



Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

NÖVÉNYOLAJOK JELLEMZÉSE TRIGLICERID ÖSSZETÉTELÜK ALAPJÁN HPLC/APCI-MS ÉS MALDI-TOFMS ANALITIKAI MÓDSZEREKKEL

Jakab Annamária

Témavezető:
Forgács Eszter

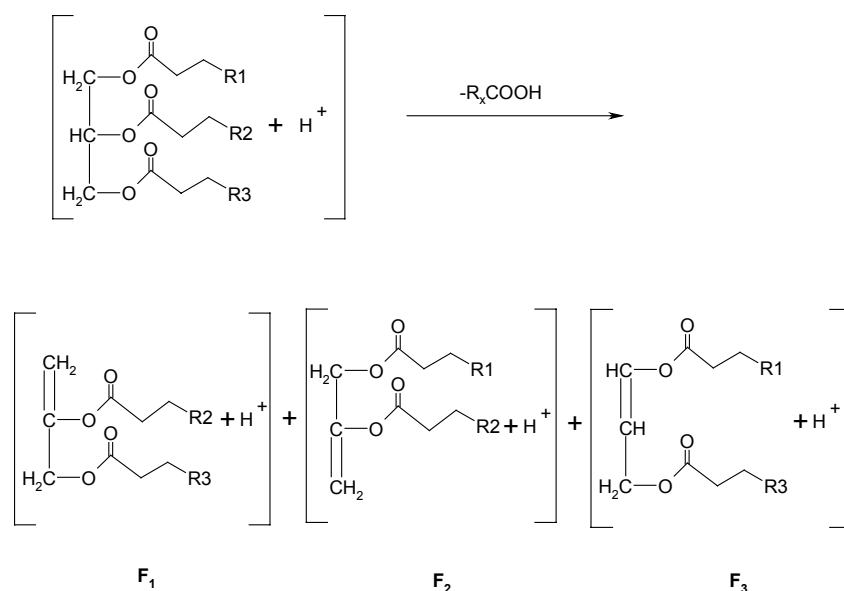


MTA Kémiai Kutatóközpont,
Anyag- és Környezetkémiai Kutatólaboratórium
&
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Fizikai Kémia Tanszék

2003.

I. ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK

A különböző növényolajok jelentős szerepet töltenek be táplálkozásunkban. Ez elsősorban a bennük, triglicerid formában jelen levő biológiailag értékes zsírsavaknak (pl. esszenciális zsírsavak) és egyéb minor komponenseknek köszönhető. Annak ellenére, hogy szerepük meghatározó jelentőségű a táplálkozásban (és egyéb tudományos területeken) beható kémiai analízisük mégis hiányos. A növényolajok nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometriás (HPLC/MS) vizsgálata kis mértékben növekedett, amikor lehetővé vált a helyzeti izomerek megkülönböztetése ún. atmoszférikus nyomású kémiai ionizációval (APCI, atmospheric pressure chemical ionization). Az APCI forrásban történő fragmentáció esetében a triglicerid molekulából zsírsav eliminálódik (1. Ábra). A zsírsav elvesztés különböző valószínűséggel következik be a zsírsav pozíciójától függően, ezzel lehetővé téve a különböző helyzeti izomerek megkülönböztetését.



1. Ábra. Trigliceridek fő APCI fragmentációs mechanizmusa (A bemutatott ábra lehetséges ion szerkezetet mutat, de nem feltétlenül felel meg a valóságnak).

A doktori munkámban célul tűztem ki különböző növényolajok összehasonlító vizsgálatát tömegspektrometriás módszerekkel mért triglicerid profiljuk alapján. Az alkalmazott tömegspektrometriás módszerek a HPLC/APCI-MS és a mátrixszal segített lézer deszorpció ionizációs repülési idő analizátor tömegspektrometria (MALDI-TOFMS, matrix assisted laser desorption-time-of-flight mass spectrometry) analitikai módszerek voltak. Az összehasonlító vizsgálat során a triglicerid profilt kemometriai módszerrel értékeltem ki.

II. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS BERENDEZÉSEK

A különböző növényolajok triglicerid profilját a fent említett kétféle analitikai módszerrel **HPLC/APCI-MS**-el és **MALDI-TOFMS**-el vizsgáltam. A HPLC/APCI-MS méréseket Shimadzu gyártmányú QP2010-es tömegspektrométerhez kapcsolt HPLC rendszerrel, a MALDI-TOFMS méréseket Bruker gyártmányú BIFLEX tömegspektrométerrel végeztem. A kapott triglicerid profil **lineáris diszkriminancia analízissel** (LDA) történő kiértékeléséhez STATISTICA programot használtam fel. A HPLC/APCI-MS módszernél kétféle fordított fázisú kromatográfiás oszlopot alkalmaztam; (i) **hagyományos töltött** (Purospher, RP-18e, 125x4 mm, 5 µm, Merck) és **monolit** (SilicaROD, RP-18e, 50x4,6 mm, Merck) **oszlopot**.

Két linolsavat és egy olajsavat tartalmazó **helyzeti izomer trigliceridek** (LOL és LLO) egymáshoz viszonyított mennyiségét a különböző olajokban **HPLC/APCI-MS** módszerrel **kiválasztott ion üzemmódban** (Selected Ion Monitoring, SIM) mértem. A méréshez szükséges helyzeti izomer standardok szerkezetének különbözőségét mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) méréssel is igazoltam.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- III.1. Két új módszert dolgoztam ki különböző fajta növényolajok jellemzésére azok triglicerid profilja alapján. A módszerekhez HPLC/APCI-MS ill. MALDI-TOFMS készülékekkel mért triglicerid profilt lineáris diszkriminancia analízissel értékeltem ki.
- III.2. A HPLC/APCI-MS módszerrel mért triglicerid profil a statisztikai elemzéssel kombinálva alkalmas volt 14 különböző fajta növényolaj csoport (avokádó, búzacsíra, dió, földimogyoró, kukoricacsíra, lenmag, mandula, mustármag, napraforgó, olíva, szezám, szója, szőlőmag, tökmag) elkülönítésére. Az LDA számítás 68 különböző olajminta (93,2%) helyes osztályozását eredményezte, ami 9 különböző fajta növényolaj csoport (avokádó, lenmag, mandula, mustármag, olíva, szezám, szója, szőlőmag, tökmag) helyes csoportosításának felelt meg.
- III.3. MALDI-TOFMS módszerrel mért triglicerid profil a statisztikai elemzéssel kombinálva szintén alkalmas volt a 14 különböző fajta növényolaj csoport elkülönítésére. A statisztikai számítás ebben az esetben is 68 különböző olajminta (93,2%) helyes osztályozását tette lehetővé, ami 12 különböző fajta növényolaj csoport (avokádó, dió, földimogyoró, kukoricacsíra, lenmag, mandula, mustármag, napraforgó, olíva, szezám, szója, szőlőmag) helyes csoportosításának felelt meg. Összehasonlítva a két módszert, a MALDI-TOFMS-es módszer hatékonyabbnak bizonyult, ami köszönhető a MALDI tömegspektrometriás mérések jobb ismételtelhetőségének és gyorsabb adatfeldolgozhatóságnak.

- III.4. Növényolajokban található trigliceridek gyors (10 perces), jól ismételtető elválasztását valósítottam meg fordított fázisú szilika monolit oszlopon (SilicaROD, RP-18e, 50x4,6 mm, Merck) acetón-acetonitril gradiens programot alkalmazva. A retenciós idők szórása 0,8% körül volt.
- III.5. A 4. pontban ismertetett HPLC módszer eluensáram-elosztással sikeresen kapcsoltam APCI ionforrással rendelkező tömegspektrométerhez. A beállított kb. 400 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ áramlási sebesség mellett a csúcsterületek szórása 10% köré esett (kis csúcsok esetében 12%, nagy csúcsok esetében 7%).
- III.6. LLO és LOL trigliceridek relatív mennyiségének meghatározásához a kereskedelemben nem kapható LOL standardot szintetizáltam és a két helyzeti izomer szerkezetének a különbözőségét APCI-MS mérés mellett NMR méréssel is igazoltam. A két izomer relatív mennyiségének a meghatározásához kalibrációs görbét vettem fel a diglicerid fragmens ionok intenzitása alapján, amit HPLC/APCI-MS-el SIM üzemmódban mértem. A kalibrációs görbe szoros egyeneshez való illeszkedést mutatott ($r = 0,9942$, $r_{\text{krit}} = 0,6020$). A relatív izomer arányok szórása 2,5% köré esett.
- III.7. Búzacsíra, napraforgó, olíva, szója, szőlőmag és tökmag olajokban HPLC/APCI-MS-el SIM üzemmódban megmértem az LOL és LLO egymáshoz viszonyított relatív mennyiségét, felhasználva a kalibrációs görbét. A vizsgált trigliceridek relatív aránya egy adott fajta, de különböző származási helyű olajokban közel állandónak mutatkozott. Az LOL/LLO arány növekvő sorrendben a következő volt; 0% az olíva (ami megegyezett az irodalomból

ismerttel), $13,9 \pm 4,3\%$ a búzacsíra, $15,9 \pm 2,9\%$ a szója, $16,7 \pm 4,6\%$ a tökmag, $26,8 \pm 3,2\%$ a napraforgó és $44,2 \pm 2,6\%$ a szőlőmag olajban. Az ismertett olajfajtákként állandó LOL/LLO arány rámutat arra, hogy a különböző olajok trigliceridjeiben a linolsav és az olajsav nem véletlenszerűen -nem random eloszlásban-, hanem fajtaspecifikusan helyezkedik el.

IV. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

A disszertációban bemutatott új módszerekkel és a felállított modell segítségével lehetőség nyílt növényolajok gyors analizésére és eredetének vizsgálatára.

A disszertáció 4. fejezetében megállapított dilinoleoil-oleoát izomerek relatív mennyiségének az ismeretében, lehetőség nyílt közvetett úton a különböző helyzeti izomerek emberi anyagcserére gyakorolt hatásának tanulmányozására.

V. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Megjelent angol nyelvű cikkek:

1. A. Jakab, K. Nagy, K. Héberger, K. Vékey, E. Forgács, Differentiation of Vegetable Oils by Mass Spectrometry Combined with Statistical Analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; **16/24**: 2291-2297.
2. A. Jakab, K. Héberger, E. Forgács, Comparative Analysis of Different Plant Oils by High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2002; **976**: 255-263.
3. A. Jakab, E. Forgács, Characterization of Plant Oils on a Monolithic Silica Column by High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Chromatographia*, 2002; **56**: S69-S73.

Megírt kéziratok:

4. A. Jakab, I. Jablonkai, E. Forgács, Quantitation of positional isomer dilinoleoyl-oleoyl-glycerols in Plant oils by Mass Spectrometry.

Angol nyelvű poszterek:

5. A. Jakab, I. Jablonkai, E. Forgács, Quantification of positional isomer triacylglycerols in plant oils, *21th Informal Meeting on Mass Spectrometry* (IMMS 21th), Antwerp, Belgium, 11-15. May 2003.

6. A. Jakab, K. Nagy, K. Vékey, E. Forgács, Analysis of Plant Oil Triacylglycerols by HPLC/APCI-MS and MALDI-TOFMS, *20th Informal Meeting on Mass Spectrometry* (IMMS 20th), Primiero, Italy, 12-16. May 2002.
7. A. Jakab, E. Forgács, Comparative Analysis of Different Plant Oils by HPLC/APCI-MS, *Seventh International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers* (HTC-7) Bruges, Belgium, 6-8. Feb. 2002.
8. A. Jakab, E. Forgács, Characterization of Plant Oils on a Monolithic Silica Column by HPLC/APCI-MS, *Balaton Symposium '01*, Siófok, Hungary, 2-4. Sept. 2001.

Magyar nyelvű poszterek:

9. Jakab A., Nagy K., Héberger K., Vékey K., Forgács E., Növényi olajok csoportosítása lineáris diszkriminancia analízissel tömegspektrometriás adatok alapján, *Chemometrics 2002*, Tata, Szept 29.- Okt. 1., 2002.
10. Jakab A., Forgács E., Növényi olajok természetes antioxidáns tartalmának vizsgálata HPLC/MS-es, *Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Lillafüred, Oct. 16-18., 2002.

Magyar nyelvű előadások:

11. Jakab A., Nagy K., Vékey K., Forgács E., Növényi Olajok Vizsgálata HPLC/APCI-MS és MALDI-TOFMS módszerekkel, *V. Doktori Kémiai Iskola*, Szokolya-Királyrét, 2002. május 21-22.

12. Jakab A., Forgács E., Növényi Olajok HPLC/APCI-MS Vizsgálata, **307. Tudományos Kollokvium**, FVM Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest, 2002. február 22.