és 93 nap 2012-ben és 2013-ban), míg a leghosszabb 2012-ben a bordeaux-i (133 nap) és 2013-ban a bécsi (146 nap) mintákra volt a jellemző.

A kísérlethez meteorológiai adatokat is használtunk, melyeket a levelek fejlődési időszakaira határoztak meg. A hőmérséklet és csapadékösszeg adatokat részben a mintavételi helyekről gyűjtöttük, míg az UV és globális napsugárzás adatokat a Firenzei Egyetemen számították ki az European Space Agency' Tropospheric Emission Monitoring Internet Service (TEMIS) műholdas adatai alapján. A teljes levélfejlődésre számított globális sugárzás értéke 2012-ben átlagosan 12.78 MJ m^{-2} (Retz) és 23.51 MJ m^{-2} (Firenze), míg 2013-ban 18.34 MJ m^{-2} (Geisenheim) és 23.78 MJ m^{-2} (Jerez) között változott. A csökkenő földrajzi szélességgel a leveleket ért globális sugárzás és az UV sugárzás értéke is csökkent. A levelek speciális anyagcseretermékei jól korreláltak az UV sugárzással, sőt jobban, mint a globális sugárzással, melyek részletesebb eredményei a következő fejezetekben kerülnek bemutatásra. Elképzelhető, hogy nem az összes lehetséges környezeti tényezőt vizsgáltuk, azonban a metabolikus válaszokból következtethetünk azon akklimatizációs stratégiákra, mint az UV abszorbeáló és antioxidáns vegyületek mennyiségi megemelkedésére.

A levelek fenolos vegyületeinek analízisét HPLC-MS vizsgálatokkal Németországban végeztük, az UV abszorbeáló pigment tartalom és antioxidáns kapacitás méréseket, valamint az adatmátrix analízisét Magyarországon, a PTE Növénybiológiai Tanszékén. A kutatóhálózat vizsgálatai a fentiek mellett más metabolitok (antioxidánsok és xantifillok) elemzésére is kiterjedtek, a dolgozatban azonban csak azokat a paramétereket tárgyalom, melyek mérésében és értékelésében részt vettem.

A főbb polifenolos csoportok ugyanazok voltak az összes Pinot noir levélmintában, mennyiségi arányaik és teljes mennyiségük azonban az egyes mintavételi helyekről származó mintákban különböző volt. A domináns fenolos sav valamennyi mintában a kaftársav volt, míg a legjelentősebb flavonoidok a kvercetin különféle cukorszármazékai (glükozid és glükuronsav), melyet a Pécsről származó minta példája mutat be (22. ábra).



22. ábra

A pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szentmiklósi mintavételi területéről, zsendüléskor gyűjtött Pinot noir levélminták fenoloid összetétele a 2012-es évből.

6.4.1 Környezeti tényezők és a Pinot noir levelében megtalálható speciális metabolitok összefüggései

A 14. táblázat a levelek fejlődése során az egyes mintavételi helyeken mért átlagos hőmérsékletet, a rügyfakadás és zsendülés közti időszakra számított integrált UV illetve globális sugárzás mennyiségének összefüggéseit mutatja a levelek fenolos vegyület tartalmával, UV abszorpciós képességével és antioxidáns kapacitásával. Az adatok vizsgálata alapján a domináns korrelátor egyértelműen az UV sugárzás volt, mely pozitívan befolyásolta az UV abszorbeáló, flavonoid, fenolos sav, valamint teljes fenol tartalom mennyiségét és a FRAP módszerrel mért antioxidáns kapacitást. A földrajzi szélességgel szintén változó globális napsugárzás változása (amit részben a napsugárzás erősségének, részben a napok hosszúságának különbsége okozott) nem befolyásolta szignifikánsan a vizsgált metabolikus jellemzőket. A napi átlaghőmérséklet pozitív korrelációban csak az UV-B abszorbeáló képességgel volt, a többi paraméterrel nem volt szignifikáns kapcsolatban. A csapadékösszeggel és a rügyfakadástól zsendülésig (mintavételig) eltelt teljes napok számával nem találtunk korrelációt (ezek az adatok nem szerepelnek a táblázatban). Eredményeink alapján a napfény magasabb UV tartalma befolyásolta a szőlőlevelek UV abszorbeáló pigment tartalmát, a levelekben előforduló fenolos tulajdonságú vegyületek mennyiségét, valamint a levelek teljes antioxidáns kapacitását.

14. táblázat: Kapcsolat a mintavételi helyek néhány meteorológiai jellemzője és a Pinot noir levelek metabolit összetétele, UV abszorpciós képessége és antioxidáns kapacitása között.

	Globális sugárzás (rügyfakadástól a mintavételig)	Teljes UV sugárzás (rügyfakadástól a mintavételig)	Napi átlaghőmérséklet
UV-B abszorpció	0.3983 (0.1017)	0.5667 (0.0141)	0.4726 (0.0476)
UV-A abszorpció	0.3857 (0.1139)	0.50637 (0.0320)	0.4227 (0.0806)
UV abszorpció	0.3910 (0.1086)	0.52677 (0.0247)	0.4396 (0.0679)
TEAC	0.3678 (0.1332)	0.42447 (0.0792)	-0.0155 (0.9513)
FRAP	0.3434 (0.1630)	0.51357 (0.0293)	-0.0064 (0.9800)
Teljes fenol tartalom	0.3763 (0.1238)	0.54157 (0.0203)	0.2007 (0.4246)
Fenolos sav tartalom	0.1848 (0.4629)	0.51037 (0.0305)	-0.0423 (0.8676)
Flavonoid tartalom	0.4001 (0.0999)	0.49557 (0.0365)	0.2270 (0.3651)
Kvercetin-3-O-gln.	0.3951 (0.1047)	0.49647 (0.0361)	0.2234 (0.3726)

A táblázatban szereplő értékek a Pearson-féle korrelációs analízis R értékei, míg a zárójelben lévő számok hipotézisvizsgálat *p* értékei (5.6 fejezet), ahol a szignifikáns korrelációkat ($p < 0.05$) félkövér számokkal jelöltük ($n=18$).

Üvegház kísérletek során szőlőlevelek UV abszorbeáló kapacitása UV-B hatására megemelkedik (Martínez-Lüscher és mtsai., 2013), azonban ebben a kísérletben a szerzők napfénynél alacsonyabb intenzitású látható fényvel (így globális sugárzás dózissal) együtt alkalmazták az UV-B kezelést. Az itt tárgyalt szabadföldi kísérleteink újdonsága, hogy teljes napfényben fejlődött levelek eredményeivel bizonyítottuk, hogy a környezeti tényezők közül a teljes UV sugárzásnak volt szignifikáns hatása a levelek UV abszorbeáló és antioxidáns kapacitására.

A levélkivonatok UV-B és UV-A abszorpciója pozitív korrelációt mutatott a teljes UV sugárzással, melyek az UV-B és UV-A általi polifenol bioszintézis szabályozásával (Morales

és mtsai., 2010) és a polifenolok erős UV abszorbeáló tulajdonságával (Hernández és mtsai., 2009) magyarázhatóak. Az analízis során pozitív korrelációt találtunk az átlaghőmérséklet és a levélkivonatok UV-B abszorpciója között, azonban nem találtunk szignifikáns összefüggést a hőmérséklet és az UV-A és a teljes UV abszorbeáló képesség között, melynek mögöttes biológiai kapcsolatát még érdemes vizsgálni. A teljes antioxidáns kapacitást FRAP és TEAC módszerekkel vizsgáltuk, melyek közül csak a FRAP mutatott szignifikáns összefüggést a leveleket fejlődésük során ért UV sugárzással. Ezt a 6.2.1 fejezetben leírtak magyarázhatják, ami alapján a fenoloid komponensek, a kaftársav és a különféle kvercetin-glükozidok magasabb TAC értékeket adnak a FRAP, mint a TEAC módszerrel (Csepregi és mtsai., 2016), ezért az UV indukálta változásokat ezekben a fenolos vegyületekben gazdag levélmintákban jobban tükrözi a FRAP, mint a TEAC (14. táblázat).

6.4.2 A speciális metabolitok összefüggései a levelek UV abszorbeáló és antioxidáns tulajdonságaival

Amellett, hogy kapcsolatokat azonosítsunk a fejlődésük során a leveleket ért teljes UV sugárzás és levelek metabolikus jellemzői között, adataink lehetőséget biztosítottak arra is, hogy összefüggéseket találjunk a fenolos vegyületek mennyisége és az antioxidáns kapacitás, illetve a levelek UV abszorpciója között. Eredményeink alapján a szőlőlevél teljes polifenol tartalma erős pozitív korrelációt mutat a levélkivonatok UV-A és UV-B abszorpciójával. Ez összhangban van azzal, hogy a polifenolos vegyületek egy része a levelek felszíni szöveteiben az UV sugárzást elnyelve a mélyebb rétegeket védő pajzsként funkcionálnak (Bidel és mtsai., 2015). A kvercetin-3-O-glükuronsav, ami önmagában tesztvegyületként kb. másfélszer jobb UV-A mint UV-B abszorbeáló volt (11. táblázat), a levelek fő flavonol glükozidjaként erős pozitív korrelációt mutatott a teljes levélkivonatok UV-A, és UV-B abszorpciók tulajdonságával is. A tesztvegyületek mérései során a magas UV-B abszorpciót mutató fenolos savak (11. táblázat) mennyisége a levelekben az UV-B abszorpcióval mutatnak korrelációt, az UV-A abszorpcióval nem (15. táblázat). A szőlőlevelekben a fenoloidok környezeti tényezők okozta mennyiségi változásainak és a levélkivonatok UV abszorbeáló tulajdonságainak összefüggései ezzel megerősítik a tesztvegyületek vizsgálatának alapján megállapítottakat.

A levelek fenoloidjai UV abszorbeáló képességük mellett jó antioxidánsokként is ismeretesek (Larson, 1988). Ezt a tulajdonságot a 6.2.1 és 6.3.2 fejezetekben ismertetett vizsgálatunk is alátámasztották. Bár a levelekben nem kizárólag a fenoloidok rendelkeznek antioxidáns tulajdonsággal, szőlőlevél kísérletünkben a HPLC-val mért teljes fenoltartalom és

antioxidáns kapacitás közötti pozitív korreláció azt mutatja, hogy ez a funkció a szőlő levelében is domináns. Ezt mind a FRAP, mind a TEAC módszerrel igazoltuk (15. táblázat).

15. táblázat: Kapcsolatok a Pinot noir levelek HPLC-vel mért fenoloid összetétel, TAC módszerekkel mért antioxidáns kapacitás és fotométeres eljárással mért UV abszorbeáló pigment tartalma között.

	UV-B absz.	UV-A absz.	UV absz.	TEAC	FRAP	Teljes fenol tartalom	Fenolos sav tartalom	Teljes flavonoid tartalom
UV-A absz.	0.982 ($4.7 \cdot 10^{-13}$)							
UV absz.	0.9914 ($1.5 \cdot 10^{-15}$)	0.998 ($2.8 \cdot 10^{-21}$)						
TEAC	0.470 (0.0490)	0.385 (0.1140)	0.412 (0.0885)					
FRAP	0.698 (0.0013)	0.648 (0.0036)	0.666 (0.0025)	0.914 ($1.1 \cdot 10^{-7}$)				
Teljes fenol tartalom	0.902 ($3.0 \cdot 10^{-7}$)	0.916 ($8.9 \cdot 10^{-8}$)	0.915 ($9.6 \cdot 10^{-8}$)	0.522 (0.0261)	0.738 ($4.6 \cdot 10^{-4}$)			
Fenolos sav tartalom	0.523 (0.0259)	0.438 (0.0688)	0.466 (0.0513)	0.750 ($3.3 \cdot 10^{-4}$)	0.783 ($1.2 \cdot 10^{-4}$)	0.622 (0.0058)		
Teljes flavonoid tartalom	0.894 ($5.4 \cdot 10^{-7}$)	0.927 ($2.9 \cdot 10^{-8}$)	0.921 ($5.9 \cdot 10^{-8}$)	0.439 (0.0683)	0.665 (0.0026)	0.986 ($6.5 \cdot 10^{-14}$)	0.488 (0.0399)	
Kvercetin-3-O-gln tartalom	0.859 ($4.8 \cdot 10^{-6}$)	0.887 ($9.2 \cdot 10^{-7}$)	0.882 ($1.3 \cdot 10^{-6}$)	0.422 (0.0803)	0.629 (0.0051)	0.970 ($2.5 \cdot 10^{-11}$)	0.472 (0.0478)	0.9855 ($9.2 \cdot 10^{-14}$)

A táblázatban szereplő értékek a Pearson-féle korrelációs analízis R értékei, míg a zárójelben lévő számok hipotézisvizsgálat *p* értékei (5.6 fejezet), ahol a szignifikáns korrelációkat ($p < 0.05$) félkövér számokkal jelöltük ($n=18$).

A tesztvegyületek korábbi példája (6.2 fejezet) azt mutatta, hogy a különböző TAC-ot mérő módszerek eredményei hasonlóak lehetnek, de nem teljesen redundánsak. A levélminták vizsgálata ezt igazolta (15. táblázat). A flavonoid összetételeik változása hasonlóan befolyásolta mindkét TAC mérés eredményét, és a fenolos sav tartalom pozitív korrelációban volt a TEAC és FRAP eredményekkel is. A levelek flavonoid és kvercetin-3-O-glükuronsav tartalmai azonban csak a FRAP módszer eredményeivel mutattak szignifikáns összefüggést. A kapcsolat a TEAC eredményekkel marginális ($p=0,07$ illetve $0,08$), a szignifikancia határ feletti volt. A teljes fenolos sav tartalom szoros korrelációját jól magyarázza a Pinot noir levelében domináns fenolos sav, a kaftársav magas TEAC és FRAP antioxidáns kapacitása (5.

táblázat) (Csepregi és mtsai., 2016). A Pinot noir levelekben a kvercetin-3-O-glükuronsav a legnagyobb mennyiségben előforduló flavonoid, tesztvegyület vizsgálataink alapján kb. kétszer nagyobb FRAP mint TEAC antioxidáns kapacitással rendelkezik (5. táblázat), ami magyarázhatja a levélkivonatokban a megfigyelt különbségeket.

A két TAC mérő módszer (TEAC és FRAP) eredményei pozitív korrelációban voltak, alátámasztva a 6.2 fejezetben leírt következtetéseinket. Az antioxidáns kapacitás (mind a TEAC mind a FRAP módszerrel mérve) pozitív korrelációt mutattak a levelek teljes fenolos vegyület tartalmával.

A fenolos savak és flavonoidok mennyiségi összehasonlítása során pozitív korrelációt találtunk, ezért a korábbi tesztvegyületekkel végzett kísérleteink során megfigyelt lehetséges UV alkalmazkodási stratégiákat most a Pinot noir szőlő leveleiben is megvizsgáltuk. A szőlőlevelek legjellemzőbb fenolos savja a kaftársav, míg a flavonoidok közül a kvercetin-glükozidok a jellemzőbbek. A 6.3.2 fejezet eredményei alapján a hidroxifahéjsavak kiváló UV abszorbeáló tulajdonsággal, míg a kvercetin-glükozidok jobb specifikus ROS semlegesítő antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek. A legkisebb (Bécs, Geisenheim) és legnagyobb (Girona, La Rioja) teljes UV besugárzással jellemzett területeken fejlődött levelek fenoloid profilját összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a fenolos savak és flavonoidok mennyisége csaknem egyenlő mértékben növekedett (20%), a fenti pozitív korrelációnak megfelelően (15. táblázat). A két féle feltételezett védelmi útvonal (UV abszorpción alapuló és antioxidáns védelem) a szőlőlevelek alkalmazkodásához egyaránt hozzájárul.

6.4.3 Flavonoid tartalmat becslő spektrofotométeres eljárások hatékonyságának vizsgálata Pinot noir levélkivonatok segítségével

A különböző természetes UV dózisok alatt növekedett, különböző metabolit tartalmú levelek alkalmasak arra, hogy az 5.4 és 5.5 fejezetekben bemutatott fotométeres fenoloid tartalmat becslő módszerek pontosságát ismert összetételű levélmintákon is megvizsgáljuk. Vizsgálataink folyamán a Pinot noir leveleit spektrofotométeres méréseknek is alávetettük, összehasonlítva a HPLC és antioxidáns eredményekkel. Az eredményeket a 16. táblázat mutatja. Megvizsgáltuk a fenolos vegyületcsoportok mennyiségi adatainak kapcsolatát az AlCl_3 és DNPH teljes flavonoid meghatározó módszer, valamint a flavan-3-olokat mérő DMACA és a teljes fenol tartalmat hagyományosan mérő FCR mérési eljárással, melyeknek statisztikai korrelációit a 16. táblázat mutatja. Az eredmények azt mutatják, hogy a két (AlCl_3

és DNPH-alapú) teljes flavonoid tartalmat mérő fotométeres módszer eredményei pozitív korrelációban álltak egymással, ami nem meglepő, ugyanis mindkettővel flavonoid tartalmat mérünk, azonban eltérő flavonoid csoportokat tudunk spektrofotometriásan meghatározni (6.1.1 fejezet).

16. táblázat: Pinot noir levelének HPLC-vel mért összetétel és fotométeres eljárásokkal becsült flavonoid tartalom összehasonlítása.

	Teljes fenol tartalom	Fenolos sav tartalom	Teljes flavonoid tartalom	QUE-3-gln tartalom	FCR	AlCl ₃	DNPH
FCR	0.711 (0.0009)	0.747 (0.0003)	0.644 (0.0039)	0.625 (0.0055)			
AlCl ₃	0.787 (0.0001)	0.735 (0.0005)	0.718 (0.0007)	0.705 (0.0010)	0.906 (2.27 10 ⁻⁷)		
DNPH	0.927 (3.33 10 ⁻⁸)	0.646 (0.0038)	0.898 (4.27 10 ⁻⁷)	0.883 (1.2 10 ⁻⁶)	0.846 (9.49 10 ⁻⁶)	0.895 (5.2 10 ⁻⁷)	
DMACA	0.446 (0.0632)	0.706 (0.0010)	0.361 (0.1416)	0.313 (0.2065)	0.746 (0.0003)	0.566 (0.0143)	0.502 (0.0336)

A táblázatban szereplő értékek a Pearson-féle korrelációs analízis R értékei, míg a zárójelben lévő számok hipotézisvizsgálat *p* értékei (5.6 fejezet), ahol a szignifikáns korrelációkat (*p*<0.05) félkövér számokkal jelöltük (n=18).

Összehasonlítva a HPLC eljárás eredményével, azt tapasztaltuk, hogy a két flavonoid mérő eljárás eredményei pozitív korrelációban vannak a teljes flavonoid tartalommal, összhangban az eljárások flavonoid kimutató képességével. Ezen felül eredményeink korrelációban voltak a teljes fenol tartalommal is, ami magyarázható azzal, hogy a szőlőlevél minták 70-80%-át flavonoidok adták. A fenolos savak mennyiségével mutatott pozitív korreláció azonban azt mutatja, hogy a módszerek nem flavonoid specifikusak, ahogy ezt tesztvegyületek segítségével igazoltuk (6.1.1 fejezet). A DMACA eljárás eredménye szintén pozitív korrelációt mutatott a levelek fenolos sav tartalmával (16. táblázat), bár gallusz savval végzett vizsgálataink során a módszer nem mutatott reaktivitást. Ennek alapján a korábban feltételezett flavan-3-olok specificitását (6.1.1 fejezet) el kell vetnünk.

Összefoglalva, a 6.1.1 fejezet példáján túl az itt bemutatott levélminta elemzések is alátámasztják, hogy ezek a spektrofotométeres mérések annak ellenére, hogy jó becslést adnak flavonoid csoportokra, esetleg teljes flavonoid tartalomra, sosem szabad specifikus flavonoid tartalmat meghatározó módszernek tekintenünk.

7. Összefoglalás

Munkánk során a természetes napfényhez alkalmazkodott szőlő levelekben előforduló fenolos vegyületek fénystressz kivédésében játszott lehetséges szerepeit vizsgáltuk antioxidáns és UV abszorbeáló képességük alapján, tiszta hatóanyagok és szőlőlevél kivonatok segítségével.

37 szintetikus tesztvegyület antioxidáns tulajdonságait tanulmányoztuk négyféle teljes (TAC) és kétféle ROS specifikus antioxidáns kapacitást mérő eljárással. Az eredményeink azt mutatták, hogy

- az alapvázhoz kapcsolódó funkciós csoportok jobban befolyásolják a TAC értékeket, mint maga az alapváz szerkezet
- a hagyományos Folin-Ciocalteu reagens használatán alapuló módszert célszerűbb az antioxidáns tulajdonság mérésére alkalmazni, mint a teljes fenol tartalom meghatározására
- a különböző TAC eljárások a fenolos vegyületeket hasonlóan, de teljesen nem azonos módon értékelik, ami kiemeli a többféle mérési eljárás párhuzamos alkalmazásának szükségességét biológiai kísérletekben. Ezt szőlőlevelek HPLC-MS módszerrel meghatározott fenoloid összetételének és TAC tulajdonságainak összehasonlítása is megerősíti

Tanulmányunk az első olyan munka, amely négy különböző TAC mérési eljárást hasonlít össze a lehetséges redundanciákat és különbségeket vizsgálva. A tapasztalt különbségek magyarázataként elvégzett szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatok megmutatták, hogy

- a flavonoidok katekol szerkezete magas antioxidáns értékeket eredményez az összes vizsgált módszerrel
- a flavonoidok C-3 glükóziláltsága csökkenti az antioxidáns kapacitásukat
- többféle fenolos sav mutat a flavonoidokéhoz hasonló mértékű antioxidáns kapacitást, amit alapvetően a 3-OH csoport megléte befolyásol, függetlenül a hidroxifahéjsavakat és a hidroxibenzoésavakat elkülönítő oldallánc jelenlététől

A levelek napfényhez történő alkalmazkodását potenciálisan elősegítő tulajdonságok között megvizsgáltuk az UV-válaszhoz hozzájáruló H₂O₂ semlegesítő képesség és UV abszorbeáló képességet, továbbá a látható fény okozta stressz (fotoinhibíció) mérséklését

segítő $^1\text{O}_2$ semlegesítő képességet. Előbbihez elvégeztük a nem enzimikus H_2O_2 kioltást mérő eljárás optimalizálását is magas UV abszorpciójú minták elemzésére. A tiszta hatóanyagok vizsgálata során megállapítottuk, hogy

- a hidroxibenzoéssavak fontos szerepet játszhatnak a H_2O_2 semlegesítésében, míg a hidroxifahéjsavak sem a H_2O_2 , sem a $^1\text{O}_2$ semlegesítésében nem mutattak jelentős aktivitást, ellenben jó UV-B abszorbeálók
- a flavonoidok általában jobb UV-A, mint UV-B abszorbeálók

A megfigyelt tulajdonságokat az alábbi, statisztikai módszerekkel alátámasztott szerkezet-hatás összefüggések indokolják

- a flavonol aglikonok általában jobb H_2O_2 és $^1\text{O}_2$ semlegesítők, mint glükozidjaik, viszont glükoziláltságuk nem befolyásolja szignifikánsan az UV abszorbeáló képességüket sem az UV-B sem az UV-A tartományban
- a katekol csoport jelenléte pozitív korrelációban áll a H_2O_2 semlegesítő képességgel, azonban csökkenti az UV-B abszorpciót
- a 4-oxocsoport jelenléte megnövelte mind az UV-B mind az UV-A abszorbeáló képességet, de nem volt szignifikáns befolyással a ROS semlegesítő képességre

Tizenkettő európai szőlészetből származó, eltérő környezeti paraméterek mellett fejlődött szőlőlevél minta összehasonlító vizsgálata során megállapítottuk, hogy

- a vizsgálatban regisztrált környezeti tényezők közül a levelek fenoloid tartalmát, TAC illetve UV abszorpciós képességét elsősorban a fejlődésük során jelen levő kumulatív UV sugárzás határozta meg
- az egyes tesztvegyületek megállapított tulajdonságai a sokféle fenoloidot tartalmazó levélkivonatokban is érvényre jutnak: a fenolos sav tartalom csak az UV-B abszorbeáló képességgel, míg a flavonoid tartalom az UV-A és az UV-B abszorpciós képességgel is pozitív korrelációban volt
- levelek antioxidáns kapacitása, az UV abszorpciós képessége és fenolos vegyület tartalma szoros összefüggést mutatott

A tesztvegyületek, valamint a HPLC-MS segítségével azonosított fenoloid profilú szőlőlevél kivonatok vizsgálata lehetőséget biztosított arra is, hogy ellenőrizzük az irodalomban elterjedt spektrofotométeres, egyes flavonoid vegyületcsoportok mennyiségi meghatározására irányuló eljárások szelektivitását. Megállapítottuk, hogy

- ezek az egyszerű, gyors és költséghatékony eljárások jó becslést, támpontot adhatnak, azonban a célcsoportjukon kívüli vegyületekkel (például fenolos savakkal) is mutatnak reaktivitást. Így nem lehet ezeket precíz mennyiségi meghatározására alkalmas specifikus módszerekként kezelni

8. Summary

Due to their antioxidant and UV-absorbing capacities, phenolic compounds in leaves are expected to play an important role in acclimation to a variety of stress conditions. The aim of our work was to analyse these potentials using synthetic test compounds; and to study the realization of potential protective functions in sun exposed grapevine leaves. In addition to UV-A (315-400 nm) and UV-B (280-315 nm) absorbing abilities, we measured total antioxidant capacities (TAC) and specific ROS (hydrogen peroxide and singlet oxygen) detoxification.

Antioxidant activities of 37 standard compounds were studied using four TAC and two ROS specific antioxidant capacity evaluating methods. Our results showed that:

- TAC was more influenced by functional groups than the backbone structure itself
- the classic Folin-Ciocalteu reagent method is more appropriate to measure antioxidant activities than total phenolic content.
- different phenolic compound groups are evaluated by different TAC assays in a similar but redundant way, highlighting the necessity of parallel application of more than one TAC assays in biological experiments. This was confirmed by comparing using TAC results of grapevine leaf samples with different phenolic profiles characterized by HPLC-MS

To our best knowledge, our work is the first study comparing four different TAC methods and examining redundancies and differences. The TAC data set also allowed statistical analyses of structure-activity relationships, showing that:

- catechol structure of flavonoids results in high antioxidant capacities, manifesting in all TAC methods
- the C-3 glycosylation reduces the antioxidant capacity
- phenolic acids showed similar antioxidant activities as flavonoids. This feature was positively correlated to the presence of the 3-OH group, and was independent of the presence of the side chain discriminating between hydroxycinnamic- and hydroxybenzoic-acids.

In addition to TAC we examined ROS specific antioxidant capacities. In addition to UV absorbtion, H₂O₂ neutralizing is expected to contribute to defence against stress by solar UV radiation. Evaluation of the latter required an adaptation of existing methodology in order

to be suitable for studying H₂O₂ reactivities of compound with high UV absorption, such as phenoloids. We also measured ¹O₂ scavenging capacities, which may alleviate stress by the photosynthetically active (400-700 nm) component of sunlight. Investigations of test compounds showed that

- hydroxybenzoic-acids are strong H₂O₂ antioxidants, while hydroxycinnamic-acids showed very low activities to both H₂O₂ or ¹O₂
- hydroxycinnamic-acids are good UV-B absorbers, while flavonoids are better UV-A than UV-B absorbers

These properties are explained by the following, structure-activity relationships:

- the presence of -OH group of C ring (the absence of glycosylation at this position) supported both H₂O₂ and ¹O₂ scavenging but had no significant effect on UV absorbing properties in our data set.
- the presence of the catechol group resulted in higher H₂O₂ neutralization but in lower UV-B absorbing capacity
- the presence of 4-oxo group in C ring increased both UV-A and UV-B absorption, but had no significant effect on ROS scavenging abilities.

In a study including grapevine leaf samples from 12 different European locations with different environmental conditions such as global radiation, UV radiation, precipitation and temperature during leaf development we confirmed the above potential protective features by finding that:

- among all registered environmental parameters, leaf phenolic contents, TAC values and UV absorbing capacities were only correlated to cumulative UV radiation
- properties of leaf extracts correspond to the properties of their phenolic compounds: phenolic-acid contents were positively correlated with UV-B capacities of leaf extracts, while flavonoid contents were positively correlated with both UV-B and UV-A absorbing properties
- UV absorbing capacities (UV-A, UV-B), TAC and leaf phenolic contents were correlated.

Using individual phenolic standards and leaf extracts with known (HPLC-MS established) phenolic composition we investigated the selectivity and versatility of several

photometric methods routinely applied to evaluate quantities of compound groups such as flavonoids or catechols and found that

- spectrophotometric assays may give good estimates of flavonoid groups but lack specificity and thus should be applied with caution.

9. Irodalomjegyzék

- Agati, G.; Tattini, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* **2010**, 186, 786-793.
- Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* **2012**, 196, 67-76.
- Alscher, R.G.; Erturk, N.; Heath, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* **2002**, 53, 1331-1341.
- Anouar, E.H.; Gierschner, J.; Duroux, J.L.; Trouillas, P. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chem.* **2012**, 131, 79-89.
- Arnous, A.; Makris, D.P.; Kefalas, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J Agric Food Chem.* **2001**, 49, 5736-5742.
- Arts, I. C.; Hollman, P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* **2005**, 81, 317-325.
- Asada, K. Ascorbate peroxidase a hydrogen-peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant.* **1992**, 85, 235-241.
- Aust, D.S.; Morehouse, A.L.; Thomas, E.C. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radic Biol Med.* **1985**, 1, 3-25.
- Barta, Cs.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I.; Hideg, É. Differences in the ROS generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Funct Plant Biol.* **2004**, 31, 23-28.
- Baucher, M.; Monties, B.; Van Montagu, M.; Boerjan, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci.* **1998**, 17, 125-197.
- Beckman, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant Pathol.* **2000**, 57, 101-110.
- Bela, K.; Horváth, E.; Gallé, Á.; Szabados, L.; Tari, I.; Csiszár, J. Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J Plant Physiol.* **2015**, 176, 192-201.
- Bengoechea, M.L.; Sancho, A.I.; Bartolomé, B.; Estrella, I.; Gómez-Cordovés, C.; Hernández, T. Phenolic composition of industrially manufactured purées and concentrates from peach and apple fruits. *J Agric Food Chem.* **1997**, 45, 4071-4075.

- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Anal Biochem.* **1996**, *239*, 70-76.
- Bergman, M.; Perelman, A.; Dubinsky, Z.; Grossman, S. Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucuronated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. *Phytochemistry.* **2003**, *62*, 753-762.
- Berli, F.; D'Angelo, J.; Cavagnaro, B.; Bottini, R.; Wuilloud, R.; Silva, M.F. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *J Agr Food Chem.* **2008**, *56*, 2892-2898.
- Berli, F.; Fanzone, M.; Piccoli, P.; Bottini, R. Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *J Agr Food Chem.* **2011**, *59*, 4874-4884.
- Bényei, F.; Lőrincz, A.; Nagy, Sz.L. Szőlőtermesztés. *Budapest Mezőgazda Kiadó*, **1999**.
- Biczak, R.; Telesinskj, A.; Pawlowska, B. Oxidative stress in spring barley and common radish exposed to quaternary ammonium salts with hexafluorophosphate anion. *Plant Physiol Bioch.* **2016**, *107*, 248-256.
- Bidel, L.P.R.; Chomicki, G.; Bonini, F.; Mondolot, L.; Soulé, J.; Coumans, M.; La Fisca, P.; Baissac, Y.; Petit, V.; Loiseau, A.; Cerovic, Z.G.; Gould, K.S.; Jay-Allemand, C. Dynamics of flavonol accumulation in leaf tissues under different UV-B regimes in *Centelle asiatica* (Apiaceae). *Planta.* **2015**, *242*, 545-559.
- Bland, J.M.; Altman, D.G. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* **1986**, *1*, 307-310.
- Blois, S.M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* **1958**, *181*, 1199-1200.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Method Enzymol.* **1990**, *186*, 343-355.
- Brown, J.E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: Implications for their antioxidant properties. *J Biochem.* **1998**, *330*, 1173-1178.
- Burda, S.; Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* **2001**, *49*, 2774-2779.
- Calderón-Moontano, J.M.; Burgos-Morón, E.; Pérez-Guerrero, C.; López-Lazaro, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Med Chem.* **2011**, *11*, 298-344.

- Castillo-Munoz, N.; Gomez-Alonso, S.; Garcia-Romero, E.; Hermosin-Gutierrez, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J Agr Food Chem.* **2007**, *35*, 992-1002.
- Chacón, J.L.; García, E.; Martínez, J.; Romero, R.; Gómez, S. Impact of the vine water status on the berry and seed phenolic composition of 'Merlot' (*Vitis vinifera* L.) cultivated in a warm climate: Consequence for the style of wine. *Vitis.* **2009**, *48*, 7-9.
- Chalker-Scott, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol.* **1999**, *70*, 1-9.
- Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **1979**, *59*, 527-605.
- Chang, C.C.; Yang, M.H.; Wen, H.M.; Chern, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* **2002**, *10*, 178-182.
- Cheeseman, J.M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *J Exp Bot.* **2006**, *57*, 2435-2444.
- Clarke, G.; Ting, N.K.; Wiart, C.; Fry, J. High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. *Antioxid.* **2013**, *2*, 1-10.
- Clifford, M. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agr.* **2000**, *80*, 1033-1043.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* **2009**, *26*, 1001-1043.
- Czégény, Gy.; Máta, A.; Hideg, É. UV-B effects on leaves – oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Sci.* **2016**, *248*, 57-63.
- Csepregi, K.; Kocsis, M.; Hideg, É. On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biol Hung.* **2013**, *64*, 509-518.
- Csepregi, K.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Hideg, É. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules.* **2016**, *21*, 208.
- Csepregi, K.; Hideg, É. A novel procedure to assess the non-enzymatic hydrogen-peroxide antioxidant capacity of metabolites with high UV absorption. *Acta Biol Hung.* **2016**, *67*, 447-450.

- Dani, C.; Oliboni, L.S.; Agostini, F.; Funchal, C.; Serafini, L.; Henriques, J.A.; Salvador, M. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol in Vitro*. **2010**, 24, 148-153.
- Das, S.; Mitra, I.; Batuta, S.; Alam, N.; Roy, K.; Begum, A.N. Design, synthesis and exploring the quantitative structure-activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. **2014**, 24, 5050-5054.
- DeGraft-Johnson, J.; Kolodziejczyk, K.; Krol, M.; Nowak, P.; Krol, B.; Nowak, D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: Implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **2007**, 100, 345-352.
- Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. **2013**, 18, 1818-1892.
- Devi, P.K.; Malar, S.D.; Nabavi, F.S.; Sureda, A.; Xiao, J.; Nabavi, M.S.; Daglia, M. Kaempferol, and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res*. **2015**, 99, 1-10.
- Di Stefano, R.; Cravero, M.C.; Gentilini, N. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico*. **1989**, 25, 83-89.
- Doshi, P.; Adsule, P.; Banerjee, K. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv Kishmish Chorny (Sharad Seedless) during maturation. *Int J Food Sci Technol*. **2006**, 41, 1-9.
- Falovo, C.; Schreiner, M.; Schwarz, D.; Colla, G.; Krumbein, A. Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy Brassica species. *J Agr Food Chem*. **2011**, 59, 4198-4207.
- Fernando, C.D.; Soysa, P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity of plant extracts. *MethodsX*. **2015**, 2, 283-291.
- Firuzi, O.; Lacanna, A.; Petrucci, R.; Marrosu, G.; Saso, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by „ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *BBA Gen Subj*. **2005**, 1721, 174-184.
- Fischer, B.B.; Hideg, É.; Krieger-Liszky, A. Production, detection and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antiox Redox Sign*. **2013**, 18, 2145-2162.

- Folin, O.; Denis, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem.* **1912**, 12, 239-243.
- Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophane determinations proteins. *J Biol Chem.* **1927**, 73, 627-650.
- Formica, J.V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* **1995**, 33, 1061-180.
- Foti, M.C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J Org Chem.* **2004**, 69, 2309-2314.
- Foti, M.C. Use and abuse of the DPPH radical. *J Agric Food Chem.* **2015**, 63, 8765-8776.
- Foyer, C.H.; Halliwell, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in Isocorbic acid metabolism. *Planta.* **1976**, 133, 21-25.
- Foyer, C.H.; Lelandais, M.; Kunert, K.J. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant.* **1994**, 92, 696-717.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. Ascorbate and Glutathione: The heart of the redox hub. *Plant physiol.* **2011**, 155, 2-18.
- Frankel, E.N.; Meyer, A.S. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric.* **2000**, 80, 1925-1941.
- Fridovich, I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Ramb.* **1986**, 58, 61-97.
- Fukumoto, L.R.; Mazza, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* **2000**, 48, 3597-3604.
- Garcia Macias, P.; Ordidge, M.; Vysini, E.; Waroonphan, S.; Battey, N.H.; Gordon, M.H.; Hadley, P.; John, P.; Lovegrove, J.A.; Wagstaffe, A. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (*Lollo Rosso*) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. *J Agr Food Chem.* **2007**, 55, 10168-10172.
- Goupy, P.; Dufour, C.; Loonis, M.; Dangles, O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem.* **2003**, 51, 615-622.
- Grace, S.C.; Logan, B.A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans Roy Soc Lond.* **2000**, 355, 1499-1510.
- Halliwell, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.* **1997**, 55, 44-52.

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*. **2007**.
- Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. The Flavonoids. *London: Chapman and Hall*. **1975**.
- Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. **2002**, 96, 67-202.
- Hegedűs, A.; Stefanovitsné, B.É. Természetes antioxidáns-forrásunk: A gyümölcs. *Debreceni Egyetem, AGTC, Kertészettudományi Intézet*. **2012**.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. **2002**, 13, 572-584.
- Hernández, I.; Alegre, L.; Van Breusegem, F.; Munné-Bosch, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci*. **2009**, 14, 125-132.
- Herrmann, K.J. Flavonols and flavones in food plants: A review. *J Food Technol*. **1976**, 11, 433-448.
- Hideg, É.; Marcel, A.K.J.; Strid, A. UV-B exposure, ROS and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci*. **2013**, 18, 107-115.
- Hofmann, R.W.; Swinny, E.E.; Bloor, S.J.; Markham, K.R.; Ryan, K.G.; Campbell, B.D.; Jordan, B.R.; Fountain, D.W. Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: Differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Ann Bot*. **2000**, 86, 527-537.
- Hollman, P.C.H.; Arts, I.C.W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agr*. **2000**, 80, 1081-1093.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L.; Ronald, L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. **2005**, 53, 1841-1856.
- Iacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P.; Sebastiani, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J Food Compos Anal*. **2008**, 21, 589-598.
- Irakli, M.; Katsantonis, D.; Kleisirais, F. Evaluation of quality attributes, nutraceutical components and antioxidant potential of wheat bread substituted with rice bran. *J Cereal Sci*. **2015**, 65, 74-80.
- Ivanova, V.; Stefova, M.; Chinnici, F. Determination of the polyphenol contents in Macedon grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J Serb Chem Soc*. **2010**, 75, 45-59.
- Jaakola, L.; Määttä-Riihinen, K.; Kärenlampi, S.; Hohtola, A. Activation of flavonoid

- biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*. **2004**, 218, 721-728.
- Jansen, M.A.K.; van den Noort, R.E.; Tan, M.Y.; Prinsen, E.; Lagrimini, L.M.; Thorneley, R.N. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol*. **2001**, 126, 1012-1023.
- Jenkins, G.I. Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol*. **2009**, 60, 407-431.
- Jones, G.W.; Davies, R.E. Climate influences on grapevine phenology, grape composition and wine production and quality for Bordeaux, France. *Am J Enol Vitis*. **2000**, 51, 249-261.
- Junglee, S.; Urban, L.; Sallanon, H.; Lopez-Lauri, F. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *Am J Anal Chem*. **2014**, 5, 730-736.
- Kähkönen, M.P.; Hopia, I.A.; Vuorela, J.H.; Rauha, J.P.; Pihlaja, K.; Kujala, S.T.; Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. **1999**, 47, 3954-3962.
- Karakaya, S.; Nehir, S. Quercetin, Luteolin, Apigenin and Kaempferol contents of some foods. *Food Chem*. **1999**, 66, 289-292.
- Katalinic, V.; Generalic, I.; Skroza, D.; Ljubenkovic, I.; Teskera, A.; Konta, I.; Boban, M. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croat J Food Sci Technol*. **2009**, 1, 7-15.
- Kenny, G.J.; Harrison, P.A. The effects of climate variability and change on grape suitability in Europe. *J Wine Res*. **1992**, 3, 163-183.
- Keser, S.; Celik, S.; Turkoglu, S.; Yilmaz, Ö.; Turkoglu, I. Hydrogen peroxide radical scavenging and total antioxidant activity of hawthorn. *Chem J*. **2012**, 2, 9-12.
- Kosar, M.; Küpeli, E.; Malyer, H.; Uylaser, V.; Türkben, C.; Baser, K.H. Effect of brining on biological activity of leaves of *Vitis vinifera* L. (cv. Sultani Cekirdeksiz) from Turkey. *J Agr. Food Chem*. **2007**, 55, 4596-4603.
- Kotilainen, T.; Tegelberg, R.; Julkunen-Tiitto, R.; Lindfors, A.; Aphalo, P.J. Metabolic specific effects of solar UV-A and UV-B on alder and birch leaf phenolics. *Glob Chang Biol*. **2008**, 14, 1-11.
- Krinsky, N.I.; Yeum, K.J.; Carotenoid-radical interactions. *Biochem Biophys Res Co*. **2003**, 305, 754-760.

- Król, A.; Amarowicz, R.; Weidner, S. The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *J Plant Physiol.* **2015**, *189*, 97-104.
- Láng, F. Növényélettan, a növényi anyagcsere. *ELTE Eötvös Kiadó.* **2007**.
- Larson, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* **1988**, *27*, 969-978.
- Lee, K.Y.; Alexander, D.; Wulff, J.; Olsen, J.E. Changes in metabolite profiles in Norway spruce shoot tips during short-day induced winter bud development and long-day induced bud flush. *Metabolomics.* **2014**, *10*, 842-858.
- Leifert, W.R.; Abeywardena, M.Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res.* **2008**, *28*, 729-737.
- Liu, L.; Gitz, D.Z.; McClure, J.W. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Plant Physiol.* **1995**, *93*, 725-733.
- Lotito, S.B.; Frei, B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J Biol Chem.* **2006**, *281*, 37102-37110.
- Majer, P.; Neugart, S.; Krumbein, A.; Schreiner, M.; Hideg, É. Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environ Exp Bot.* **2014**, *100*, 1-9.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
- Marghitas, L.A.; Dezmirean, D.; Laslo, L.; Moise, A.; Popescu, O.; Maghear, O. Validated method for estimation of total flavonoids in Romanian propolis. *Bulletin USAMV-CN.* **2007**, 63-64.
- Martínez-Lüscher, J.; Morales, F.; Delrot, S.; Sánchez-Díaz, M.; Gomés, E.; Aguirreolea, J.; Pascual, I. Short- and long-term physiological responses of grapevine leaves to UV-B radiation. *Plant Sci.* **2013**, *213*, 114-122.
- Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B.; Ewert, B. Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet franc, Merlot and Pinot noir wines from British Columbia. *J Agric Food Chem.* **1999**, *47*, 4009-4017.
- Mhamdi, A.; Noctor, G.; Baker, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Arch Biochem Biophys.* **2012**, *525*, 181-194.
- Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud.* **2006**, *15*, 523-530.

- Middleton, E.J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol.* **1998**, 439, 175-182.
- Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* **2002**, 36, 1199-1208.
- Mittova, V.; Tal, M.; Volokita, M.; Guy, M. Upregulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative system in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species, *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environ.* **2003**, 26, 845-856.
- Moller, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Phys.* **2001**, 52, 561-591.
- Monagas, M.; Hernández-Ledesma, B.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *J Agr Food Chem.* **2006**, 54, 319-327.
- Montoro, P.; Braca, A.; Pizza, C.; De Tommasi, N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem.* **2005**, 92, 349-355.
- Morales, L.O.; Tegelberg, R.; Brosché, M.; Keinänen, M.; Lindfors, A.; Aphalo, P.J. Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiol.* **2010**, 30, 923-934.
- Morales, J.; Günther, G.; Zanoocco, A.L.; Lemp, E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical-experimental study. *Plos One.* **2012**, 7, e40548.
- Mukai, K.; Nagai, S.; Ohara, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by tea catechins in ethanol solution. *Free Radical Biol Med.* **2005**, 39, 752-761.
- Muselík, J.; García-Alonso, M.; Martín-López, M.P.; Žemlička, M.; Rivas-Gonzalo, J.C. Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins. *Int J Mol Sci.* **2007**, 8, 797-809.
- Müller-Xing, R.; Xing, Q.; Goodrich, J. Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. *Front Plant Sci.* **2014**, 5, 474.
- Nagy, M.; Grancai, D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie.* **1996**, 51, 100-101.

- Nanjo, F.; Goto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M.; Hara, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med.* **1996**, 21, 895-902.
- Neill, S.J.; Desikan, R.; Clarke, A.; Hurst, R.; Hancock, J. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot.* **2002**, 53, 1237-1247.
- Nenadis, N.; Lazaridou, O.; Tsimidou, M.Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *J Agric Food Chem.* **2007**, 55, 5452-5460.
- Neugart, S.; Klaring, H.P.; Zietz, M.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Kroh, L.W.; Krumbein, A. The effect of temperature and radiation on flavonol aglycones and flavonol glycosides of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* **2012**, 133, 1456-1465.
- Neugart, S.; Fiol, M.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Zrenner, R.; Kroh, L.W.; Krumbein, A. Low and moderate photosynthetically active radiation affects the flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) dependent on two low temperatures. *Plant Physiol Biochem.* **2013**, 72, 161-168.
- Nikolovska-Coleska, Z.; Dorevski, K.; Klisarova, L.; Suturkova-Milosevic, L. Identification of phenolic constituents isolated from Macedonian propolis. *B Chem Techn Mac.* **1994**, 14, 13-17.
- Noctor, G.; Foyer, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **1998**, 49, 249-279.
- Olszewszka, M. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species. *J Pharm Biomed.* **2008**, 48, 629-635.
- Özyürek, M.; Bektasoglu, B.; Güclü, K.; Güngör, N.; Apak, R. A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology. *J Food Compost Anal.* **2010**, 23, 689-698.
- Pannala, A.S.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J.; Rice-Evans, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**, 282, 1161-1168.
- Passing, H.; Bablok, W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem.* **1983**, 21, 709-720.
- Pérez-Ilzarbe, F.J.; Martínez, V.; Hernández, T.; Estrella, I. Liquid chromatographic determination of apple pulp procyanidins. *J Liq Chromatogr.* **1992**, 15, 637-646.

- Pérez, F.J.; Villegas, D.; Mejia, N. Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ on grapevine leaves. *Phytochem.* **2002**, 60, 573-580.
- Pietta, P.G.; Mauri, P.L.; Simonetti, P.; Testolin, G.; Fresenius, J. HPLC and MEKC determination of major flavonoids in selected food pools. *Anal Chem.* **1995**, 352, 788-792.
- Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* **2000**, 63, 1035-1042.
- Poudel, P.R.; Tamura, H.; Kataoka, I.; Mochioka, R. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *J Food Comp Anal.* **2008**, 21, 622-625.
- Prieto, M.A.; Curran, T.P.; Gowen, A.; Vázquez, J.A. An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in single electron transfer antioxidant assays. *Food Res Int.* **2015**, 67, 284-298.
- Promkatkaew, M.; Suramitr, S.; Karpkird, T.; Wanichwecharungruang, S.; Ehara, M.; Hannongbua, S. Potophysical properties and photochemistry of substituted cinnamates and cinnamic acids for UVB blocking: effect of hydroxy, nitro and fluoro substitutions at ortho, meta and para positions. *Photochem Photobiol Sci.* **2014**, 13, 583-594.
- Razzaghi-Asl, N.; Garrido, J.; Khazraei, H.; Borges, F.; Firuzi, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: A review of structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* **2013**, 20, 4436-4450.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* **1999**, 26, 1231-1237.
- Reifenrath, K.; Müller, C. Species-specific and leaf-age dependent effects of ultraviolet radiation on two Brassicaceae. *Phytochem.* **2007**, 68, 875-885.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Broumley, P.M.; Pridham, J.B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* **1995**, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* **1996**, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C.; Miller, N.J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, 2, 152-159.
- Robak, J.; Gryglewski, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* **1988**, 37, 837-841.

- Rocco, A.; Fanali, C.; Dugo, L.; Mondello, L. A nano-LC/UV method for the analysis of principal phenolic compounds in commercial citrus juices and evaluation of antioxidant potential. *Electrophoresis*. **2014**, 35, 1701-1708.
- Rosalie, R.; Joas, J.; Deytieux-Belleau, C.H.; Vulcain, E.; Payet, B.; Dufossé, L.; Léchaudel, M. Antioxidant and enzymatic responses to oxidative stress induced by pre-harvest water supply reduction and ripening on mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Cogshall') in relation to carotenoid content. *J Plant Physiol*. **2015**, 184, 68-78.
- Ryan, K.G.; Markham, K.R.; Bloor, S.J.; Bradley, J.M.; Mitchell, K.A.; Jordan, B.R. UV-B radiation induced increase in quercetin:kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of petunia. *Photochem Photobiol*. **1998**, 68, 323-330.
- Samra, M.A.; Chedea, V.S.; Economou, A.; Calokerinos, A.; Kefalas, P. Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. *Food Chem*. **2011**, 125, 622-629.
- Sanchez-Rodríguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M.A.; Cervilla, L.M.; Blasco, B.; Rios, J.J.; Rosales, M.A.; Romero, L.; Ruiz, J.M. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Sci*. **2010**, 178, 30-40.
- Saunders, J.A.; McClure, J.W. The distribution of flavonoids in chloroplasts of twenty-five species of vascular plants. *Phytochem*. **1976**, 15, 809-811.
- Schützendübel, A.; Polle, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. **2002**, 53, 1351-1356.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. **1965**, 161, 144-158.
- Singleton, V.L. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. *Advan Chem Ser*. **1974**, 137, 184-211.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. **1999**, 299, 152-178.
- Sisa, M.; Bonnet, S.L.; Ferreira, D.; Van der Westhuizen, J.H. Photochemistry of flavonoids. *Molecules*. **2010**, 15, 5195-5245.
- Smirnoff, N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos Trans Roy Soc*. **2000**, 355, 1455-1464.
- Smirnoff, N. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. *Blackwell Publishing*. **2007**.

- Sultana, B.; Anwar, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.* **2008**, 108, 879-884.
- Szöllősi, R.; Szöllősi-Varga, I. Total antioxidant power in some species of *Labiatae* adaptation of FRAP. *Acta Biol Szeg.* **2002**, 46, 125-127.
- Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem.* **1986**, 25, 383-385.
- Tournaire, C.; Croux, S.; Maurette, M.T.; Beck, I.; Hocquaux, M.; Braun, A.M.; Oliveros, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. *J Photochem Photobiol B.* **1993**, 19, 205-215.
- Treutter, D. Chemical-reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylamino-cinnamaldehyde. *J Chromatogr.* **1989**, 467, 185-193.
- Van Acker, S.A.; Van Den Berg, D.J.; Tromp, M.N.; Griffioen, D.H.; Van Bennekom, W.P.; Van der Vijgh, W.J.; Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol Med.* **1996**, 20, 331-342.
- Van Doorn, W.G.; Ketsa, S. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. *Postharvest Biol Tec.* **2014**, 95, 64-69.
- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem.* **1998**, 46, 4113-4117.
- Wallace, G.; Fry, S. Phenolic components of the plant cell wall. *Int Rev Cytol.* **1994**, 113, 229-268.
- Williams, R.J.; Spencer, J.P.E.; Rice-Evans, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* **2004**, 36, 838-849.
- Winter, T.R.; Rostás, M. Ambient ultraviolet radiation induces protective responses in soybean but does not attenuate indirect defense. *Environ Pollut.* **2008**, 155, 290-297.
- Wollenweber, E.; Dietz, V.H. Occurrence and distribution of three flavonoid aglycones in plants. *Phytochem.* **1981**, 20, 869-932.
- Zhang, X.F.; Li, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *J Lumin.* **2011**, 131, 2263-2266.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **1999**, 64, 555-559.

10. Publikációs lista

10.1 A dolgozat alapjául szolgáló tudományos közlemények

10.1.1 Referált folyóiratban megjelent közlemények

Csepregi, K.; Kocsis, M.; Hideg, É. On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biol Hung.* 2013, 64, 509-518. (IF=0.563)

Csepregi, K.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Hideg, É. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols. *Molecules.* 2016, 21, 208. (IF=2.416)
(a közlemény 16 oldalas, a folyóirat közlemény azonosítót használ oldalszámok helyett)

Csepregi, K.; Hideg, É. A novel procedure to assess the non-enzymatic hydrogen-peroxide antioxidant capacity of metabolites with high UV absorption. *Acta Biol Hung.* 2016, 67. 447-450. (IF=0.605)

10.1.2 Elbírálás alatt álló közlemények

Csepregi, K.; Hideg, É. Potential of flavonoids in leaf protection from stress by sunlight
(elbírálás alatt)

Castagna, A.; **Csepregi, K.;** Neugart, S.; Vecerová, K.; Zipoli, G.; Jakab, G.; Jug, T.; Llorens, L.; Martínez-Abaigar, J.; Martínez-Lüscher, J.; Núñez-Olivera, E.; Ranieri, A.; Schödl-Hummel, K.; Schreiner, M.; Teszlák, P.; Tittmann, S.; Urban, O.; Verdaguer, D.; Jansen, M.A.K.; Hideg, É. Environmental plasticity of Pinot noir grapevine leaves; a trans-European study of morphological and biochemical change along a 1500 km latitudinal climatic gradient.
(elbírálás alatt)

10.1.3 Konferencia közlemények

Csepregi, K.; Kocsis, M.; Hideg, É. A comparative study of photometric assays measuring total phenol and flavonoid content. Application to grapevine leaf studies, COST Action FA0906, 2nd Annual Network Meeting in Mikulov, Czech Republic 14-16 April, 2013
ISBN 978-80-904351-7-9

Csepregi, K.; Kocsis, M.; Hideg, É. Grapevine leaf phenolic compounds in various roles, 9th János Szentágothai Interdisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Hungary, 3-4 May, 2013
ISBN 978-963-642-519-7

Csepregi, K.; Czégény, Gy.; Hideg, É. Changes in grapevine leaf phenolics and antioxidants in response to a decrease in solar UV – in situ experiments with UV filters in the vineyard, COST Action FA0906, Final Network Meeting, Bled, Slovenia, 30 March – 2 April, 2014
ISBN 978-961-6822-18-3

Csepregi, K.; Czégény, Gy.; Kocsis, M.; Hideg, É. Flavonoids in plant leaves: first-aid and versatile tool kit, 1st Innovation in Science 2014 – Doctoral Student Conference, Szeged, Hungary, 2-3 May 2014
ISBN 978-963-9970-52-6

Csepregi, K.; Neugart, S.; Czégény, Gy.; Kocsis, M.; Jakab, G.; Hideg, É. In vivo and in vitro research of flavonoids in grapevine leaves, A Magyar Növénybiológiai Társaság XI. Kongresszusa, Szeged, Hungary, 27-29 August, 2014

Csepregi, K.; Hideg, É. Plant leaf polyphenols as antioxidants-versatilities of photometric total antioxidant capacity assays in plant physiology, 9th World Congress on Polyphenols Applications, St Julian's, Malta, 3-5 June, 2015
ISBN 978-2-35609-073-7

Csepregi, K.; Kőrösi, L.; Hideg, É.; Jakab, G. The role of various leaf polyphenol groups in sunlight acclimation of grapevine, 1th Network Meeting of UV4Plants, Pécs, Hungary, 30-31 May, 2016
ISBN 978-963-429-048-3

Csepregi, K.; Hideg, É. ROS specific and general antioxidant capacities of grapevine leaf phenolics, 10th World Congress on Polyphenols Applications, Porto, Portugal, 29 June - 1 July, 2016

10.2 Egyéb, a dolgozatban fel nem használt közlemények

Kocsis, M.; Abrankó, L.; Ayaydin, F.; **Csepregi, K.;** Papp, N.; Teszlák, P.; Jakab, G. Main leaf polyphenolic components of berry color variant grapevines and their acclimative responses to sunlight exposure. *Appl Sci.* 2015, 5, 1955-1969. (IF=1.726)

Del-Castillo-Alonso, M.; Castagna, A.; **Csepregi, K.;** Hideg, É.; Jakab, G.; Jansen, M.A.K.; Jug, T.; Llorens, L.; Mátai, A.; Martínez-Lüscher, J.; Monforte, L.; Neugart, S.; Olejnickova, J.; Ranieri, A.; Schödl-Hummel, K.; Schreiner, M.; Soriano, G.; Teszlák, P.; Tittmann, S.; Urban, O.; Verdaguer, D.; Zipoli, G.; Martínez-Abaigar, J.; Núñez-Olivera, E. Environmental factors correlated with the metabolite profile of *Vitis vinifera* cv. Pinot noir berry skins along European latitudinal gradient. *J Agric Food Chem.* 2016, 64, 8722-8734. (IF=2.857)

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni Dr. Hideg Éva témavezetőmnek, aki türelmével, magas színvonalú szakértelmével és hasznos tanácsaival hatalmas segítséget nyújtott a dolgozatom megírásában, valamint nélkülözhetetlen szerepet játszott a tudomány világának megismerésében.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Jakab Gábornak és Dr. Kocsis Mariannának dolgozatom precíz áttekintéséért és az építő jellegű kritikákért, valamint a rengeteg segítségért és támogatásért, amit tőlük kaptam.

Külön köszönettel tartozom PhD társamnak Czégény Gyulának, aki számos felejthetetlen pillanattal ajándékozott meg az évek során az együtt töltött konferenciák és labormunkák során.

Köszönöm a Növénybiológiai tanszék minden kollégájának, dolgozatom elkészülésében nyújtott valamennyi segítségért.

A levélminták kiválasztásában nyújtott segítségükért köszönettel tartozom Dr. Teszlák Péternek, Gaál Krisztiánnak és a PTE Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet munkatársainak.

A COST UV4growth nemzetközi együttműködésnek köszönhetően számos, a kutatási témában kiemelkedő kutatóval találkozhattam, köztük Dr. Monika Schreinerrel és Dr. Susanne Neugarttal, akik lehetőséget biztosítottak számomra a levélminták HPLC-MS analízisére.

A nappali tagozatos PhD képzésem utáni kutatómunkámat az OTKA K101430 és K112309 pályázatok támogatták, melyek lehetővé tették, hogy befelyezhessem dolgozatomat.

Köszönettel tartozom Édesanyámnak, Mamámnak és Testvéremnek, akik nélkül nem lennék az, aki most vagyok. Köszönöm nekik azt a sok szeretetet, támogatást és türelmet (néhol türelmetlenséget), melyek mind hozzásegítettek céloom eléréséhez.

Szeretném megköszönni Feleségemnek azt a végtelen kitartást, mellyel mindvégig mellettem állt és biztatott a PhD éveim alatt.

Végül, de nem utolsó sorban példaképemnek, Édesapámnak tartozom óriási köszönettel, amiért mindig vigyáz rám és erőt ad, hogy elérhessem az álmaimat!

Függelék - Az értekezésben bemutatott TAC módszerek felcserélhetőségének vizsgálata

Az értekezés 6.2 fejezetében megállapítottuk, hogy a teljes antioxidáns kapacitás (TAC) vizsgálatára alkalmazható négyféle módszer eredményei hasonlóak, de nem teljesen redundánsak. Az eredményeik összehasonlítása alapján vontuk le azt a következtetést, hogy a módszerek nem felcserélhetőek. Ezt kiegészítendő, klinikai diagnosztikában laboratóriumi eljárások összehasonlítására alkalmazott Bland-Altman és Passing-Bablok vizsgálatokat is elvégeztük. Ezek eredményei megerősítik következtetésünket: a négyféle TAC módszer nem felcserélhető. A vizsgálatok részleteit az alábbiakban mutatom be.

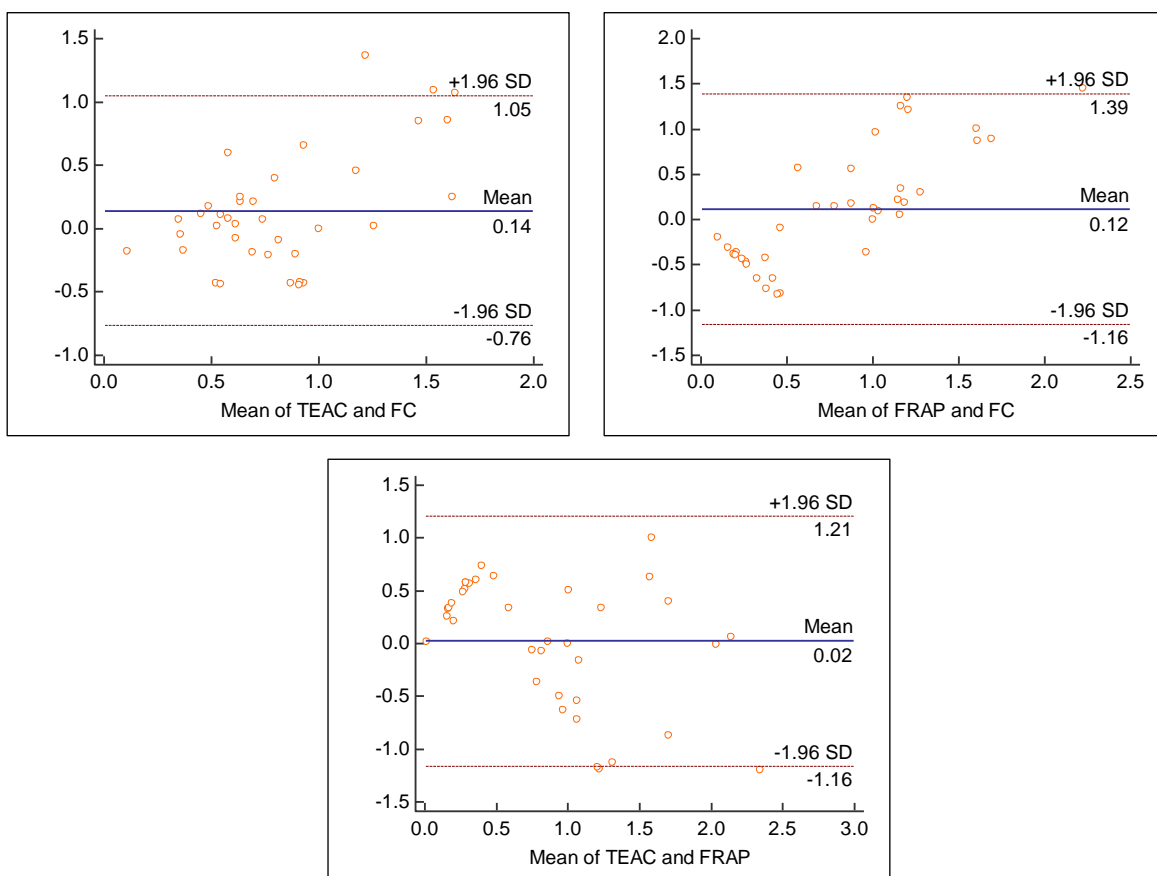
A Bland-Altman eljárás $p < 0.05$ értékei alapján egyenértékűek lehetnek a TEAC-FRAP, TEAC-FC és FRAP-FC eljárás párok (F1. táblázat). A Bland-Altman grafikonok azonban az utóbbi két esetben egyértelműen szisztematikus, értékfüggő eltérést mutatnak. A TEAC-FRAP pár esetében a vizuális eredmény nem egyértelmű (F1. ábra). Ebben az esetben van legközelebb a bias érték az ideális 0-hoz. A Passing-Bablok teszt azonban nem erősíti meg a kapcsolatot, az ezzel az eljárással illesztett egyenes meredeksége illetve tengelymetszete is jelentősen eltért 1-től, illetve 0-tól (F2. táblázat).

A Bland-Altman teszt szerint potenciálisan egyenértékű TEAC-FC és FRAP-FC eljárás párok közül a Passing-Bablok teszt csak az előbbi esetben azonosított kapcsolatot, azonban bár a tengelymetszet konfidencia intervalluma tartalmazza a 0-t, a meredekség jelentősen eltér 1-től, tehát a kapcsolat torzított. Ugyanez a helyzet a FRAP-DPPH pár esetében, itt azonban a Bland-Altman teszt alacsony p értéke (0.0001) miatt kell elvetnünk a felcserélhetőséget.

F1. táblázat: A Bland-Altman teszt eredményei $n=37$ vegyület adatai alapján.

TAC módszerek	Az értékek különbségeinek átlaga (bias)	A bias 95% konfidencia intervallum határai	p (H_0 : bias=0)
TEAC-FRAP	0.0248	-0.1771 és 0.2266	0.8049
TEAC-DPPH	0.3136	0.1649 és 0.4622	0.0001
TEAC-FC	0.1415	-0.01258 és 0.2957	0.0707
FRAP-DPPH	0.2888	0.1545 és 0.4231	0.0001
FRAP-FC	0.1168	-0.1005 és 0.3340	0.2829
DPPH-FC	-0.1720	-0.3006 és -0.04350	0.0101

Félkövér betűk jelzik azokat a módszer párokat, melyek a teszt $p > 0.05$ eredménye szerint felcserélhetőek lehetnek.



F1. ábra: A Bland-Altman ábrák a tesztben $p > 0.05$ értékekkel jellemzett (F1. táblázat) TAC módszer párok adatainak alapján.

F2. táblázat: A Passing-Bablok teszt eredményei $n=37$ vegyület adatai alapján.

TAC módszerek	Tengelymetszet	A tengelymetszet 95% konfidencia intervalluma	Merekség	A merekség 95% konfidencia intervalluma	Linearitás p (H_0 : illeszhető egyenes)
TEAC-FRAP	-0.508	-1.297 és -0.222	1.517	1.022 és 2.465	0.25
TEAC-DPPH	-0.322	-0.721 és -0.203	0.988	0.760 és 1.474	0.74
TEAC-FC	0.187	-0.069 és 0.342	0.590	0.396 és 0.996	0.46
FRAP-DPPH	0.011	-0.008 és 0.023	0.6669	0.511 és 0.774	0.57
FRAP-FC	0.446	0.380 és 0.546	0.3648	0.248 és 0.503	0.46
DPPH-FC	0.401	0.291 és 0.519	0.584	0.412 és 0.786	0.74

A linearitást validáló Cusum teszt $p > 0.05$ eredménye szerint valamennyi esetben alkalmazható a Passing-Bablok egyenes illesztése. A Passing-Bablok teszt szerint felcserélhetőek tekinthetők azok a módszer párok, melyekre egyszerre igaz, hogy a tengelymetszet konfidencia intervalluma tartalmazza a 0 értéket és a merekség konfidencia intervalluma az 1-et. Az ezt a feltételt részben teljesítő eseteket félkövér betűk jelzik.

Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott

Név: Csepregi Kristóf

Születési név: Csepregi Kristóf

Anyja neve: Zoltán Mária

Születési hely, idő: Nagykanizsa, 1988.01.28

Levelek alkalmazkodása a napfényhez – polifenolos vegyületek lehetséges szerepei című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskolának

Témavezető neve: Dr. Hideg Éva

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolában (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két even belül nem utasították el
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom
- öt even belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljesek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: Pécs, 2017.02.14.

doktorjelölt aláírása