



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**BIOAKTÍV PEPTIDEK ANALITIKAI
MEGHATÁROZÁSA**

Rapi Sándor

Doktori értekezés tézisei

Témavezető:

Dr. Fodor Péter

Készült:

Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar

2017

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Vatai Gyula
Egyetemi tanár, DSc
Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Témavezető: Dr. Fodor Péter
Professor emeritus, DSc
Szent István Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

A kis molekulatömegű peptidek egy fontos vegyületcsalád tagjai, melyek gyakran kulcsszerepet játszanak különböző fiziológiás folyamatokban (HARTMANN és MEISEL, 2007). Humán klinikai és élelmiszertudományi területeken egyre jelentősebb alkalmazásuk és ebből adódó kutatásuk, szerepük pontos meghatározása és tisztázása. Számos klinikai és élelmiszertudományi kutatás helyezi központba a kis molekulatömegű peptidek vizsgálatát, így elősegítik a hatásmechanizmusukkal és pontos detektálásukkal kapcsolatos ismeretek bővítését.

A széles spektrumú biológiai hatás ígéretessé teszi a kis molekula tömegű peptid molekulákat funkcionális élelmiszerekben való alkalmazásra, az élelmiszeripari alkalmazás- és biztonság azonban megköveteli a célvegyületek pontos, megbízható és reprodukálható analitikai meghatározását. Sok esetben az élelmiszeripari alkalmazást a peptid származékok kis stabilitása hátráltatja, ebben az esetben a stabilitási problémák kiküszöbölésével funkcionális élelmiszerek adalékaiként is felhasználhatóvá válhatnak.

A kis molekulatömegű peptidek kimutatási módszerei közé sorolhatók kromatográfiás (folyadékromatográfia, géلكromatográfia, méretkizárásos kromatográfia) meghatározási módszerek, tömegspektrometriás módszerek és ezek kombinációi. A modern eljárásokban és meghatározási módszerekben közös, hogy jelentős anyagi beruházást igénylő műszerpark szükséges a kutatott komponensek analitikai meghatározásához. A főként az élelmiszeriparhoz köthető fejlesztő laboratóriumok jelentős

része azonban nem mindig rendelkezik a legmodernebb eszközökkel, ebből adódóan szükséges egy olyan meghatározási metodika, mely megbízhatóan és reprodukálható módon biztosítja vizsgálatukat és meghatározásukat.

A pontos és precíz analitikai módszerek lehetőséget biztosítanak a peptidok koncentrációjának különböző élelmiszerekben történő megbízható meghatározására. A kutatás során a kis molekula tömegű peptidok humánbiológiai területen és az élelmiszeriparban betöltött, vagy betölthető szerepük és tulajdonságaik figyelembe vételével tartottam fontosnak analitikai meghatározásukat és stabilitási tulajdonságaik meghatározását.

2. CÉLKITŰZÉS

A kutatás során öt kis molekula tömegű peptid tulajdonságainak megállapítását, megbízható és érzékeny kromatográfiás meghatározási eljárás körülményeinek kidolgozását, a kiválasztott vegyületek stabilitási problémáinak kiküszöbölését és az élelmiszermatrixban végbemenő hatások feltárását szándékoztam elvégezni az alábbiak szerint.

- A vizsgált vegyületek folyadék kromatográfiás módszer szerinti meghatározása.
- Természetes peptidek stabilitási viszonyainak vizsgálata, esetleges stabilitási problémák kiküszöbölése védőcsoportok alkalmazásával (származékképzéssel), illetve fémkomplexek képzésével.
- Környezeti tényezők hatása a vizsgált komponensek mennyiségére (a környezet hőmérsékletének hatása, adalékanyagok).
- A lehetséges élelmiszermatrixok és eltérő élelmiszerkomponensek peptid stabilitásra gyakorolt hatásának feltárása.
- A kiválasztott peptidek antioxidáns hatásának vizsgálata FRAP módszerrel.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Előkísérletek a szabad peptidok mennyiségi meghatározása céljából

A szabad peptid vegyületek UV-aktivitásának meghatározását 190-400 nm hullámhossz tartományban spektrofotometriás módszerrel végeztem, mely során megállapításra került a peptidok maximális elnyelési hullámhossza. A továbbiakban a szabad peptidok folyadékkromatográfiás meghatározása történt UV/VIS tartományban folyadékkromatográfiás módszer szerint, diódasoros detektor alkalmazásával. A kutatott kis molekula tömegű peptidok gyenge UV/VIS aktivitása miatt az elvégzett kísérletek során diódasoros detektálással párhuzamosan ELS detektálást is alkalmaztam. A fényszóráson alapuló kromatográfiás vizsgálatokat PL-ELS 2100 (USA) detektor alkalmazásával hajtottam végre, majd L-glutathion és γ -glutamil-cisztein folyadékkromatográfiás elválasztásához a peptid vegyületeket fémionok (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+}) oldataival képeztem komplexeket.

3.2. Kis molekula tömegű peptidok folyadékkromatográfiás meghatározása származékképzést követően

A szabad peptidok kromatográfiás vizsgálatait követően származékképzést követő folyadékkromatográfiás meghatározást végeztem el. A tiol funkciós csoportot nem tartalmazó peptidok Danzil-kloriddal történő származékképzését követően UV/VIS diódasoros detektálást,

míg a tiol funkciós csoportot tartalmazó peptidek OPA származékképző alkalmazását követően fluoreszcens detektálási módot alkalmaztam a folyadékkromatográfiai vizsgálatok során.

A módszerfejlesztést követően a vizsgált peptidek mennyiségi meghatározását végeztem el, melynek első lépéseként a peptid vegyületekből kalibrációs oldatokat készítettem, majd a kromatogramokban jelentkező csúcsok terület alapú integrálját határoztam meg. A mennyiségi meghatározáshoz külső kalibrációt alkalmaztam, melyhez 5 pontból álló kalibrációs egyenest illesztettem a terület-koncentráció függvényben, majd meghatároztam a módszerek kimutatási határát.

3.3. Természetes peptidek stabilitásának meghatározása különböző környezeti hatások függvényében

Peptidek standard oldatait vizsgáltam eltérő körülmények között (kémhatás, hőmérséklet hatása, levegő oxigéntartalmának hatása és fény hatása). A mintákból 1000 mg/l koncentrációjú oldatokat készítettem a vizsgálatok elvégzéséhez. A kémhatást három eltérő kémhatású közegben (pH=4, pH=7, pH=10), a hőmérséklet hatását három eltérő hőmérsékleten (-18 °C; +4 °C; +30 °C), a levegő oxigéntartalmának hatását paraffinolajjal elzárt és levegőn tárolt mintákon, míg a fény hatását fényben tárolt és sötétben tárolt mintákon vizsgáltam a korábban alkalmazott kromatográfiai módszerek szerint.

3.4. Természetes peptidek stabilitásának vizsgálata komplexképző fémek alkalmazásával

A komplexképző fémek stabilitási hatásainak vizsgálatához a kutatás során eddig tanulmányozott peptidek közül három vegyület került kiválasztásra. A három peptid (Apm, Gsh, L-kar) standardból 20 mg/l töménységű törzsoldatot készítettem két különböző pH tartományban (pH= 4,8; 7,0), míg szénhidrát mátrix modellezése céljából 1%-os koncentrációjú keményítő (Sigma-Aldrich) oldatot is alkalmaztam. A peptid oldatokat fémvegyületekkel (vas-szulfát, cink-klorid, kalcium-klorid, magnézium-szulfát) (VWR) stabilizáltam, majd meghatároztam a peptidek mennyiségét a vizsgálati mintákban.

3.5. A vizsgált peptid származékok antioxidáns aktivitásának meghatározása FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) módszer alapján

A FRAP vizsgálatokat peptid standard oldatokon végeztem el. A peptid standard vegyületekből (Sigma-Aldrich) 100 mg/l töménységű törzsoldatokat készítettem, majd MAGALHAES és munkatársai (2008) közleménye alapján határoztam meg a peptidek antioxidáns aktivitását. A képződő komplex színintenzitás változását 5 perces reakcióidő elteltével, 593 nm hullámhosszon, abszorbancia meghatározással detektáltam. Az antioxidáns aktivitás értékek aszkorbinsav egyenértékben (AAE) kerülnek meghatározásra.

3.6. Élelmiszerminták peptid tartalmának meghatározása a kidolgozott kromatográfiás módszerek alapján

A vizsgált minták a szakirodalmi közleményeknek megfelelően növényi (rizs, zöldborsó, fokhagyma) és állati (tej, sajt, tejföl, joghurt, kefir, túró) forrásokból kerültek kiválasztásra. A kromatográfiás vizsgálati módszernek megfelelően a kénmentes peptidek kvantitatív meghatározása Danzil-kloirddal történő származékképzést követően, míg a tiol csoportot tartalmazó peptidek mennyiségét orto-ftálaldehiddel történt származékképzést követően határoztam meg a kidolgozott minta előkészítési módszernek megfelelően.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Előkísérletek eredményei

Az oldatok UV/VIS vizsgálata kis intenzitású elnyelési sávokat eredményezett 200 nm körüli hullámhosszon. A szabad peptidek kromatográfiás vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a kromatográfiás csúcsok elválása nem megfelelő, a peptidek mennyiségi meghatározása nem megoldható ezen módszer szerint. A fényszóráson alapuló detektálási mód szerint elvégzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy tiol csoportot tartalmazó peptidek meghatározása ELS detektálással nem hajtható végre, mivel a 100 °C körüli hőmérsékleten történő ködképzés és párologtatás a szabad peptidek bomlását okozza. A stabilitási vizsgálatok során megállapítottam, hogy a peptidek eltérő módon kapcsolódnak a fémionokkal, az L-glutation esetén három eltérő komplex, míg a γ -glutamil-cisztein esetén két eltérő peptid-fém komplex kialakulása igazolható a tömegspektrometriás detektálás során.

4.2. Kis molekula tömegű peptidek folyadékkromatográfiás meghatározásának eredményei származékképzést követően

A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy két különböző származékképzési eljárás és detektálási mód szerint célszerű végrehajtani a kis molekula tömegű peptidek kromatográfiás meghatározását annak megfelelően, hogy a vizsgálni kívánt peptid tartalmaz-e tiol funkciós csoportot. A ciszteint nem tartalmazó peptidek (Apm, Ala-Gln, L-Kar) esetén Danzil-kloriddal történő származékképzés alkalmazása indokolt,

UV/VIS detektálás (290 nm) diódasoros detektor alkalmazása mellett. A kifejlesztett módszer alkalmazásával elvégzett vizsgálatok alapján megállapítottam, hogy a vizsgált peptidek 10 µg/kg kimutatási határral határozhatók meg.

A cisztein tartalmú peptidek (Gsh, γ -Glu-Cis) folyadékkromatográfiás meghatározására a Danzil-kloriddal történő származékképzés kevésbé alkalmas, ez esetben OPA származékképző használata indokolt, a vizsgált komponensek válaszjelének detektálását pedig fluoreszcens detektor alkalmazásával indokolt elvégezni 336 nm gerjesztés mellett, 455 nm detektálási hullámhosszon. A fluoreszcens detektálási mód alkalmazásával a kéntartalmú peptidek meghatározásának alsó küszöbértékét 1-2 µg/l közötti koncentrációban tudtam meghatározni.

4.3. Természetes peptidek stabilitása különböző környezeti hatások függvényében

A környezeti paraméterek peptid stabilitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata során megállapítható, hogy a kis molekula tömegű peptidek kifejezetten érzékenyek azon környezeti tényezők által kifejtett hatásokra, melyek leggyakrabban hatással vannak az élelmiszerekre és élelmiszeripari nyersanyagokra. A környezet kémhatása (főként alacsony pH érték), az oxidatív körülmények (levegővel hosszabb ideig érintkezve) és a fény (hosszabb ideig napfényen tárolva) is nagymértékben károsítja a peptid vegyületeket, stabilitásuk még kisebbnek mutatkozik, ha a vizsgált paraméterek együttesen fejtik ki hatásukat.

4.4. Természetes peptidek stabilitásának vizsgálata komplexképző fémek alkalmazásával

Vizsgálataim alapján igazoltam, hogy fém komplexek hozzáadásával növelhető a vizsgált peptidek stabilitása. A leghatékonyabb védő hatást a vizsgálatok során alkalmazott négy fém (cink, kalcium, magnézium, vas) együttes adagolása biztosítja a peptidek számára. Megállapítottam, hogy az alkalmazott mátrix a komplexképzésért felelős fémek jelenlététől függetlenül befolyásolja a stabilitást, mivel keményítő mátrix alkalmazása során a fémek védő funkciója nem érvényesül.

4.5. A vizsgált peptid származékok antioxidáns aktivitása

A peptidek FRAP módszer szerint végzett antioxidáns aktivitás vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a vas redukción alapuló módszerrel nem tudtam jelentős antioxidáns aktivitást meghatározni a vizsgált peptidek vonatkozásában, a szakirodalmi adatokban szereplő antioxidáns aktivitás alapvetően nem a peptidek a gyökfogó képességén alapul.

4.6. Élelmiszerminták peptid tartalma

A növényi és állati eredetű források vizsgálata során megállapítható, hogy a peptidek nem fordulnak elő olyan mennyiségben az általam vizsgált élelmiszeripari alapanyagokban és késztermékekben, hogy kinyerésük gazdaságosan kivitelezhető lenne, mely párosul még a peptidek kismértékű stabilitásával is. Megállapítottam, hogy bizonyos

peptidek adott élelmiszer típusokban nagyobb mennyiségben fordulnak elő. γ -glutamil-cisztein nagyobb mennyiségben található meg fokhagymában és vizsgált barna rizs mintában, míg alanil-glutamin dipeptidből zöldborsó készítményekben határoztam meg magasabb koncentrációt a többi vizsgált mintához viszonyítva.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A vizsgált peptid vegyületek folyadékkromatográfiás meghatározásának vizsgálata során megállapítottam, hogy a modellvegyületek (aszpartám, L-karnozin, L-glutation, alanil-glutamin és γ -glutamil-cisztein) egy adott HPLC módszer szerinti meghatározása nem végezhető el kellő pontossággal és reprodukálható módon. A peptidek eltérő funkciós csoportjai meghatározzák kémiai tulajdonságaikat, így azonos származékképzővel szemben eltérő módon reagálnak.
2. A ciszteint nem tartalmazó peptidek vizsgálata során megállapítottam, hogy Danzil-kloriddal történő származékképzést követően UV tartományban (290 nm), diódasoros detektálással kellő pontossággal és precizitással lehet mennyiségi meghatározást végrehajtani. A kromatográfiás elválasztás reverz fázisú kromatográfiás oszlopon valósult meg (Agilent Eclipse plus RPC18 150X3, 3,3 μ m). A vizsgálatok során a modellvegyületek kimutatási határa: Ala-Gln=17 μ g/l, L-Kar=16 μ g/l, Apm=160 μ g/l.
3. A cisztein tartalmú peptidek vizsgálata során megállapítottam, hogy folyadékkromatográfiás mennyiségi meghatározásuk orto-ftálaldehid tioetanolos oldatával történő származékképzést követően, fluoreszcens detektor (RF) alkalmazásával végezhető el. A meghatározás származékképzés utáni injektálását követően 340 nm gerjesztés mellett 455 nm detektálási hullámhosszon történt. A kromatográfiás elválasztást fordított fázisú oszlopon (Agilent Eclipse plus RPC18 150X3, 3,3 μ m) hajtható végre. A modellvegyületek kimutatási határa ez esetben is a kromatogramok jel-zaj viszonyából került meghatározásra, mely mindkét kén tartalmú peptidnél 2 μ g/l

értéknek adódott (Gsh=2,1 $\mu\text{g/l}$, $\gamma\text{-Glu-Cis}$ =1,3 $\mu\text{g/l}$), mely jelentős javulás korábbi eljárásokhoz képest.

4. A kutatás során megállapítottam, hogy a vizsgált peptidek stabilitása jelentősen eltér egymástól különböző környezeti paraméterek hatására. A ciszteint nem tartalmazó peptidek bomlása savas kémhatás (pH=4), magas hőmérséklet (+30 °C) és a levegő oxigén tartalmának hatására számottevő, tárolhatóságuk néhány nap időtartamra korlátozódik. A tiol csoportot tartalmazó peptidek esetén intenzívebb mértékű bomlás határozható meg a tiol csoportot nem tartalmazó peptidekhez képest a környezeti paraméterek hatására, melynek eredményeként megállapítható, hogy néhány nap tárolási idő alatt közel 100%-os mértékű bomlást szenvednek.
5. Vizsgálataim alapján igazoltam, hogy fém-komplexek képzésével növelhető a vizsgált peptidek stabilitása. A leghatékonyabb védő hatást az alkalmazott négy fém (cink, kalcium, magnézium, vas) együttes alkalmazása biztosítja a peptidek számára. Megállapítottam ugyanakkor, hogy az alkalmazott mátrix a komplexképzésért felelős fémek jelenlététől függetlenül jelentősen befolyásolja a stabilitást, keményítő mátrix alkalmazása során a fémek védő funkciója nem érvényesül.
6. Megállapítottam, hogy a vizsgált növényi és állati eredetű élelmiszer alapanyagok és késztermékek nem tartalmazzák a vizsgált bioaktív peptid vegyületeket olyan mennyiségben, mely gazdaságos módon történő kinyerésüket lehetővé tenné élelmiszeripari adalékanyagként való felhasználásukat figyelembe véve. Az élelmiszer előállítási technológiák legtöbbször (közeg kémhatásának változása, hőkezelés módja és ideje) a peptidek koncentrációjának csökkenését eredményezi.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Publikációk referált nemzetközi folyóiratban:

Attila Kiss, **Sándor Rapi**, Péter Forgó: Comparative liquid chromatographic studies for the determination of bioactive peptides, ANALYTICAL LETTERS 46:(16) pp. 2514-2525. (2013) (IF: 0,982)

Sándor Rapi, Péter Forgó, Attila Kiss: Characterisation of conditions affecting stability of oligo-peptide derivatives of potential health-preserving effect, POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES 61, p. 75. (2011) (IF: 0,241)

Publikációk nemzetközi konferenciákon:

Peter Forgo, **Sandor Rapi**, Attila Kiss: Revealing bioactive peptide profile of versatile plant species by improved chromatographic methods In: Latin American symposium of food science impact on nutrition and health. Sao Paulo, Brazil, 2013.05.07-2013.05.10. Sao Paulo: Paper 03489.

Sándor Rapi, Péter Forgó, Attila Kiss: Characterisation of conditions affecting stability of oligo-peptide derivatives of potential health-preserving effect, EuroFoodChem XVI. Gdansk, Poland, 2011.07.06 -2011.07.08.

Sandor Rapi, Peter Forgo, Attila Kiss: Oligo-peptide derivatives as perspective functional food components, detection and stability 1st International Congress on Food Technology: Abstract Book. 547 p. Antalya, Turkey,

2010.11.03-2010.11.06. Association of Food Technology, 2010. p. 175. ISBN:978-975-00373-3-7)

Péter Forgó, **Sándor Rapi**, Attila Kiss: Analysis of natural bioactive peptides by applying novel HPLC methods and stabilizing metals ISABC 10: 10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry. 224 p. Debrecen, Hungary, 2009.09.25-2009.09.28. p. 45. (ISBN:978-963-473-307-2)

S Rapi, A Kiss, P Forgó: Study on bioactive di-, and tripeptide content in natural plant sources by HPLC methods with respects to functional food application, International Scientific Conference on Nutraceuticals and Functional Foods. Zilina, Slovakia, 2009.06.09-2009.06.11. Paper 1.

Publikációk magyar nyelvű konferenciákon:

Kiss A, **Rapi S**, Forgó P: Stability studies of biologically active peptides in real samples, Food Science Conference 2013 - With research for the success of Darányi Program. Budapest, Magyarország, 2013.11.07-2013.11.08. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, 2013. p. 212. (ISBN:978-963-503-550-2)

Rapi Sándor, Kiss Attila, Forgó Péter: Bioaktív peptidek stabilitásának vizsgálata különböző környezeti paraméterek és mátrixok függvényében, XI. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia: Innovatív környezeti diagnosztikai módszerekkel és technológiákkal az egészségesebb emberi környezetért. 111 p. Hajdúszoboszló, Magyarország, 2013.10.02-2013.10.04. (Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Társaság) p. 54. (ISBN:978-963-9970-40-3)

Rapi Sándor, Kiss Attila, Forgó Péter: Bioaktív peptidek- mint ígéretes funkcionális élelmiszer komponensek- kromatográfiai meghatározásának lehetőségei Táplálkozástudományi kutatások Innováció- Táplálkozás- Egészség- Marketing workshop. Kaposvár, Magyarország, 2012.12.10 p. 26.

Rapi Sándor, Kiss Attila, Forgó Péter: Természetes peptidek stabilitásának vizsgálatai különböző környezeti hatások függvényében MKE 1. Nemzeti Konferencia: Program és előadás összefoglalók. 360 p. Sopron, Magyarország, 2011.05.22-2011.05.25. p. 232. (ISBN:978-963-9970-11-3)

Rapi Sándor, Kiss Attila, Forgó Péter, Murányi Zoltán: Természetes peptidek stabilitásának vizsgálatai különböző környezeti hatások függvényében Magyar Táplálkozástudományi Társaság 36. vándorgyűlése. 59 p. Balatonőszöd, Magyarország, 2011.10.06-2011.10.08. p. 48. (ISBN:978 963 88108 4 7)

Rapi Sándor, Forgó Péter, Kiss Attila: Peptid típusú bioaktív anyagok kinyerése és meghatározása funkcionális élelmiszer fejlesztés céljából BCE ÉTK: Lippay János – Ormos Imre–Vas Károly Tudományos Ülésszak, Élelmiszertudományi Kar, Budapest, Magyarország, 2009.10.28-2009.10.30. pp. 112-113.

Sándor Rapi, Attila Kiss, Péter Forgó: Revealing of major analytical implications of biologically active tripeptides, as well as evaluation of impacts of environmental and storage conditions on possible transformation processes p. 1. p. Food Safety and research at Egerfood Regional Knowledge Centre of Eszterházy Károly College (2009).