

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

SZÉKELYHIDI RITA

**MOSONMAGYARÓVÁR
2019**

**SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
MOSONMAGYARÓVÁR
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK**

**WITTMANN ANTAL NÖVÉNY-, ÁLLAT-ÉS ÉLELMISZER-
TUDOMÁNYI
MULTIDISZCIPLINÁRIS
DOKTORI ISKOLA**

**PULAY GÁBOR ÉLELMISZERTUDOMÁNYI
DOKTORI PROGRAM**

**DOKTORI ISKOLAVEZETŐ:
PROF. DR. ÖRDÖG VINCE
EGYETEMI TANÁR**

**TÉMAVEZETŐ:
DR. AJTONY ZSOLT
EGYETEMI DOCENS**

**Gyógynövény eredetű illó alkotók vizsgálata SPME-GC-MS módszerrel
kérődzők takarmányában, vérplazmában, tejben, tejsírban és
sajtokban**

**KÉSZÍTETTE:
SZÉKELYHIDI RITA**

**MOSONMAGYARÓVÁR
2019**

**Gyógynövény eredetű illó alkotók vizsgálata SPME-GC-MS módszerrel
kérődzők takarmányában, vérplazmában, tejben, tejsírban és
sajtokban**

**Írta:
Székelyhidi Rita**

**Készült a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és
Élelmiszertudományi Kar Wittmann Antal Növény-, Állat- és
Élelmiszertudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola Pulay Gábor
Élelmiszertudományi Doktori Programja keretében**

Témavezető: Dr. Ajtony Zsolt

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

**A jelölt a doktori szigorlaton.....%-ot ért el.
Mosonmagyaróvár,**

**.....
a Szigorlati Bizottság Elnöke**

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

Esetleg harmadik bíráló (Dr.) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár,

A Bírálóbizottság elnöke

Doktori (PhD) oklevél minősítése.....

Az EDT elnöke

Tartalomjegyzék	
Kivonat	9
Abstract	12
1. Rövidítések	15
2. Bevezetés és célkitűzés	16
3. Irodalmi áttekintés	18
3.1. Illóolajok jellemzése és története	18
3.1.1. Illókomponensek sajátosságai	18
3.2. Illóolajok összetevői	19
3.3. Gyógynövények, növényi drogok, hatóanyagok	20
3.4. Illóolajok hatásai	22
3.4.1. Illóolajok hatása baktériumokra	23
3.4.2. Illóolajok hatása élesztőgombákra	24
3.4.3. Illóolajok hatása fonalas gombákra	25
3.4.4. Egyéb hatások	26
3.5. Illóolajok felhasználása élelmiszerekben	28
3.5.1. Illóolajok és élelmiszer-összetevők kölcsönhatása	29
3.5.2. Illóolajok növényi eredetű élelmiszerekben	29
3.6. Gyógynövény illóalkotók kinyerésének módjai	30
3.6.1. Vízgőz-desztilláció	30
3.6.2. Szerves oldószeres extrakció	31
3.6.3. Szuperkritikus folyadék extrakció	32

3.6.4. Gőztéranalízis.....	32
3.6.5. Szilárdfázisú mikroextrakció (SPME)	33
3.6.5.1. SPME szál kialakítása	38
3.6.5.2. SPME szál anyaga.....	39
3.6.5.3. SPME módszer típusai	42
3.6.5.4. SPME módszer alkalmazási területei.....	45
3.6.6. Élelmiszermatrix-illókomponens kölcsönhatások.....	46
3.6.7. SPME az élelmiszer analízisben	47
3.6.8. Tejtermékekből SPME módszerrel detektálható főbb vegyületcsoportok	50
3.6.8.1. Terpénvegyületek	51
3.6.8.2. Zsírsavak	52
3.6.8.3. Aldehidek és ketonok.....	54
3.6.8.4. Észterek	57
3.6.8.5. Alkoholok.....	58
3.6.8.6. Kéntartalmú szerves vegyületek.....	59
3.6.8.7. Furánok.....	59
3.6.8.8. Fenolok.....	60
3.7. Gázkromatográf-tömegspektrométer (GC-MS)	60
3.7.1. Gázkromatográfia (GC).....	60
3.7.2. Gázkromatográfias rendszer felépítése	61
3.7.3. Tömegspektrométer, mint detektor	61
3.8. Takarmányozás hatása a tej és tejtermékek minőségére	62
3.8.1. Kérődzők takarmányfelvétele	64
3.8.2. Takarmányozás hatása a tej és tejtermékek terpén tartalmára.....	64

3.8.3. Takarmányozási kísérlet során felhasznált gyógynövények .	67
3.8.3.1. Kamilla (<i>Matricaria recutita</i> L.)	67
3.8.3.2. Lestyán (<i>Levisticum officinale</i> L.)	68
3.8.3.3. Kerti izsóp (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	69
3.8.3.4. Kapor (<i>Anethum graveolens</i> L.).....	70
3.8.3.5. Szagos müge (<i>Asperula odorata</i> L.)	71
3.8.3.6. Közönséges cickafark (<i>Achillea millefolium</i> L.)	72
3.8.3.7. Kecskerutafű (<i>Oalega officinalis</i> L.).....	73
3.8.3.8. Tárkony (<i>Artemisia dracunculus</i> L.)	74
3.8.3.9. Lándzsás útifű (<i>Plantago lanceolata</i> L.)	74
3.8.3.10. Orvosi zsálya (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	75
4. Kísérleti eljárások.....	77
4.1 Kísérletekhez felhasznált vegyszerek és gyógynövények.....	77
4.3 Minták és mintavételi eljárások.....	77
4.3.1. Szarvasmarhától származó minták	77
4.3.2. Kecskétől származó minták.....	78
4.4. Mintaelőkészítés	79
4.5. Szilárdfázisú mikroextrakció (SPME)	80
4.6. Gázkromatográf-tömegspektrométer (GC-MS) rendszer.....	82
4.7. Gyógynövények illóalkotóinak azonosítása	84
4.8. SPME mintavételi körülmények optimalása tejszír mintákra	85
4.9. Kalibráció tejszír minták esetében	86
4.10. SPME mintavételi körülmények optimalása nyers kecsketej mintákra.....	87
4.11. Kalibráció nyers kecsketej minták esetében.....	87
5. Eredmények és tárgyalásuk.....	89
5.1 Gyógynövények és gyógynövényekkel kevert takarmányok illó alkotóinak vizsgálata	89
5.1.1. Gyógynövények gőztérbeli illó alkotóinak azonosítása.....	89

5.1.2. SPME mintavétel gyógynövények gőzteréből	93
5.1.3. Gyógynövények illóalkotói	93
5.1.4. SPME mintavétel gyógynövénnyel kevert takarmányok gőzteréből	98
5.1.5. Gyógynövénnyel kevert takarmányok illóalkotói	98
5.2. Gyógynövényes takarmánnyal etetett tejelő szarvasmarhák tejzsír illó terpén tartalmának vizsgálata	102
5.2.1. HS-SPME mintavételi körülmények optimalálása.....	102
5.2.2. Minőségi és mennyiségi meghatározás	103
5.2.3. Ismételhetség és meghatározási határ	105
5.2.4. Terpének különböző gyógynövényekkel kevert takarmánnyal etetett tehének tejzsírjában	106
5.3. Gyógynövényekkel kiegészített takarmánnyal etetett kecskék tejeinek illó terpén tartalma	111
5.3.1. HS-SPME mintavételi körülmények optimalálása.....	111
5.3.2. Minőségi és mennyiségi meghatározás	112
5.3.3. Ismételhetség, meghatározási határ	113
5.3.4. Illó terpének különböző gyógynövényekkel etetett kecskék tejében	114
5.4. Gyógynövényekkel adalékolt takarmánnyal etetett tejelő szarvasmarhák vérplazmáinak és tejeinek, valamint azokból készült sajtoknak az illó terpén tartalma.....	119
5.4.1. Vérplazma minták	119
5.4.2. Tehéntej minták.....	123

5.4.3. Sajt minták.....	126
6. Összefoglalás és következtetések.....	134
7. Köszönetnyilvánítás	140
8. Új tudományos eredmények.....	142
9. Irodalomjegyzék.....	145
10. Mellékletek.....	180

Gyógynövény eredetű illó alkotók kérődzők takarmányában, plazmában, tejben, tejsírban és sajtokban

Kivonat

Vizsgálataimat több különböző fázisban végeztem és a felhasznált minták is két különböző telepről érkeztek az elemzések helyszínéül szolgáló Széchenyi István Egyem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszékének Analitikai Laboratóriumába. A tejelő szarvasmarhaktól származó minták a Bicskei Mezőgazdasági Zrt. telepéről érkeztek, ahol a kísérleti egyedeket különböző gyógynövényekkel beültetett legelőkre hajtották ki és ott a gyógynövényeket legelve jutottak szervezetükbe a vizsgálni kívánt gyógynövény hatóanyagok. A tej- és vérminták 10 napos legelést követően 2-2 kísérleti állat reggeli és esti fejésű tejéből származtak és ekkor történt a vérvétel is. A dolgozatban vizsgált sajtmintákat ezen egyedek gyógynövényes tejéből készítették a Bicskei Mezőgazdasági Zrt. munkatársai. A kecskékkal végzett etetési kísérleteket Csató József kertai mezőgazdasági vállalkozó telepén folytattam. Ebben a kísérletben már pontos mennyiségekkel végeztem az etetést. A minták 3-3 kísérleti jószágától származtak, melyeket elzárva tartottak a többi egyedtől és 10-10 napig etették 6 különböző gyógynövénnyel. A takarmányhoz kevert növények mennyiségét fokozatosan emeltük a 10 nap során 40 g-ról 50 g-ra, hogy elkerüljük a kiskérődzők bendőjének megterhelését. A kecsketej minták az etetési kísérlet 10. napjának esti fejéséből származtak. Az etetési kísérleteket követően következett a laboratóriumba érkezett tej-, vér- és sajtminták feldolgozása és elemzése.

Bár dolgozatom célja egy olyan analitikai módszer kidolgozása volt, melynek alkalmazásával közvetlenül nyers tejből tudjam meghatározni a gyógynövényekből tejekbe átszármazó illó terpénvegyületeket ahhoz, hogy a módszerfejlesztés fázisaig eljussak több előkísérletet kellett végeznem.

Első lépésként gőztér-mintavételes szilárdfázisú mikroextrációs gázkromatográfiás tömegspektrométeres (HS-SPME-GC-MS) módszerrel 55°C mintavételi hőmérsékleten teljes pásztázási üzemmódban az etetési kísérlethez felhasználni kívánt gyógynövények mono- és szeszkviterpén alkotóinak kvantitatív meghatározását végeztem el annak eldöntése céljából, hogy mely terpének megjelenése várható a gyógynövényes takarmánnyal etetett állatoktól származó mintákban. A tejek, tejszírok illó alkotóinak kvantitatív meghatározáshoz a gőztér-mintavételi (HS) kísérleti körülmények optimalizálását és a készülék kalibrálását a gyógynövények gőzterében releváns beütésszámban mért terpénekkal, úgymint α -pinénnel, szabinénnel, β -pinénnel, *p*-cimollal, limonénnel, linaloolal, α -tujonnal, kámforral, mentollal, metilkavikkal, kariofillén E-vel és α -humulénnel végeztem el.

A kísérleti körülmények optimalizálása során megállapítottam, hogy tejek és sajtok esetében 60°C, vérplazmák esetében 40°C, míg tejszírok esetében 80°C az optimális gőztér-mintavételi hőmérséklet. A kalibrációt olyan metanolos eleggyel végeztem, mely megfelelő koncentrációban tartalmazta a korábban felsorolt illó terpénvegyületeket. A tehéntejből terpéneket azok kis koncentrációja miatt sajnos közvetlenül nem sikerült mennyiségileg meghatározni, így azok meghatározását, a terpenoidokat nagyobb koncentrációban tartalmazó, tejek centrifugálásával kinyert tejszíradékkal végeztem. A kecskékkal végzett, már precízen beállított etetési kísérletből származó tejmintákkal azonban sikeresen elvégeztem a célul kitűzött módszerfejlesztés. A dolgozatban bemutatott vérplazmából és sajtból azonosított terpenoidok a dolgozat teljességét szolgálják, hiszen a terpénvegyületek a vérből származnak át a tejbe és a sajttal végzett vizsgálati eredményekből is látható, hogy a feldolgozott termékekben is megjelennek.

A kapott eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a kísérlet befejeztével sikerült egy olyan HS-SPME-GC-MS módszert kifejleszteni, melynek alkalmazásával közvetlenül nyers tejből jó ismételtelőséggel és visszanyeréssel, valamint kis meghatározási határral elvégezhető az illó terpének minőségi és mennyiségi meghatározása.

Volatile herbal ingredients in forage of ruminants, blood plasma, milk, milk fat and cheeses of domestic animals

Abstract

This study has been carried out in several different phases with control and doped samples originating from two different ranches. The analysis was performed at the analytical laboratory of Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences. The samples from dairy cattle came from Bicskei Agricultural Co. of Bicske, Hungary, where experimental animals were grazed on pastures planted with different herbs. From these herbs, the analytes were uptaken by the body of dairy cows. The milk and blood samples were collected after 10-10 days grazing in the course of morning and evening milking from 2 experimental animals. The cheese samples examined in the thesis were prepared from the herbal milk of the experimental animals kept by the Agricultural Co. of Bicske. The feeding studies were carried out in Kerta, Hungary, at the farmyard of József Csató. In these experiments, we applied exact amounts of the herbs in the forage. The samples were collected from 3-3 experimental animals after 10-10 days fed with 6 different herbs. These goats were kept separately from other goats. The amount of herbs in their forage was increased gradually from 40 g to 50 g throughout the 10 days in order to avoid the burden of the small ruminants' rumen. The milk samples were collected in course of the evening milking on the tenth day of the feeding experiment. After the feeding experiments the processing and analysis of milk, blood and cheese samples were performed in the analytical laboratory.

Although the purpose of my work was to develop an analytical method, which is applied to determine directly the volatile herbal compounds from raw milk samples, before the method development I had to do some preliminary experiments.

As a first step, the dried herbs were subjected to chemo-profiling using headspace solid phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) at 55°C and I performed the qualitative and quantitative analysis of mono- and sesquiterpene profiles of the study herbs. After this step, I could conclude the terpene composition of the samples of domestic animal origin.

The optimization of the analytical method and its calibration were carried out with mono- and sesquiterpene standards, which are present in aptly high quantities in herbs, such as α -pinene, sabinene, β -pinene, *p*-cymene, limonene, linalool, α -thujone, camphor, menthol, 4-allilanisole, caryophyllene E and α -humulene. During the optimization of experimental parameters, I found the optimal headspace sampling temperatures of 60, 60, 40 and 80 °C in the case of milk, cheeses, plasmas and milk fats respectively. The method was calibrated against methanolic standard solutions containing mixtures of the studied volatile terpene compounds in appropriately high and accurate concentrations. Due to the low concentrations of terpenes in cow milk, unfortunately, they could not be quantified directly, therefore, the concentrations of terpene compounds were determined from milk fat. On the other hand, the method development was successful with goat milk samples, which came from accurately adjusted feeding experiments. The presented terpene profiles from the blood plasma and cheese serve the completeness of the thesis with the terpene compounds coming from the blood to the milk. It can also be seen from the results that these compounds appear in processed milk products such as cheese.

The results have clearly demonstrated that the developed HS-SPME-GC-MS method can be well utilized to identify qualitatively and

quantitatively the volatile terpenes from raw milk with good repeatability and recovery.

1. Rövidítések

BHA – butil-hidroxi-anizol

BHT – butil-hidroxi-toluol

CAR – karboxén

CW – karbowax

DHSE – dinamikus göztér-extrakció

DI – közvetlen bemezőlés

DVB – divinil-benzol

GC – gázkromatográfia

HPLC – nagy teljesítőképességű folyadékkromatográfia

HS – göztéranalízis

LC – folyadékkromatográfia

MIC – minimális gátlóanyag koncentráció

MS – tömegspektrometria

PDMS –dimetil-polisziloxán

PA – poliakrilát

QS – quorus sensing

ROS – reaktív oxigén származékok

SDME – egycseppes mikroextrakció

SHSE – statikus göztér-extrakció

SPME – szilárdfázisú mikroextrakció

UV – ultraibolya sugárzás

VIS – látható sugárzás

2. Bevezetés és célkitűzés

A legelő, tejhasznú állomány ellenőrzött körülmények között, takarmányozás útján jut hozzá gyógy- és fűszernövényekhez, amelyek révén pozitív állategészségbeli változásokra, másrészt laboratóriumi vizsgálatokkal bizonyítottan a tej megváltozott beltartalmi értékeire és ízbeli jellemzőire számíthatunk.

Jelen munkában a gyógynövényes takarmányozástól a sajtgyártásig végig követtem a hatóanyagok jelenlétét az adalékolt növények hatóanyag-tartalmától, a kinyert tej vizsgálatán keresztül a tejből készült kísérleti termékek vizsgálatáig. A szakirodalomra és a népi megfigyelésekre alapozva választottam ki több gyógy- és fűszernövényt, melyeknek illata, zamata, élettani hatása kedvező.

A termelésben hagyományosan molekula spektrometriai módszereket, úgymint infravörös (IR) vagy ultraibolya-látható (UV-VIS), használják a kémiai komponensek detektálására, mg/L-es kimutatási határral. Gyakran ezeknek a szerves komponenseknek a koncentrációja túl kicsi ahhoz, hogy kimutathatók legyenek az említett eljárásokkal anélkül, hogy előzetes dúsítást végeznének (Forde és mtsai, 2011; Negreira és mtsai, 2009; Prat és mtsai, 2011).

A szilárdfázisú mikroextrakció (SPME) egy viszonylag újkeletű technika, amely egyesíti a keverékből vett minta kinyerését, valamint a dúsítás nélküli, eredeti állapotban lévő minta egyszerűbb deszorpcióját az analitikai berendezésben (Pawliszyn, 2009). Ideális módszer folyadék halmazállapotú mintamatrixok elemzésére, ahol gyorsan beáll az egyensúly az SPME szál folyadékfilmje, valamint az oldat és annak gőztere között.

A mikroextrakciós eljárások egyik nagy előnye, hogy minimális mennyiségű extrahálószer igényelnek, mely lehet egy szorbens vagy

folyadék fázis. Felhasználásuk rendkívül sokrétű, a környezeti, orvosbiológiai, törvényszéki, valamint élelmiszer aroma és illókomponens vizsgálatok esetében az egyik leggyakrabban említett eljárás. Számos könyv és átfogó értekezés jelent meg teljes egészében a mintaelőkészítéseknek és a mintavételi eljárások miniatürizálásának szentelve (Augusto és mtsai, 2003; Bicchi és mtsai, 2008; Pawliszyn, 2002; Pawliszyn és Lord, 2010; Wang és mtsai, 2008a).

Célul tűztem ki, egy olyan HS-SPME-GC-MS módszer kidolgozását, melynek alkalmazásával közvetlenül nyers tej mintamátrixból mind minőségileg, mind pedig mennyiségileg meghatározhatók a különböző takarmányozási módok útján a tejelő állatok szervezetébe kerülő gyógynövényekből származó illékony terpenoidok. Igazolni kívántam továbbá, hogy a gyógynövényes takarmányozás során számos hatóanyag kerül a plazmán keresztül a tejelő állatok tejébe, illetve ezekből készült feldolgozott tejtermékekbe. Ezáltal bizonyítottam azt is, hogy gyógynövényeket tartalmazó takarmány etetésével a feldolgozó üzemek számára olyan alapanyagot lehet előállítani, amely a kidolgozott és alkalmazott analitikai eljárás által bizonyítottan kedvezően befolyásolja a tejpári termékek – elsősorban a sajtok – tulajdonságait.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Illóolajok jellemzése és története

Az illóolajok aromatikus, tömény hidrofób folyadékok, melyeket leggyakrabban vízgőz-desztillációval nyernek ki a különböző növényi részekből (virágokból, gyümölcsökből, magvakból, virágbimbókból, levelekből, kérgekből). A gyógy- és fűszernövények 0,5-2,5%-ban tartalmazhatnak illóolajokat, melyeknek jellegzetes illatukat, aromájukat, valamint részben gyógyhatásukat köszönhetik. Az illóolajokat régóta használja a kozmetikai ipar, különböző illatszerekben, krémekben, kozmetikumokban, de mostanában egyre nő a szerepük az élelmiszeriparban is, ahol főleg íz-és aromaanyagként hasznosítják őket. Az is régóta ismert tény, hogy bizonyos illóolajok rendelkeznek baktérium-, gomba-, vírus-, és parazitaellenes hatással, ezért gyógykészítményekben is gyakran találkozhatunk velük (Burt, 2004).

3.1.1. Illókomponensek sajátosságai

Ahhoz, hogy az illatanyagok elérjék az emberi szagló receptorokat illékonyak kell lenniük, ebből következik, hogy az illókomponenseket általánosságban nagy gőznyomás jellemzi és molekulatömegük sem haladja meg a 300 Da-t. Az illóalkotók gőznyomása az egyes élelmiszer mátrixokban nagyságrendekkel különbözhet, mely különbséget befolyásolja eltérő polaritásuk, valamint az izolálásukra kiválasztott extrakciós technika is. Az aromakomponenseket meg kell tudnunk különböztetni más, nem feltétlenül specifikus illattal rendelkező illékony vegyületektől. Bár a különböző típusú élelmiszerekben eddig nagyjából 12 000 különböző illékony vegyületet sikerült azonosítani, ezeknek csupán kb. 5%-a játszik jelentős szerepet az élelmiszerek illatának kialakításában (Groch, 2001).

Az illókomponensek az emberi szaglószerző számára csak akkor érzékelhetők, ha koncentrációjuk az észlelhető küszöbértéken felül van. Az aromakomponensek illata küszöbértékekkel jellemezhető, mely széles skálán mozoghat a ng/L, illetve a ng/kg koncentrációig. Ez a változatosság még nagyobb kihívássá teszi az illókomponensek azonosítását és mennyiségi meghatározását. Példaként felhozható egy fekete tea örlemény/főzet, mely 89 észtert, 81 ketont, 75 aldehidet, 74 savat, 68 alkoholt, 64 bázikus komponenset, 52 szénhidrogént, 21 furánt, 19 kéntartalmú vegyületet, 18 laktont, 13 fenolt és 17 egyéb komponenset, tehát összesen 591 alkotót tartalmaz (Schieberle és Hoffmann, 2012).

Az élelmiszer mintamátrixban azonosítható illókomponensek száma függ az alkalmazni kívánt elválasztástechnikai módszertől és az azonosítás módjától. Az élelmiszerekben azonosítható illékony vegyületek száma a kapilláris kolonnák használatával nagyon gyorsan növekedett, napjainkban hasonlóan nagy, ugrásszerű fejlődés figyelhető meg a gázkromatográfia-tömegspektrometriás (GC-MS) csatolt technika alkalmazásával (Groch, 2001).

3.2. Illóolajok összetevői

Az illóolajok több mint 50 összetevőből is állhatnak, melyek között a fő komponensek akár 85%-ban lehetnek jelen, míg egyes mellékalkotók csupán nyomokban találhatók meg. Az illóolajok összetevői legnagyobb részben különböző terpének és terpenoidok (oxigéntartalmú terpének): monoterpének (C₁₀), vagy szeszkviterpének (C₁₅), de kisebb mennyiségben lehetnek diterpének (C₂₀) és triterpének (C₃₀) is. A terpének felül további jelentős összetevők lehetnek a különböző kis molekulatömegű alifás és aromás vegyületek, pl. szénhidrogének, savak, alkoholok, aldehidek, laktonok és kéntartalmú illékony vegyületek. A komponensek mennyisége és

aránya változhat az időjárás, a földrajzi elterjedés, és a növényeken belüli egyedi eltérések függvényében (Burt, 2004).

Az illóolajok fő összetevői kb. 90%-ban monoterpének, melyek két izoprén molekula (C_5H_8) összekapcsolódásával jönnek létre, és változatos funkciós csoportjaik alapján több csoportba sorolhatók: szénhidrogének, melyek lehetnek ciklikus szerkezetűek (terpinének, pinének, szabinén); alkoholok (linalool, gerániol); aldehidek (gerániál, nerál); ketonok (karvon, kámfor); észterek (linalil-acetát), fenolok (timol, karvakrol). Az aromás gyűrűt tartalmazó komponensek, mint például a fahéjaldehid, fahéjalkohol, eugenol, metilkavicol, stb., kevésbé gyakoriak (Bakkali és mtsai, 2008).

3.3. Gyógynövények, növényi drogok, hatóanyagok

Gyógynövényeknek a szó legtágabb értelmében azokat a növényeket nevezzük, amelyeket a történelem során a hagyományos orvoslásban használtak, ill. azokat, amelyeket a modern terápiákban jelenleg is használnak a különféle betegségek kezelésére és gyógyítására. Egy ennél szűkebb és pontosabb meghatározás szerint azokat a növényeket nevezzük gyógynövényeknek, melyeknek hatóanyagokat tartalmazó részeit, ill. a különféle eljárásokkal kinyert anyagait (pl. illóolajat, zsíros olajat, hatóanyag-együttest, tiszta hatóanyagot, stb.) feldolgozás nélkül (pl. gyógyteának, gyógyfürdőnek elkészítve) vagy feldolgozva (különféle növényi gyógyszerek formájában) valamilyen kórfolyamat megelőzésére és kezelésére, vagy az egészség megőrzésére használják. Vannak azonban olyan növények is, amelyeket elsősorban élelmiszerként ismerünk és fogyasztunk (pl. vöröshagyma, fokhagyma, fejes káposzta, fekete retek, burgonya, sárgarépa, cékla, torma és áfonya), ugyanakkor táplálkozási értékeik mellett a kedvező terápiás tulajdonságaikról és gyógyászati

alkalmazásukról is egyre több ismeretanyag gyűlik össze, ezért gyógynövényként is fokozott figyelemben részesülnek.

Növényi drogoknak az esetek többségében a gyógynövények hatóanyagot tartalmazó, gyógyszerári felhasználásra, vagy droggereskedelmi forgalmazásra, szárított, illetve megfelelő módon előkészített részét nevezik. Fontos, hogy ennek a gyógynövény-ismeretben és a növényi gyógyszerek előállításánál használt szakkifejezésnek „drog” része nem egyenlő a kábítószer fogalmával. A szárított növényi részek mellett többek között szintén drognak nevezik a növényekből vízgőz-desztillációval kivont illóolajat, a különböző technológiákkal kinyert zsíros olajat illetve egyéb, növényekből préseléssel vagy oldószeres extrakcióval kinyert anyagokat (préshedv, gyanta, tinktúra stb.).

A növényi drogok nevét - egy nemzetközi szabály alapján - a drogot szállító növény és növényi rész latin nevének felhasználásával adják meg úgy, hogy a növény latin neve (rendszerint nemzetség név) áll elől birtokos esetben, melyet a növényi rész alanyesetben álló latin neve követ.

Hatóanyagoknak azokat a növény különböző részeiben felhalmozódó kémiai összetevőket (vegyületeket) nevezzük, melyek kedvező hatást gyakorolnak az emberi szervezetben lejátszódó élettani és kórfolyamatokra, és így járulnak hozzá a betegségek megelőzéséhez és a gyógyuláshoz. A növényekben lévő hatóanyagok között vannak olyanok, melyek egy-egy adott terápiás hatásért felelősek, ezeket hatóanyagoknak nevezzük, és mellettük lehetnek olyan, kisebb mennyiségben jelenlévő anyagok is, amelyek a hatóanyagok hatását felerősítik, esetleg gyengítik. Ezek az ún. kísérőanyagok (Babulka, 2004).

3.4. Illóolajok hatásai

Minden illóolaj valamilyen mértékben antiszeptikus és dezinficiens, azaz megakadályozzák a fertőzést, vagy ha már bekövetkezett, akkor felszámolják. Már kis koncentrációban is gátló hatást gyakorolnak a baktériumokra és gombákra, ezáltal alkalmasak szerves anyagok tartósítására is. A citrom, borsmenta, kakukkfű, levendula, narancshéj, eukaliptusz, csillagos ánizs és rozmaring illóolajának gőzei a leghatékonyabb baktériumölő anyagok.

Az ókori Egyiptomban a múmiák tartósítására illóolajokat és balzsamokat használtak. Régen a húsok tartósítására is használták ezeket a növényeket, sőt sebkezelésre és bélféregűzésre is. A kísérletekben a timol, karvakrol, cineol a baktériumok szaporodását és életműködését 1:5000-tól 1:30000-ig terjedő hígításban is gátolta (Németh, 2007).

A növényi illóolajok antimikrobiális hatása régóta ismert és ma is intenzíven kutatott terület. Hammer és mtsai (1999) 54 növény illóolajának baktérium- és élesztőellenes hatását vizsgálták. Nevas és mtsai (2004) 13 finn fűszernövény illóolajának antibakteriális hatását, míg Viuda-Martos és mtsai (2008) a citrusfélék illóolajának penészgombákra kifejtett hatását tanulmányozták. Számos közlemény jelent meg az egyes illóolaj komponensek antimikrobiális hatásáról is (Dorman és Deans, 2000; Carson és mtsai, 2002; Bennis és mtsai, 2004; Hammer és mtsai, 2004). Az élelmiszerek eltarthatóságának javítására a természetes eredetű antimikrobiális hatású anyagok, köztük az illóolajok, használata az élelmiszeriparban elterjedőben van, mivel a fogyasztók ellenérzése a szintetikus tartósítószerekkel szemben egyre nő (Bagamboula és mtsai, 2004; Burt, 2004).

3.4.1. Illóolajok hatása baktériumokra

Az illóolajok antibakteriális hatását számtalan humánpatogén (pl. *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*; *Streptococcus pyogenes*, stb.), élelmiszer eredetű megbetegedést okozó (pl. *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, stb.) és élelmiszerromlást okozó (pl. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia marcescens*, stb.) baktérium ellen vizsgálták már (Bagamboula és mtsai, 2004; Daifas és mtsai, 2004; Mihajilov-Krstev és mtsai, 2009; Rasooli és mtsai, 2002).

Általános megfigyelés, hogy a Gram-pozitív baktériumok érzékenyebbek az illóolajok gátló hatására, mint a Gram-negatívak (Burt, 2004). A különbség valószínűleg az eltérő sejtfalszerkezetnek, illetve a Gram-negatív baktérium sejtfal külső membránjának köszönhető, mely gátat jelent a hidrofób illóolaj komponensek számára (Burt, 2004; Longbottom és mtsai, 2004).

Mivel az illóolajok sok összetevőből állnak, antibakteriális hatásukat is különböző mechanizmusok útján fejtik ki. A leggyakoribb célpont a bakteriális sejtfal és a sejthártya. A hidrofób komponensek beékelődhetnek a sejthártyába és megnövelhetik annak átjárhatóságát, a fenolos típusú komponensek ugyancsak a sejthártya átjárhatóságát fokozzák. A megnövekedett áteresztőképesség különböző, a sejtplazmában található anyagok kiáramlásához, illetve a sejtplazma fehérjék kicsapódását eredményező illóolaj komponensek beáramlásához vezet (Cristani és mtsai, 2007; Cox és mtsai, 2000). A membránszerkezetben bekövetkező változásokat elektronmikroszkópos felvételekkel is igazolták (Carson és mtsai, 2002).

3.4.2. Illóolajok hatása élesztőgombákra

Az illóolajok élesztők elleni hatását elsősorban humánpatogén *Candida* fajokon (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*), és ételmiszerromlást okozó élesztőkön (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaromyces hansenii*, *Z. bailii*) tesztelték (Cerrutti és Alzamora, 1996; Pinto és mtsai, 2006; Rosato és mtsai, 2008). Az illóolajok és összetevőik gátolták az élesztők szaporodását, a MIC értékek a baktériumoknál tapasztaltakhoz hasonlóak voltak.

A hatásmechanizmusuk is hasonló, mint a baktériumokban, az elsődleges célpont a sejtfal és a sejthártya. A sejthártya átjárhatósága nő, a sejtből 260 nm-es hullámhosszúságú fényt abszorbeáló anyagok távoznak, az elektronmikroszkópos felvételeken a sejtburrok károsodása figyelhető meg (Cox és mtsai, 2000; Bennis és mtsai, 2004). A teafaolaj csökkentette a *C. albicans* légzésének intenzitását, valószínűleg valamelyik légzési enzim gátlásával (Cox és mtsai, 2000). Rosato és mtsai (2008) szerint a teafa-, oregáno- és gerániumolaj szinergikus módon együttműködött az amfotericin B gombaellenes hatóanyaggal kórokozó *Candida* fajok esetében.

Az egyes illóolaj komponensek közül az α -terpinén és a limonén károsította a *C. tropicalis* sejthártyáját. A sejten kívüli térben megnőtt a 260 nm-en abszorbeáló anyagok aránya, ami a sejtből történő kiáramlásra utal (Adegoke, 2000). Parveen és mtsai (2004) szerint az α -terpinén befolyásolta az ergoszterin szintézisben és a szterol beépítésben közreműködő géneket *S. cerevisiae*-ben. Az ergoszterin a gombamembrán egyik fontos alkotója és a sejt belső integritásának megőrzésében kiemelt szerepet játszik. *Thymus pulegioides* (hegyi kakukkfű) illóolajának hatására

különböző *Candida* fajokban ugyancsak csökkent az ergoszterin szintézis (Pinto és mtsai, 2006).

3.4.3. Illóolajok hatása fonalas gombákra

Az illóolajok a legtöbb esetben gátló hatást fejtenek ki a penészgombák telepnövekedésére, illetve a konídiumok és a spórák csírázóképeségére. Ebből a szempontból legalaposabban az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség tagjait tanulmányozták, de *Fusarium*, *Alternaria* és *Botrytis* fajok is szerepelnek a vizsgált fonalas gombák között. Leggyakrabban a borsikafű (*Satureja hortensis*), a citromfű (*Cymbopogon citratus*), a bazsalikom (*Ocimum gratissimum*) és a kakukkfű fajok (*Thymus vulgaris*, *T. pulegoides*) (Fraternale és mtsai, 2005; Nguefack és mtsai, 2003, 2009; Pinto és mtsai, 2006; Wilson és mtsai, 1999) illóolaj kivonatait használták. A citrusfélék olajának gombaellenes hatását többen is tanulmányozták. Caccioni és mtsai (1998) szerint egyenes arányosság állt fent a mono- és szeszkviterpén tartalom és a gombaellenes hatás mértéke között. Viuda-Martos és mtsai (2008) szerint a narancs illóolaj *A. niger*, a mandarin olaj *A. flavus*, a grépfrút olaj pedig *P. chrysogenum* és *P. verrucosum* ellen mutatott erős gátló hatást.

Az illóolajok gombaellenes hatását a gyakorlatban is alkalmazták, Matan és Matan (2008) gumifa fűrészárut kezeltek ánizsolajjal, ami 12 héten keresztül védelmet nyújtott a farontó *Aspergillus* és *Penicillium* fajok elszaporodása ellen. Atanda és mtsai (2006) cirok és földimogyoró magok közé kevert bazsalikom levelekkel nemcsak az *Aspergillus parasiticus* okozta penészesedést tudta csökkenteni, hanem 66-92%-ban az aflatoxin B1 és G1 termelést is. Dikbas és mtsai (2008) *A. flavus*-szal mesterségesen fertőzött citromot kezeltek borsikafű illóolajjal, és ekkor 20 napon keresztül nem jelentek meg látható telepek a gyümölcs felszínén.

Az illóolajok hatásmechanizmusa penészgombák esetében is elsődlegesen a membránt érinti: léziók jelennek meg, illetve erőteljesen csökken az ergoszterin tartalom (Pinto és mtsai, 2006).

3.4.4. Egyéb hatások

Számos illóolajról kimutatták, hogy antimikrobiális hatásuk mellett antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek. Singh és mtsai (2006) a köménymag illóolaját és acetonos kivonatát vizsgálták: az illóolaj antioxidáns hatása valamivel rosszabb volt, mint a kivonaté. Egy másik tanulmányban (Singh és mtsai, 2008) azt állapították meg, hogy a gyömbér illóolaj jobb antioxidáns hatással rendelkezik, mint az élelmiszeriparban használt BHA (2-terc-butil-4-hidroxianizol és 3-terc-butil-4-hidroxianizol keveréke) és BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol). Bakkali és mtsai (2008) szerint az illóolajok elsősorban terpenoid és fenolos komponenseiknek köszönhetően rendelkeznek antioxidáns tulajdonságokkal. Továbbá a sejtmembránon átjutva ezek a komponensek károsítják a mitokondriumok membránját is, ahol megváltozik az elektronáramlás iránya és szabad gyökök keletkeznek. A fenolos illóolaj összetevők ezekkel a molekulákkal reagálva maguk is fenoxil gyökké alakulnak és részt vesznek a ROS (reaktív oxigén származékok) kaszkád kialakulásában. Az antioxidáns molekulák tehát prooxidánssá válnak és így fejtenek ki citotoxikus hatást.

Baktériumokban az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia géneket gyakran plazmidok (R-plazmid) hordozzák. A baktériumok átadják egymásnak a plazmidokat, így növelve a rezisztens kórokozók számát. Schelz és mtsai (2006) borsmenta, eukaliptusz és rozmaring illóolaj hatására plazmid vesztést tapasztaltak *E. coli*-ban. Az illóolajok tehát elvben segítségünkre lehetnek a rezisztencia elleni küzdelemben is.

A baktériumok közötti sejt-sejt kommunikáció összehangolt génkifejeződéshez vezet. Mivel a jelenség csak nagy sejtsűrűségnél lép fel, idegen kifejezéssel „quorum sensing”-nek hívják (quorum az a minimális tömeg, ahol fellép a jelenség, a sensing a környezetből érkező jelek észlelésére utal). A quorum sensing (QS) részt vesz az antibiotikum-rezisztencia kialakulásában, befolyásolja a patogenitást és a biofilm képzést. A QS gátlása csökkentheti egyes baktériumtörzsek patogenitását, illetve rezisztenciáját. A fahéjolaj fő komponense, a fahéjaldehyd ismert QS gátló (Annous és mtsai, 2009). Szabó és mtsai (2010) a rózsaoilaj, gerániumolaj, levendula- és rozmarinolaj esetében mutattak ki QS gátlást.

Gyógyászati célra csak kellő körültekintéssel használják az illóolajokat és hígítatlanul is csak ritkán kerülnek felhasználásra. Belsőleg alkalmazva, az adagot betegenként, nagy körültekintéssel kell megállapítani. Csecsemőknél és kisgyermekknél öt-hét éves korig használatuk, elsősorban orrcseppek esetében ellenjavallt, mert súlyos baleseteket okozhatnak. A menta illóolaja, pl. hirtelen bekövetkező légzésbénulást, szívmegeállást okozhat.

Külsőleg is használatosak, a bőrben helyi vérbőséget idéznek elő, fokozzák a bőr vérellátását, ami kivörösödéshez vezet melegérzet kíséretében. A szövetekben nagyobb adag hisztamin szabadul fel, s csökkennek a reumás izomfájások, ízületi panaszok. A bőrben lévő idegvégződések izgatása által hatnak a légzési és keringési központokra is.

Sokféle hatásuk azzal magyarázható, hogy nem egységes anyagok, hanem nagyszámú vegyületek elegyei. A változatos kémiai összetétel részben magyarázza a hatástani sokoldalúságot. Másrészt a hatás attól is függ, hogy az illóolaj a szervezetben hol választódik ki, mert lényegében véve hatásuk hasonló jellegű, de mindenütt más módon nyilvánul meg.

Az illóolajokat az illatszeripar, a kozmetikai ipar és a szappangyártás is használja, mert a mesterségesen előállított illékony vegyületek gyakrabban okoznak túlérzékenységi, allergiás reakciókat, mint a természetes illóolajok. A zsíros olajoktól való megkülönböztetés céljából a gyógyászatban az illóolajokat az *Aetheroleum* névvel jelölik, a zsíros olajok neve simán *Oleum* (Németh, 2007).

3.5. Illóolajok felhasználása élelmiszerekben

Napjainkban egyre nagyobb az igény arra, hogy az élelmiszerek hosszú ideig eltarthatók legyenek károsodás nélkül. Az élelmiszerek eltarthatóságának javítására többféle eljárás létezik, azonban a friss, minimálisan feldolgozott élelmiszerek iránti növekvő igény és a fogyasztók ellenérzése a szintetikus tartósítószerrel szemben, újra a figyelem középpontjába állította a természetes eredetű, környezetbarát antimikrobiális hatóanyagokat. Figyelembe kell ugyanakkor venni, hogy ugyanannak a hatásnak az eléréséhez az *in vitro* kísérletekben általában kisebb illóolaj koncentrációra van szükség, mint az élelmiszerekben, mivel az élelmiszerekben jelen lévő összetett kémiai környezet fizikai és kémiai gátat jelenthet az illóolaj csíraölő hatásával szemben. Az élelmiszerekbe nagyobb koncentrációban adagolt illóolajok ugyanakkor negatívan befolyásolhatják az élelmiszer érzékszervi tulajdonságait (ízét, illatát, zamatát). Ennek a jelenségnek az elkerülésére az illóolajok kombinálhatók egymással, minthogy az egymás hatását felerősítő kombinációkban kisebb koncentráció is elegendő a megfelelő hatás eléréséhez (Burt, 2004; Hammer és mtsai, 1999).

3.5.1. Illóolajok és élelmiszer-összetevők kölcsönhatása

A nagy fehérje-, zsír-, illetve olajtartalom általában csökkenti az illóolajok hatását az élelmiszerekben. Az illóolajok jól oldódnak az élelmiszer zsírtartalmában, így kevésbé érik el a vizes fázisban található baktériumokat. A fehérjék hidrofób részei, kölcsönhatásba lépve az illóolaj molekulákkal, megkötik azokat, így csökkentve a membránokra gyakorolt hatást (Burt, 2004; Cava és mtsai, 2007). Gutierrez és mtsai (2008, 2009) kísérleteiben az összetett szénhidrátok, mint például a keményítő, 5% feletti koncentrációban csökkentették az illóolajok hatását, míg a szacharóz nem befolyásolta az antibakteriális hatást. Meglepő módon a nagy fehérje koncentráció viszont növelte az általuk vizsgált illóolajok hatásfokát.

3.5.2. Illóolajok növényi eredetű élelmiszerekben

Az irodalomban leginkább gyümölcs alapú élelmiszerek illóolajokkal végzett tartósítására találunk példát. Cerrutti és Alzamora (1996) alma- és banánpüré tartósítására próbáltak különböző illóolajokat felhasználni, de azt tapasztalták, hogy 100 mg/L feletti koncentrációban, a borsmentaolajat kivéve, mindegyik vizsgált illóolaj az élvezhetetlenségig megváltoztatta a pürék ízét. A mentaolaj viszont ebben a koncentrációban nem volt hatásos a modellszervezetként használt *S. cerevisiae* ellen. Lanciotti és mtsai (2004) összefoglaló munkájukban a citrusfélék illóolaját sikeresen alkalmazták minimálisan feldolgozott gyümölcskészítmények eltarthatóságának és élelmiszerbiztonságának emelésére. Narancs alapú, szén-dioxid -mentes, nem pasztörözött üdítőitalok eltarthatóságát a citrál, linalool és β -pinén megfelelő arányú kombinációja nagymértékben javította. Különösen jó eredményeket értek el az italok 55°C-on végzett hőkezelésével (Belletti és mtsai, 2010). Élesztővel beoltott almabor zavarosodását 0,2% gyömbér illóolaj sikeresen megállította (Liang, 2003). Le és Kyang (2006)

kovászos uborka fermentációja során fokhagyma illóolaj adásával megátolta a *Pichia (Hansenula) anomala* hártyaképzését a terméken.

3.6. Gyógynövény illóalkotók kinyerésének módjai

Extrakción egymással nem elegyedő fázisok közötti anyagátmeneten, megoszláson alapuló elválasztási módszerek összességét értjük (Pungor, 1978). Korábban a gyógynövénykutatásban csak a vegyülettípusok összhatóanyag-tartalmának meghatározása volt lehetséges, de a korszerű elválasztástechnikai módszerek, mindenekeelőtt a nagy elválasztóképességű gázkromatográfiás eljárások kifejlesztésével lehetőség nyílik – megfelelő mintaelőkészítés után – sokkomponensű elegyek alkotóinak elválasztására és kvantitatív meghatározására.

A mintaelőkészítés célja a meghatározandó vegyületeknek a vizsgálni nem kívánt komponensek alkotta mintamátrixtól való elválasztása és dúsítása. Hagyományos kémiai elválasztási módszereket (szilárd-folyadék extrakció, folyadék-folyadék-extrakció) alkalmazva, ez nagy mintamennyiséget (10-50 g) és hosszú időt igénylő lépése az analitikai folyamatnak.

3.6.1. Vízgőz-desztilláció

A szilárd minták illóolaj-összetételének meghatározásához legszélesebb körben alkalmazott extrakciós eljárás a vízgőz-desztilláció, melynek során az extrahálandó növény vizes szuszpenziójába nagy mennyiségű vízgőzt vezetve és a gőztér komponenseit kondenzáltatva a vizes fázis és az azzal nem elegyedő illóolajok könnyen szeparálhatók.

A vízgőz-desztillációt a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásai szerint Clevenger-készülékben végzik, amely egy 1 liter űrtartalmú

desztillálólombikból és a hozzá üvegcsiszolattal csatlakozó, vízhűtéses desztilláló feltétből áll.

Az egyszerűen végrehajtható és környezetbarát (szerves oldószer nem igénylő) módszer hátránya, hogy az illékony, terpén jellegű vegyületek a 100°C körüli hőmérsékleten, vízgőz jelenlétében könnyen hidrolizálnak. Ennek következtében a kondenzátum és a vizsgált növény illóolajának összetétele eltérhet egymástól.

Simándi és mtsai (1996) szerint az így kinyert illóolajok károsodhatnak, hidrolízis, oxidáció vagy polimerizáció következtében műtermékek keletkezhetnek, melynek eredményeképpen az olaj összetétele jelentősen megváltozhat, s ezek az anyagok hatásukat illetően kedvezőtlenek, több esetben toxikusak, allergének lehetnek. Ugyancsak e módszer hátrányaként említhető, hogy a kevésbé illékony komponensek (pl. szeszkviterpének) csak rossz hatásfokkal nyerhetők ki a szilárd mintából.

Pluhár és mtsai (1996) vizsgálatai is azt mutatják, hogy a vízgőz-desztilláció során – a hosszas forralás (2-3 óra), a nagy hőmérséklet és víz jelenléte miatt – a hőérzékeny illóolaj-komponensek károsodhatnak, átalakulhatnak, illetve lebomolhatnak. A desztillált illóolajokban nagyobb mennyiségben vannak jelen azok a monoterpének, amelyek a jellegzetes illat és aroma szempontjából kisebb jelentőségűek, illetve elfedhetik a természetes ízkaraktert.

3.6.2. Szerves oldószeres extrakció

A szerves oldószeres Soxhlet-extrakció mind az illékony, mind a kevésbé illékony komponensekre egyaránt jó extrakciós hatásfokot biztosít. Hátrányt jelent azonban a nagytisztaságú szerves oldószer igény okozta költség, a hosszú extrakciós idő (4-24 óra) következtében a kis produktivitás,

a szerves oldószermaradvány kérdése, valamint a környezet oldószerek általi szennyezése.

3.6.3. Szuperkritikus folyadék extrakció

A természetes eredetű anyagok kinyerésének egy alkalmazott módszere a szuperkritikus állapotú oldószerekkel végzett extrakció. Ez egy olyan kivonási módszer, amelynél normál állapotú folyadékok helyett szuperkritikus állapotú oldószereket (fluidumokat) használnak extrakciós oldószerként.

A fluidumok sűrűsége a folyadék sűrűségéhez, viszkozitásuk a kivonandó gáz viszkozitásához áll közel, míg diffúziós képességük a folyadék és a gáz diffúziós képessége között helyezkedik el. Ezen egyedülálló fizikai-kémiai sajátosságok ideális feltételeket biztosítanak ahhoz, hogy a kivonandó anyagokat nagy kinyerési százalékkal, rövid idő alatt állítsák elő (Petró és mtsai, 1991). Az alkalmazható gázok közül a legáltalánosabban használt szuperkritikus oldószer a szén-dioxid.

A kozmetika-, az élelmiszer- és gyógyszeripari termékek, valamint környezeti minták vizsgálatánál elterjedten használnak szuperkritikus extrakciót mintaelőkészítésre. Nagyüzemi elterjedése az 1980-as évekre tehető.

3.6.4. Gőztéranalízis

A gőztéranalízisnek két főbb típusa ismert, a statikus (SHSE) és a dinamikus (DHSE) gőztér-extrakció. Klasszikus SHSE módszer alkalmazásakor az előzetesen előkészített, általában kondenzált fázisú mintát szeptummal zárt, gázzáró fiolába helyezik. Ezt követően adott hőmérsékleten kondicionáltatják és az egyensúlyi gőznyomás beálltát követően, adott térfogatú mintát vesznek a fiola gőztéréből. Tehát az eljárás

a minta gőztérben található komponensek vizsgálatát jelenti. Zárt térben elhelyezett, illóanyagot tartalmazó mintából a hőmérséklet növelés hatására az aromakomponensek az oldatminta feletti gőztérbe párolognak parciális nyomásaiknak megfelelően. A gőztér gázzáró fecskendővel megmintázható, majd az így nyert minta gázkromatográfiás oszlopra vihető. Ezt az előzetes dúsítás nélküli technikát közvetlen gőztéranalízisnek nevezzük. Ennek a módszernek hátránya, hogy csak a nagyon illékony és nagy mennyiségben jelenlévő fő alkotók dúsulnak fel a gőztérben, érzékenysége korlátozott, valamint kevésbé illékony vegyületekre sem az ismételtetősége sem a visszanyerése nem megfelelő (Rowland és mtsai, 1995; Jerković és Marijanović, 2009). A statikus gőztéranalízis érzékenységbeli hátrányait a dinamikus gőztéranalízissel valamint a „purge and trap” technikával igyekeztek kiküszöbölni, melyek során vivőgázt (levegő, nitrogén) buborékoltatnak át a mintán, majd a gázzal kivont illókomponenseket egy szorbensen (pl. szilikagél) csapdázzák és ezt követően a már feldúsult mintakomponenseket juttatják a mérőberendezésbe. (Jerković és Marijanović, 2009). Ezen módszerek hátránya, hogy a vivőgáz szennyezői (pl. CH₄) is feldúsulhatnak, nagy alapzajt szolgáltatva ezzel a detektornak, továbbá komoly műszerezettséget igényelnek, drágák és bonyolultan kivitelezhetők.

3.6.5. Szilárdfázisú mikroextrakció (SPME)

Az SPME technika először az 1990-es években bukkant fel, mikor nyilvánvalóvá vált, hogy a mintaelőkészítés folyamata, beleértve a komponensek extrakcióját a mintamátrixból, a legidőigényesebb lépés a vegyületek kémiai analízise során (Pawliszyn, 2009; Tsai és mtsai, 2009). Kezdetben az SPME alapja egy polisziloxán filmmel bevont kvarcszál volt. A szál elhelyezkedése alapján beszélhetünk gőztér-analízisről, mikor a szál a

minta gőzterében helyezkedik el, vagy közvetlen, immerziós mintavételről, amikor a szál a mintamátrixba merül. A vizsgálandó komponensekhez így gyorsabban juthatnak hozzá és gyakran a reprodukálhatóság is sokkal jobb, mint más eljárások esetében (Günther és mtsai, 2011; Plutowska és Wardencki, 2007; Wilkes és mtsai, 2000). Mivel a szál a mintavétel során már koncentrálna a vizsgálandó vegyületeket, feleslegessé váltak a hagyományos, munkaigényes dúsítási eljárások (Risticovic és mtsai, 2010; Vidal és mtsai, 2009). A mintavételt követően a szál közvetlenül az analitikai mérőműszerbe helyezhető, mely leggyakrabban gázkromatográf-tömegspektrométer (GC-MS), vagy folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) berendezés. A mérőberendezésben a komponensek deszorbeálódnak a kvarcszálról és az adott műszerrel detektálhatók.

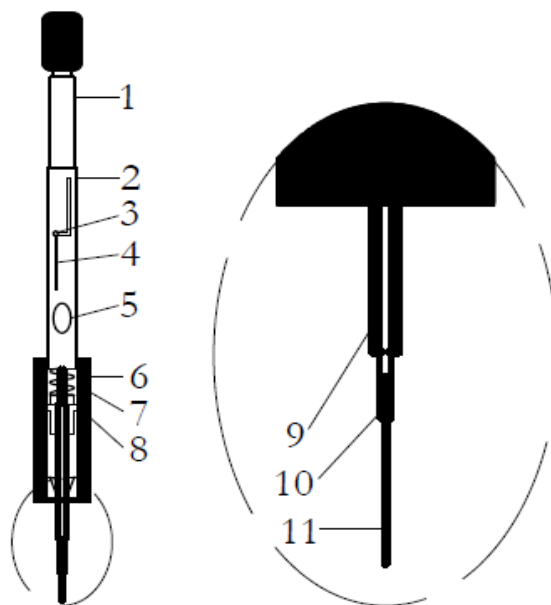
A különböző fázisok megoszlása kulcsfontosságú eleme az SPME technikának (Pawliszyn, 2009). Bármely vegyületről és alkalmazási módról legyen is szó, mindig fennáll egy kémiai egyensúly, amely a megoszlási hányadossal jellemezhető, ez a megoszlási állandó (K_{fs}), mely az SPME szál (szilárd fázis) és a minta gőztere (gáz fázis), vagy a mintaoldat (folyadék fázis) között alakul ki. Az SPME szálnak kisebb a térfogata (hővezetőleg 0,5 μL), mint a mérendő fázisé (több mL is lehet), ezért az egyensúly az egyes fázisok között általában gyorsan beáll (Prieto és mtsai, 2010).

A Pawliszyn és munkatársai által kifejlesztett SPME módszert széles körben alkalmazzák illékony és fél-illékony szerves vegyületek elemzésére (Arthur és Pawliszyn, 1990; Zhang és mtsai, 1994), illékony szennyező anyagok vizsgálatára élelmiszerekben és vizekben (Lipinski, 2000), valamint élelmiszerek aromakomponenseinek elemzésére. Ez az egyszerű és oldószermentes módszer eredményesen alkalmazható gőztérből történő

mintavételre, amelyekről az utóbbi években számos közlemény látott napvilágot (Bicchi és mtsai, 2000; Coleman és Lawson, 1998; Field és mtsai, 1996; Miller és mtsai, 1996; Miller és Stuart, 1999; Zhang és Pawliszyn, 1993a, 1993b). Ugyancsak jól alkalmazható lipidek autooxidációs bomlása során keletkező, illékony aldehidek vizsgálatára (Győrök és mtsai, 1998), ezzel számos információt szolgáltatva az élelmiszerek avasodását, minőségi romlását előidéző autooxidációs folyamatok tanulmányozásához.

A mintavétel során megoszlási egyensúly jön létre a mintamátrix és a folyadék polimer film bevonatú állófázist tartalmazó kvarcszál között. Az egyensúlyi állapotban az SPME szálba extrahálódott komponensek mennyiségére a következő összefüggés írható fel: $m_x = K_{fs} V_f C_i$, ahol, m_x a szálon extrahálódott komponensek mennyisége, K_{fs} a megoszlási állandó a szál és a minta között, V_f a szál térfogata C_i az extrahálódó komponensek kezdeti koncentrációja (Balasubramanian és Panigrahi, 2011; Pawliszyn, 2009). Ez az összefüggés csak akkor érvényes, ha a minta térfogata (V_s) lényegesen nagyobb, mint az SPME szál térfogata, pl. $V_s \gg K_{fs} V_f$ (Heaven és Nash, 2012).

Ha megegyező térfogatú SPME szálát alkalmaznak, kijelenthető, hogy m_x egyenesen arányos C_i -vel. A kezdeti kalibrációt követően, melynek során kalibrálják a szálát a mintavételi körülményekre és az extrakciós időre, rutinná válik a cél komponensek meghatározása a mintamátrixból (Pawliszyn, 2009). Mivel a készülék hordozható és könnyen használható, az eljárást gyors módszerként vagy GC-MS mintaelőkészítésként alkalmazzák. Az SPME készülék és a szál felépítését az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra SPME készülék és szál felépítése

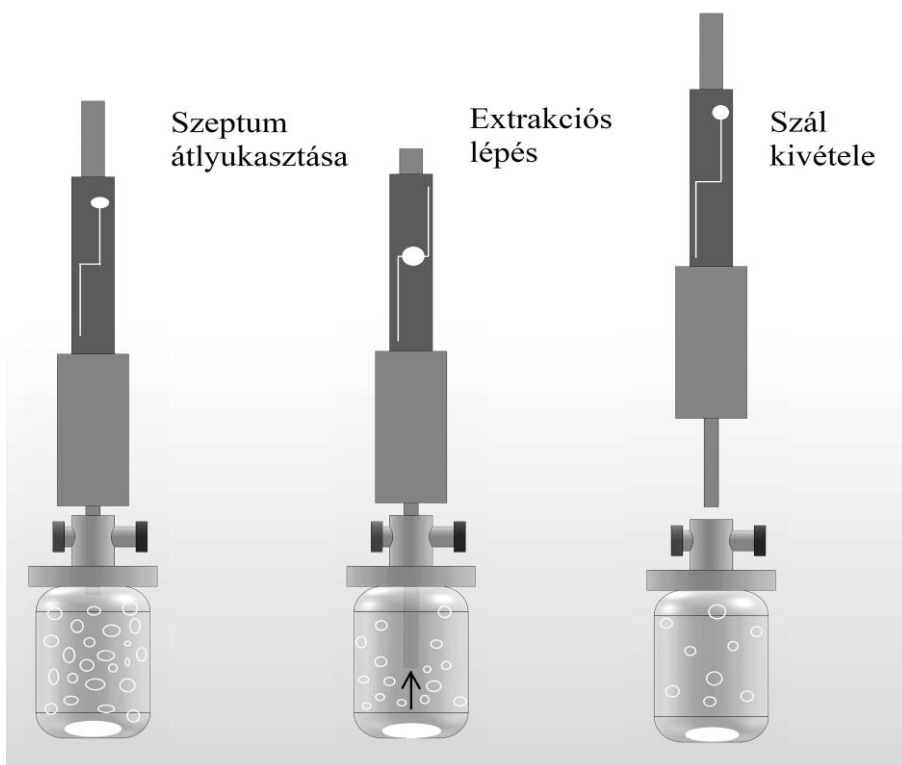
1) dugattyú; 2) tok; 3) dugattyú rögzítő csavar; 4) z-vágot; 5) szál típusát jelző színes ablak; 6) tű hosszát szabályozó egység; 7) feszítőrugó; 8) tömítő szeptum; 9) szeptum lyukasztó tű; 10) szál rögzítés; 11) kvarcszál bevonattal

A vizsgálat során az SPME szálát a mintamátrix gőzterébe viszik, ahol a gőztér komponenseinek egy része a megoszlás következtében oldódik, és nagymértékben feldúsul a polimer filmben. Az egyensúly eléréséhez szükséges idő függ a komponensek megoszlási állandójától és az állófázis vastagságától. A szelektivitás növelhető az állófázis anyagának és vastagságának megfelelő megválasztásával.

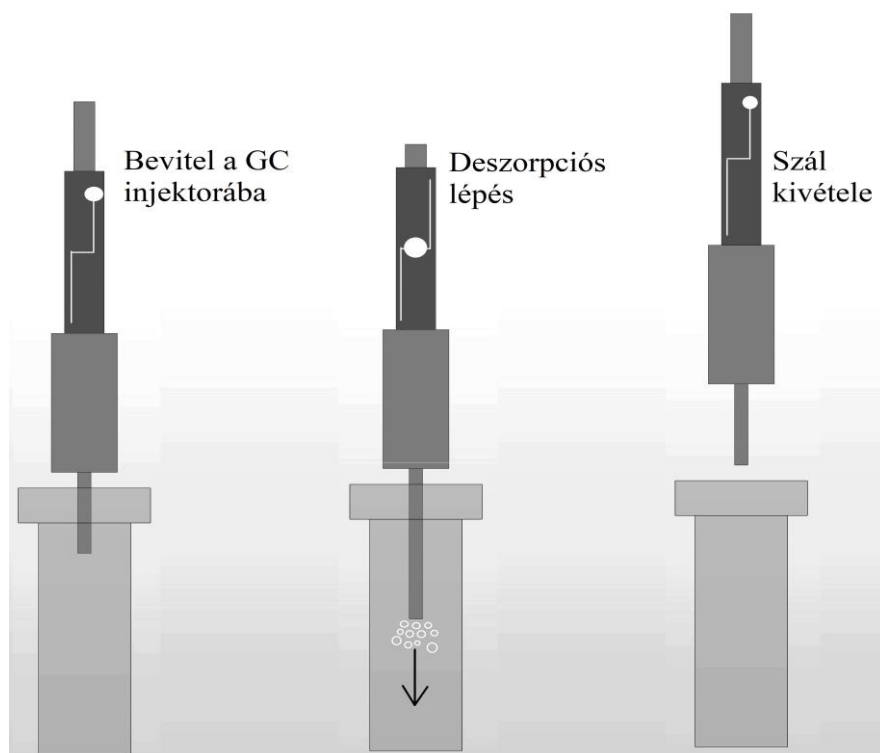
Az extrakciót követően a szálát a mérőműszer injektorába juttatják és ott nagy hőmérsékleten, a megoszlási hányados nagymértékű csökkenése következtében az oldott komponensek a szálát elhagyva a vivőgázzal a kolonnára jutnak. Mivel oldószert nem injektálnak és a komponensek

gyorsan deszorbeálódnak a kromatográfias oszlopra, rövid, szűk belső átmérőjű kolonnákat kell alkalmazni. Ez jelentősen lerövidíti az elemzési időt, nagymértékben csökkenti a kimutatási határt, ugyanakkor megfelelő felbontást biztosít (Mindrup és Shirey, 2012).

Az SPME mintavételi és injektálási folyamatot a **2. és 3. ábrák** szemléltetik. Az SPME egyszerű és oldószermentes mintavételi módszer, amellyel a komponensek feldúsulása folytán az érzékenység nagyfokú növelése érhető el.



2. ábra Minta extrakciós folyamat lépései



3. ábra Mintaveveteli deszorpciós folyamat lépései

3.6.5.1. SPME szál kialakítása

A hengeres kialakítású kvarcszál egy rozsdamentes acél csőhöz csatlakozik, mely tartást biztosít a mintavételezések során. Ez a rozsdamentes acél csővezet egy speciálisan kialakított fecskendőszerű szerkezethez kapcsolódik, tehát az SPME szál elhelyezkedhet a tokon kívül, de vissza is lehet bele húzni, amennyiben szükséges.

A kvarcszál egy vékony filmréteggel van bevonva, mely 7-100 μm vastagságú és polimer állófázisként funkcionál. A szálak többször felhasználhatók és cserélhetők.

A kis méretnek és a hengeres kialakításnak több előnye is van, ezek közül a legfőbb, hogy a szál könnyen a mintába, vagy a minta gőzterébe helyezhető mintavételezés céljából. Ezt követően könnyen GC, vagy HPLC mintabeviteli egységébe vihetik, ahol végbemegy a deszorpció.

A reprodukálható mintabevitel érdekében a dugattyú mozgását, a mintavételi időt és az injektálási időt kontrollálni kell a mintakomponensek adszorpciója és deszorpciója során. A helytelen szabályozás következtében értékes mintakomponensek veszhetnek el. Ennek megelőzése érdekében az SPME szál kimeneti nyílása egy tömítő szeptummal van ellátva, de bizonyos mértékben a szál hűtése is akadályozza a mintakomponensek elvesztését (Balasubramanian és Panigrahi, 2011).

3.6.5.2. SPME szál anyaga

Az SPME módszer nagy előnye a szál bevonatának változatos kialakítása. Kereskedelmi forgalomban elérhetők a dimetil-polisziloxán (PDMS), karbowax (CW) és poliakrilát (PA) szálak, ezek különböző bevonatot kapnak a vizsgálni kívánt komponens tulajdonságainak megfelelően (Ho és mtsai, 2011). Az SPME bevonatok folyamatos fejlesztése új felhasználási területeket tár fel és lehetőséget nyújt bizonyos mértékben az extrakció specifikussá tételére (Zhang és mtsai, 1996).

A különböző anyagú szálak széles polaritás skálán kínálnak lehetőséget az illékony és nem illékony komponensek extrahálására. A kombinált anyagú szálak mindig szélesebb skálán biztosítanak extrahálási lehetőségeket, mintha önállóan alkalmaznák az egyes anyagokat (Stashenko és Martínez, 2007).

Az első SPME szál anyagának a PDMS-t használták (Pawliszyn, 2009; Risticvic és mtsai, 2010). Ahogy a neve is mutatja ez az anyag a

sziloxán polimerje és legelterjedtebben a száloptikák gyártásakor használják. A PDMS apoláros, ebből következik, hogy hatékonyan alkalmazható apoláros vegyületek mintavételezésére. A PDMS szálat elterjedten alkalmazzák gőztéranalízis (HS-SPME) során. A közvetlen bemerítéses (DI-SPME) eljárás esetében kizárólag akkor alkalmazzák, ha víz a mintamátrix. Ugyanis ez a száltípus a szerves oldószerek hatására könnyen degradálódik és deformálódik. A PDMS SPME szálak alkalmazhatók alkoholok, észterek, aldehidek és terpének analízisére és gyakran használják más száltípusok bevonataként is.

A PA SPME szálak szerves polimerekből épülnek fel, melyeket akrilsav-monomerekkel módosítanak, így ezek a szálak egyaránt jól használhatók poláros, valamint apoláros vegyületek mintavételezésére (Mestres és mtsai, 1998), mivel sokkal ellenállóbbak a szerves oldószerekkel szemben, mint a PDMS szálak (Pawliszyn, 2009). A PA SPME szálak kevésbé deformálódnak vízben, de ha a vizes mintaoldatba vízoldható szerves oldószer kerül, akkor az a szál túlzott deformálódásához és degradálódásához vezet. A vízben történő deformálódás magyarázatot ad arra, hogy a PA SPME szálak alkalmazása miért nem terjedt el tejek, borok, zöldségek és gyümölcsök mintavételezésekor (Filho és mtsai, 2010).

Az utóbbi időben az SPME szálak anyagaként elterjedtek a divinil benzol (DVB), a carboxén (CAR) és a carbowax (CW) anyagok. Annak ellenére, hogy a szálak különböző kémiai anyagokból épülnek fel, mind a DVB, mind a CAR különböző átmérőjű pórusokkal rendelkeznek, melyekben megkötik a mintakomponenseket. Ezek méret szerint lehetnek makropórusok (> 50 nm), mezopórusok (2-50 nm) és mikropórusok (< 2 nm).

A legelterjedtebb szálak a PDMS polimer szálak, melyekhez DVB és CAR részecskéket csatolnak (Pawliszyn, 2009). A PDMS polimer kötőanyagként viselkedik és a részecskéket a szálhoz köti. A PDMS önmagában is elegendő pórusal rendelkezik a mintakomponensek megkötéséhez, de a három anyag kombinálásából egy tripla fázissal rendelkező DVB-CAR-PDMS szál hozható létre, melynek alkalmazása széles körben elterjedt.

A DVB részecskék polimerizált alkil láncokból tevődnek össze, melyekhez fenil csoportokat kapcsolnak. A DVB részecskéket a polimerizációt követően rendkívül nagy mezoporozitás jellemzi (Pawliszyn, 2009). Ez a porozitás kihasználható az illékony és félig-illékony vegyületek analízisekor. A DVB-PDMS szálak polaritása a PDMS és a PA szálak polaritása közé esik (Aguinaga és mtsai, 2007).

A CAR részecskéket szénalapú, hálós szerkezet építi fel, ennek a molekularácsnak speciális pórusátmérője van, így a CAR szelektíven képes elválasztani vegyületeket, bele értve azokat is, melyek speciális – jellemzően 35 - 150 g/mol – molekulatömegűek (Pawliszyn, 2009). A DVB anyagával összehasonlítva, a CAR molekularács pórusai általában alagút formában jelennek meg a részecskék között és ez a struktúra megkönnyíti a célkomponensek megkötését azokkal a struktúrákkal szemben, ahol egyetlen pórus van. A CAR bázisú szálak szélesebb skálán alkalmasak a változatos molekulatömegű vegyületek extrahálására, mint a DVB bázisú társaik.

A CW szálak DVB és polipropilén glikol keverékéből állnak és a PA SPME szálak alternatívái, de alkalmazásuk előnyösebb kis forrpontú alkoholok meghatározásakor (Supelco, 2011).

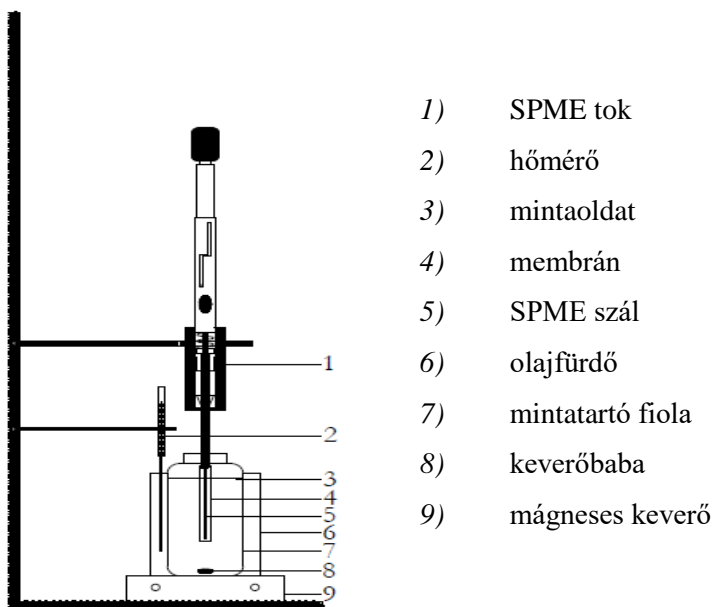
3.6.5.3. SPME módszer típusai

Az SPME mintavétel általánosságban véve három különböző módon történhet. A legelterjedtebb módja az ún. „headspace”, azaz gőztér SPME (HS-SPME) mintavétel, ahol a szilárdfázisú mikroextrakciós szálát a mintamátrix zárt gőzterébe helyezik (Pawliszyn, 2009). A gőztéranalízises SPME eljárás során két lépésben kell egyensúlyi állapotot létrehozni. Első lépésben a mintamátrix és a gőz fázis alkotói között, majd ezt követően a gőztér és a mintavételi szálba oldódott komponensek között kell beállni az egyensúlynak. Ez az extrakciós mód védi a szálát a különböző káros hatásoktól, mint például a nem illékony, vagy nagy molekulatömegű anyagokkal való érintkezés. A HS-SPME módszer másik előnye, hogy lehetővé teszi a mintamátrix módosítását, pl. a pH korrigálásával.

A második legelterjedtebb SPME módszer a közvetlen bemerítéses (DI-SPME) eljárás, ahol a szálát közvetlenül a mintaoldatba merítik (Ventanas és Ruiz, 2006). Bár néhány komplex mintamátrix, mint például a tej, negatív hatással vannak az SPME szálra, számos, kis szervesanyag-tartalmú minta esetében alkalmazható a DI-SPME módszer (Abilleira és mtsai, 2010; Lubbers és Butler, 2010; Ochiai és mtsai, 2005). Folyadék minták esetén a diffúziós határreteg csökkenését eredményező kevertetéssel nagymértékben megnövelhető az extrakció sebessége. Gáz halmazállapotú minta esetén a gázok nagyobb diffúzivitása miatt, a természetes gázáram elegendő ahhoz, hogy viszonylag gyorsan kialakuljon a fázisok közötti egyensúlyi állapot. Az SPME szál eltömődése a DI-SPME mintavétel során csökkenti az eredmények ismételhetőségét, köszönhetően a mintamátrixban jelen lévő nagy molekulatömegű komponenseknek, melyek a szálra tapadhatnak, vagy meggátolhatják a kisebb komponensek megkötődését. Az SPME szál eltömődése csökkenthető egyes mátrix komponensek

eltávolításával, mint pl. tejszír elszappanosításával (Wang és mtsai, 2006; Wilkes és mtsai, 2000), a minta oldatba vitelével (Farajzadeh és mtsai, 2010), a pH beállításával (Innocente és mtsai, 2011; Ridgway és mtsai, 2007), vagy a minta sótartalmának növelésével (Balasubramanian és Panigrahi, 2011; Feng és mtsai, 2005; Pillonel és mtsai, 2002; Sun és mtsai, 2010; Tsai és mtsai, 2009).

Egy másik lehetőség a DI-SPME módszer alkalmazására, mikor az extrakciót egy szelektív membrán beiktatásával végzik (**4. ábra**), mely átengedi a vizsgálni kívánt komponenseket és ezzel egy időben távol tartja a nemkívánatos mintakomponenseket (Pawliszyn, 2009).



4. ábra DI-SPME módszer szelektív membrán alkalmazásával

Ezt az extrakciós módot leggyakrabban szennyezett minták analizésére alkalmazzák, ahol szükséges a nagy molekulatömegű komponensek extrakciójának gátlása, mivel azok a membrán eltömődését

okozhatják (Basheer és Lee, 2004). A membrán megváltoztatja az egyensúlyi állapotát minden extrahálódó komponensnek, míg maga a membrán el nem tömődik, ezzel csökkentve a reprodukálhatóságot (Heaven és Nash, 2012).

Összehasonlítva a HS-SPME és a DI-SPME módszerekkel a membrán extrakciós eljárás lényegesen lassabban megy végbe, mivel a vizsgálandó komponenseknek át kell jutniuk a membránon. Vékony membrán és nagy hőmérséklet alkalmazásával az extrakciós idő ebben az esetben is csökkenthető. A hasonlóság a gőztéranalízis és a membrán extrakció között, hogy mindkét módszerrel elkerülhető a nagy molekulatömegű komponensek szálra gyakorolt negatív hatása. A membrán extrakció előnye a gőztéranalízissel szemben, hogy ezzel a módszerrel a nagyon kis mennyiségben jelen lévő mintakomponensek is detektálhatók (Balasubramanian és Panigrahi, 2011).

A gőztéranalízisen alapuló extrakciós eljárás rendkívül gyors. Az extrakció kinetikája a gőz és folyadék fázis közötti komponens megoszláson alapul, amelyet a Henry-törvény ír le (Atkins, 2002). Ha egy adott komponensre kapott Henry-állandó nagy, akkor az adott komponens koncentrációja a gőztérben szintén nagy. Ezek alapján folyékony mintamátrix esetében, az illékony és apoláros vegyületek extrakciója gyorsabban végbemegy, mint a félig-illékony vagy poláris vegyületeké. A nagyobb hőmérsékleten gyorsabban beáll az egyensúly a gőz fázisban, ebből következik, hogy a hőmérséklet emelésével és intenzív kevertetéssel csökkenthető az extrakciós idő. Utóbbi eljárás HS-SPME esetében hatékonyabb, mint a DI-SPME módszernél (Balasubramanian és Panigrahi, 2011).

3.6.5.4. SPME módszer alkalmazási területei

Az SPME módszert kiterjedten alkalmazzák kis mennyiségű szerves komponensek vizsgálatára élelmiszerekben (Balasubramanian és Panigrahi, 2011; Kataoka és mtsai, 2000) bele értve természetes eredetű aromakomponensek meghatározását (Stashenko és Martínez, 2007), gyógyszerek, metabolitok, szennyező anyagok valamint betegséget jelző biomarkerek kimutatására (Kataoka és Saito, 2011), a termékekben lévő növényvédőszeres bomlásának vizsgálatára (Picó és Kozmutza, 2007; Soler és mtsai, 2008; Vidal és mtsai, 2009) és szerves szennyezőanyagok vizsgálatára komplex környezeti mátrixokban (Lambropoulou és mtsai, 2007).

3.7. Az élelmiszer, mint SPME mátrix

Az illókomponensek vizsgálatát meghatározza az aktív aromakomponensek mennyisége és természete, mely élelmiszerminták esetében még bonyolultabb a fellépő mátrixhatásnak köszönhetően. Az elemzés sikeressége főként attól függ, hogy a gyakran elenyésző mennyiségben jelen lévő illókomponensek hogyan reagálnak a különböző élelmiszer alkotókkal, pl. zsírokkal, szénhidrátokkal.

Az élelmiszerek aromakomponenseinek kioldódását a megoszlási kölcsönhatás befolyásolja, mely az élelmiszer mátrix és a gőz fázis között alakul ki és függ az illókomponensek és a mintakomponensek fizikokémiai tulajdonságaitól. Az illóvegyületek és mintakomponensek között fellépő kölcsönhatások ismerete nem csak a kimutatás sikerességét befolyásolja, hanem kritikus tényező a különféle módszerfejlesztések során is (Roberts and Taylor, 1999; Guichard, 2002; Naknean and Meenune, 2010; Afoakwa és mtsai, 2009; Arancibia és mtsai, 2011; Merabtine és mtsai, 2010).

Az élelmiszerminták illókomponensei között számos kölcsönhatás figyelhető meg. A molekulákon belüli kölcsönhatásokra nagy kötési energiával bíró irreverzibilis kovalens kötések jellemzők. Előbbieknél egy nagyságrenddel kisebb energiájú reverzibilis kötések, ún. hidrogénkötések találhatók a proton donor és proton akceptor tulajdonságú csoportokat tartalmazó molekulák között. Ilyen vegyületek többek között a ketonok, az aldehidek valamint az alkoholok és természetesen a víz is, ide tartoznak a nitrogén heteroatomot tartalmazó különböző aminok, pl. a fehérjék is. Az apoláris tulajdonságú vegyületek között a H-kötésnél is kisebb energiájú hidrofób tulajdonságú reverzibilis kölcsönhatások alakulnak ki, mint például a Van der Waals kötés. Továbbá beszélhetünk még fizikai kötésről is, mely a zárvány komplexekben jön létre az illókomponensek és a keményítő, vagy keményítőszármazékok között (McGorin, 1996; Solms és mtsai, 1973; Le Thanh és mtsai, 1992). McGorin (1996) ezzel egy időben a kölcsönhatások jellege szerint osztályozta az illókomponensek és a mátrix közötti kölcsönhatásokat, ezek lehetnek oldódás, adszorpció, abszorpció és retenció.

3.6.6. Élelmiszermátrix-illókomponens kölcsönhatások

Az illókomponensek elegyednek az élelmiszermátrixot alkotó apoláris olajos fázisokkal, azonban az élelmiszerekben ugyancsak megtalálható víz, a vízgőz-desztilláció elve alapján elősegíti az illókomponensek gőzfázisba jutását. Ez magyarázza azt a megfigyelést, hogy az illékony vegyületek sokkal könnyebben detektálhatók a mintamátrix gőz fázisából, mint közvetlenül a mintából. Bakker (1995) szerint a kondenzált fázisban lévő mono- és diszacharidok általában megnövelik az illékony vegyületek gőznyomását, míg Le Thanh (1992) tapasztalata szerint a poliszacharidok legtöbbször csökkentik az aromakomponensek illékonyosságát. A hidrokolloidok szerepe az illékony vegyületek kinyerésében

attól függ, hogy milyenek a mintamátrixra ható fizikai hatások, vagy az illókomponensek milyen kölcsönhatásban állnak a minta gél komponenseivel (Afoakwa és mtsai, 2009). A felvázolt mátrix-illókomponens kölcsönhatások okozzák a legnagyobb nehézséget a módszerfejlesztések során, ugyanez figyelhető meg a mennyiségi meghatározások során, ahol rendkívüli figyelmet kell fordítani a kalibrációra.

3.6.7. SPME az élelmiszer analízisben

A SPME folyamata során a meghatározandó komponensek a mintamátrixból, amely lehet gőz, vagy kondenzált fázisú, a folyadékfilmmel bevont kvarcszálba kerülnek. A szál már rozsdamentes acél változatban is elérhető, így az SPME hamar az egyik leggyakrabban használt technikává vált az analitikai kémia egyes területein, főleg a környezeti analitikában, élelmiszer és aroma vizsgálatok, valamint klinikai és toxikológiai kutatások során. Ha sorra vesszük azokat az élelmiszereket, melyek analíziséhez SPME módszert használtak, akkor a legnagyobb csoport a borok, majd ezt követik a zöldségek/gyümölcsök, tejtermékek, párlatok, húsok, fűszerek és gyógynövények, magvak és pékáruk, snackek, zsírok és olajok, tengergyümölcsei és halak, valamint a méz. Az SPME az egyik leggyorsabban fejlődő extrakciós technika, mely számos előnyéből következik. Az első az egyszerűsége. Könnyen automatizálható és az SPME modul könnyen beépíthető minden típusú gázkromatográf automata mintaadagolójába. Automatizált változata mellett létezik manuális elrendezés, mely olcsóbb és újrahasznosítható befogó résszel, ún. „holderrel” ellátott, melyben cserélhető a szál. Az SPME mintavétel ezért más technikákkal ellentétben elvégezhető manuálisan is, mely nagy reprodukálhatóságot biztosít és nem sokban tér el az automatizált változattól.

A módszer másik nagy előnyét a szál anyagának változatossága jelenti, ami megnöveli a mintavétel szelektivitását (Ho és mtsai, 2011).

Élelmiszer illókomponens vizsgálatok szempontjából számos felhasználási lehetőséget biztosítanak az SPME módszer alkalmazások. Alkalmask aroma és illókomponensek mennyiségét és minőségét összehasonlító tanulmányok elvégzésére különböző zöldségek és gyümölcsök esetében, mint a sárgabarack (Guillot és mtsai, 2006), narancslé (Dharmawan és mtsai, 2007), paprika (Sousa és mtsai, 2006), különböző országokból származó olívaolajok (Baccouri és mtsai, 2008), mandarinlé és klementinlé (Barboni és mtsai, 2009), valamint málna fajták (Aprea és mtsai, 2009).

Felhasználhatók különböző élelmiszerek aromaprofiljának feltérképezése, mint a sör (Pinho és mtsai, 2006), golgotavirág gyümölcs, kesudió, tamarindusz-fa gyümölcse, acerola, gujávafa gyümölcse (Carasek és Pawliszyn, 2006), citrus méz (Alissandrakis és mtsai, 2007), kapribogyók (Romeo és mtsai, 2007), borsok (Cardeal és mtsai, 2006), különböző sózott-szárított sonkák (Luna és mtsai, 2006), kávék (Mancha Agresti és mtsai, 2008), görögdinnyék (Beaulieu és Lea, 2006), különböző mértékben fermentált teák (Wang és mtsai, 2008b), kenyerek (Poinot és mtsai, 2007), kakaók (Ducki és mtsai, 2008), sózott-füstölt bacon szalonna (Yu és mtsai, 2008), isztriai sonkák (Marušić és mtsai, 2011) és borok származásának vizsgálatára (Green és mtsai, 2011).

Alkalmask továbbá élelmiszerek osztályozására SPME és GC alkalmazásával, vagy az illókomponensek közvetlen bevitelére MS alapú elektronikus orrba Madeira borok (Camara és mtsai, 2006) esetében, valamint olajok minőségének és hitelességének megállapítására (Jeleń és mtsai, 2007; Mildner-Szkudlarz és Jeleń, 2008). Az illókomponensek

aromaprofilja felhasználható az eredetiség, hitelesség kimutatására is (Cajka és Hajslova, 2012). Felhasználhatók olyan kiválasztott komponensek elemzésére melyek fontosak az élelmiszerminőség szempontjából, például borok kellemetlen aromái (Boutou és Chatonnet, 2007), tölgyből a borba extrahálódó komponensek (Carrillo és mtsai, 2006), olívaolaj oxidációjából származó illékony vegyületek (Kalua és mtsai, 2006) detektálására. Alkalmas 2-metil-3-furantiol és 3-merkaptofenil-acetát vizsgálatára borokból (Mateo-Vivaracho és mtsai, 2006), sör aromastabilitását befolyásoló komponensek elemzésére, karbonil-gyökök vizsgálatára sörben (Saison és mtsai, 2008; Saison és mtsai, 2009), halhús oxidációja során keletkező vegyületek analízisére (Iglesias és Medina, 2008) és olívaolaj illófenol tartalmának meghatározására (Vichi és mtsai, 2008).

Alkalmazhatók technológiai folyamatok élelmiszerek aromakomponenseire gyakorolt hatásának vizsgálatára. Oregano kapszulák, citromfű és majoranna aromáinak azonosítására (Baranauskienė és mtsai, 2006), fermentálás hatásának vizsgálatára kolbászokból (Marco és mtsai, 2006), esszenciális olajok hatásának vizsgálatára májpestétomból, lipidek oxidációjából származó aldehidek mérései alapján (Estevez és mtsai, 2007), a Jali körte tárolása során fellépő aromaváltozások vizsgálatára (Chen és mtsai, 2006), különböző szárítási módokkal előállított banán por vizsgálatára (Wang és mtsai, 2007), fehérje izolátumok és koncentrátumok összetételének és tárolásának vizsgálatára (Wright és mtsai, 2009), élesztőtörzsek hatására termelődött kénvegyületek vizsgálatára (Mendes-Ferreira és mtsai, 2009), lágy sajtok érésének vizsgálatára (Delgado és mtsai, 2010), és nyers kecsketejből készült sajtok aroma komponenseinek vizsgálatára (Delgado és mtsai, 2011).

Használhatók kémiai, biokémiai és biotechnológiai folyamatok ellenőrzésére, mint pl. terpének biotranszformációja (Bicas és mtsai, 2008) és aromaanyagok romlása (Cho és Buescher, 2011).

A SPME alkalmazható gázkromatográf-olfaktométerrel (GC-O), abban az esetben, amikor az SPME szálról deszorbeálódott alkotók hasznos információval szolgálhatnak az illókomponensek feltérképezésében. Ilyen vizsgálatokat végeztek sárgabarack (Guillot és mtsai, 2006), almabor (Xu és mtsai, 2007), mesterséges marhahús aroma (Moon és mtsai, 2006), fermentált szárazkolbászok (Marco és mtsai, 2007) esetében, valamint aktív illókomponenseket is ezzel a kapcsolt rendszerrel vizsgáltak szőlőben (Sun és mtsai, 2011).

3.6.8. Tejtermékekből SPME módszerrel detektálható főbb vegyületcsoportok

A tejtermékek aromakomponenseinek analízise összetett problémát jelent a mintamátrix komplexitása és a leggyakrabban alkalmazott mintaelőkészítési eljárások bonyolultsága miatt, mint a vákuumdesztilláció és a folyadék-folyadék extrakció (De Frutos és mtsai, 1991; Lubbers és mtsai, 1998; Mariaca és Bosset, 1997; Sides és mtsai, 2000).

Az extrakciós vizsgálatokat folyamatosan korszerűsítik, és új technikákat találnak fel annak érdekében, hogy csökkentsék az extrakció időtartamát, oldószer- és eszközigényét, továbbá növelhessék az érzékenységet, valamint biztosítsák a széles körű felhasználhatóságot (Panseri és mtsai, 2008).

Az SPME analízissel meghatározható kémiai vegyületcsoportok közreműködnek a termékek ízének és illatának kialakításában és indikátorként viselkednek amennyiben a termékben minőségbeli változás következik be, vagy kontaminálódik.

3.6.8.1. Terpénvegyületek

A terpének főleg növényi eredetű természetes vegyületek, nagyjából speciális anyagcsere termékek. Az illóolajok összetevői több mint 90%-ban terpénvegyületek (Csapó és Csapóné, 2003; Szőke, 2012). Az elnevezésüket először Kekulé használta 1880-ban, mikor is $C_{10}H_{16}$ összetevőket talált a terpentinben (Baser és Demirci, 2007). A terpének két, vagy több izoprénegység (C_5H_8) kondenzációjával létrejövő szerves vegyületek. Ezért gyakran csak izoprenoidoknak nevezik őket (Csapó és Csapóné, 2003). Csoportosíthatók a molekulát felépítő izoprénrészek száma és a funkciós csoportok típusa szerint. A legkisebbek terpének a hemiterpének (félterpének), ezek csupán egy izoprén egységből állnak (Baser és Buchbauer, 2010). Beszélhetünk még monoterpénekről ($C_{10}H_{16}$), szeszkviterpénekről ($C_{15}H_{24}$), diterpénekről ($C_{20}H_{32}$), triterpénekről ($C_{30}H_{48}$), tetraterpénekről ($C_{40}H_{64}$) és politerpénekről ($(C_5H_8)_n$, ahol $n > 8$). A terpének közé nem csak szénhidrogének tartoznak, hanem az ezekből levezethető éterek, alkoholok, ketonok, aldehidek, savak, észterek, epoxi és hidrogénezett származékok. A terpének lehetnek alifások és aliciklikusak. Az aliciklikus terpének a bennük található gyűrűk alapján lehetnek, mono-, bi-, tri-, stb. ciklusos terpének (Csapó és Csapóné, 2003; Szőke 2012).

A monoterpének könnyen illó és rendkívül markáns illatú vegyületek (Csapó és Csapóné, 2003). Növényi olajok egyik fő komponensei (Bakkali és mtsai, 2008). Többféle hatással rendelkezhetnek. Lehetnek rovarcsalogatók, rovarölők, antibakteriálisak és antifungálisak. A monoterpének prekuzora a geranil-pirofoszfát. Jó néhányuk biológiailag is aktív, bizonyítottan gyógyító hatású. Alkalmazhatók nyugtatóként (linanil-acetát), szélhajtóként (karvon), légúttisztítóként (eukaliptol) és köptetőként (timol). Jellegzetes illatuk miatt fontos szerepet töltenek be a kozmetikában

és az élelmiszeriparban is. Szerkezetük alapján megkülönböztetünk alifás mono- és biciklikusakat; egyszeresen (β -citronellol), kétszeresen (limonén), többszörösen telítetleneket, vagy aromásakat (timol). Ezen kívül lehetnek még: alkoholok, ketonok, aldehidek, észterek, éterek, vagy funkciós csoport nélküli szénhidrogének (Szőke, 2012). A monociklikus monoterpének alapváza a mentán (1-izopropil-4-metil-ciklohexán). Ebbe a csoportba tartozik a limonén, az α - és β -fellandré, a terpinének és a terpineol. A terpének között gyakran előfordul, hogy az egyes izomerek eltérő illatúak és aromájuk is különböző. A biciklikus monoterpének gyűrűs szénhidrogének származékai; ide sorolható az α - és β -pinén, az α -tuján és a szabinén. A biciklikus monoterpén ketonok nagyon jellegzetes aromahordozók Ilyen monoterpén a kámfor, a tujon és a fenkon (Csapó és Csapóné, 2003).

A szeszkviterpének három izoprén egységből felépülő, $C_{15}H_{24}$ összegképletű vegyületek. Minden szeszkviterpén prekuzora a farnezol. Nagy részük szintén növényi olaj alkotó, de kevésbé illékonyak. Jellemzően az Asteraceae családba tartozó növényekben fordulnak elő. Szerkezetük alapján lehetnek aciklikus és ciklikus szeszkviterpének, a ciklikusokon belül a gyűrűk számától függően: mono-, bi- és triciklikusak. Hasonlóan a monoterpénekhez, a szeszkviterpének lehetnek funkciós csoport nélküliek (szénhidrogének), vagy különböző funkciós csoporttal (alkohol, aldehid, keton, éter, észter, karboxil) rendelkezők (Csapó és Csapóné, 2003; Szőke, 2012).

3.6.8.2. Zsírsvak

A természetes zsiradékok hidrolízisével alifás monokarbonsavak keletkeznek, amelyek a szénlánc hossza, a kettős kötések száma és helye, valamint konfigurációja és a funkciós csoportok szerint csoportosíthatók (Csapó és Csapóné, 2003). A zsírsvak egy alkiláncból és egy ehhez

kapcsolódó karboxil funkciós csoportból tevődnek össze (Pereira és mtsai, 2011).

Az SPME technika a 4 és 12 szénatomszám közötti zsírsavakat képes hatékonyan detektálni (Alanis és mtsai, 2010; Cheong és mtsai, 2011; Larreta és mtsai, 2006; Marsili, 2000; Zhang és mtsai, 2011).

A zsírsavak, ezeken belül is a trigliceridek a tej fő energiaforrásai. A trigliceridek 3 zsírsav molekulából állnak, melyekhez kovalens kötéssel kapcsolódik egy glicerín molekula (Moate és mtsai, 2007). Fontos megjegyezni, hogy a savak gyakran prekursor vegyületei az élelmiszerekben megtalálható észtereknek, ketonoknak és aldehideknek (Olbricht és mtsai, 2011; Oliveira és mtsai, 2011; Xiao és mtsai, 2010).

A módszer komplexitásának növekedésével észrevették, hogy a minták származékképzésével (derivatizálásával) a poláris SPME szállal történő mintavételkor csökken a zsírsav csúcsok lecsengése a nem származékolt mintákból kapott zsírsav csúcsokéhoz képest (Mills és Walker, 2000).

A zsírsavak a mikrobiológiai aktivitás biomarkerei. A kisebb molekulatömegű zsírsavak (6-os szénatomszámig) a laktóz bakteriális bomlásakor és aminosavak átalakulásakor keletkeznek (Alves és mtsai, 2010; Vítová és mtsai, 2011).

A zsírsavak jelentős mértékben hozzájárulnak a sajtok illékony aromáinak kialakításához (Delgado és mtsai, 2010; Wolf és mtsai, 2010). Hosszú láncú, 12 szénatomos zsírsavakat detektáltak HS-SPME módszerrel sajtokból (Bergamini és mtsai, 2010) és savófehérjékből (Leksrisompong és mtsai, 2010).

Az SPME analízis használható különböző élelmiszerek zsírsav-profiljának meghatározására is. A zsírsavak relatív koncentrációjával

jellemezhetőek a sajtok és a joghurtok (Ampuero és Bosset, 2003; Erkaya és Şengül, 2011). A svájci sajt jellemzéséhez elegendő csupán 4 zsírsav mennyiségének ismerete (Ampuero és Bosset, 2003).

Más tanulmányok alapján elmondható, hogy a zsírsavak alkalmazhatók a kecskesajt és a tehéntejből készült sajt megkülönböztetésére a kecskesajt jellegzetes ízét és illatát adó hexánsav azonosításával (Mondello és mtsai, 2005; Serhan és mtsai, 2011). Továbbá annak megállapítására, hogy a zsírszegény sajtokban a domináns aromát a 4-8 szénatomszámú zsírsavak és az ecetsav adják (Cais-Sokolińska és Majcher, 2010) ezen felül alkalmasak még a sajthamisítások kimutatására is (Majcher és mtsai, 2010). Zhang és mtsai (2011) DVB-CAR-PDMS szálát alkalmazva vizsgálták a tejek eltarthatóságát azok tárolása során keletkező szabad zsírsavak koncentrációjának meghatározásával.

3.6.8.3. Aldehidek és ketonok

Az aldehidek és a ketonok egy karbonil csoportból épülnek fel, melyhez aldehidek esetében egy alkilánc és egy hidrogénatom, míg ketonok esetében két alkilánc kapcsolódik (Gioacchini és mtsai, 2010).

Az aldehidek általános szerkezete $R-CHO$. A legreaktívabb vegyületek közé tartoznak, amelyek primer alkoholokból keletkeznek enyhe oxidációval. Tovább oxidálva ezeket, karbonsavakat kapunk. Az aldehidek jellemző reakciója az addíció, a polimerizáció és a kondenzáció. Az élelmiszerekben az aldehidek az aminosavak bioszintézise során, az aminosavak enzimes dezaminálásánál, vagy transzaminálásánál, az aminosavak és a karbonilszármazékok közti reakció során, a telítetlen zsírsavak autooxidációjánál, a linol- és linolénsav enzimes lebontásánál és a karotinoidok átalakulása során képződhetnek. Jellemző illatuk révén a különböző élelmiszerek aromaanyagainak összetevői is részt vesznek az

élelmiszerek nem enzimes barnulási folyamataiban. A ketonokban a szénlánc egyik szénatomjához kettős kötással egy oxigén atom kapcsolódik létrehozva az ún. karbonil (C=O) csoportot. Reakcióik hasonlítanak az aldehidekéhez, de azoknál nehezebben oxidálhatók, aminek során láncszakadás következik be. Többségük jellegzetes, de nem kellemetlen illatú vegyület (Csapó és Csapóné, 2003).

Az aldehidek és ketonok jelenléte az élelmiszerekben általában zsírsav oxidációra, aminosav oxidációra, vagy bakteriális tevékenységből származó metabolitok képződésére utal (Gioacchini és mtsai, 2010), de a gyártás során is hozzáadhatják ezeket a termékekhez (Wang és mtsai, 2010).

Egyes aldehideket és ketonokat felhasználnak az élelmiszerek minőségi mutatóinak megállapítására. A 2,3-bután-diont (diacetilt) a vaj minőségének ellenőrzésére használják (Chen és mtsai, 2010) és alkalmas a joghurtok érettségi fokának jelzésére is (Erkaya és Şengül, 2011). A 3-hidroxi-butanon olyan keton melynek segítségével megállapítható a sajtok érettségi foka (Barba és mtsai, 2010).

A metil-ketonok olyan vegyületek melyekben az alkillánc végétől nézve a második szénatomon egy karbonil funkciós csoport helyezkedik el. Ezek a vegyületek SPME technikával gyakran vizsgált élelmiszeralkotók. A metil-ketonok mikrobiológiai aktivitás hatására keletkezhetnek egyes sajtokban (Majcher és mtsai, 2010; Wolf és mtsai, 2010). A 2-nonanon a legtöbb sajtban és a savófehérjében gyakran előforduló vegyület, melyet SPME módszerrel azonosítottak (Gioacchini és mtsai, 2010; Mondello és mtsai, 2005; Quach és mtsai, 1998). Más sajtokon végzett SPME analízis során megállapították, hogy a sajtok növényi („zöld”) illatához nagymértékben hozzájárul a 2-undekanon (Vítová és mtsai, 2011).

A metil-keetonok a gyártási folyamatok ellenőrzésére is alkalmasak, mivel zsírsavakból képződnek a tej hőkezelése során (Zhang és mtsai, 2011). DVB-CAR-SPME szálakat alkalmaznak az UHT tejek előállításakor a hőbehatás ellenőrzésére (Vazquez-Landevarde és mtsai, 2005). Akár ötvenkétszeres 2-heptanon és 2-nonanon koncentrációnövekedés is megfigyelhető a pasztörözött tejben a nyers tejhez viszonyítva. A pasztörözött tej metil-keeton koncentrációjának vizsgálatát CAR-PDMS SPME szállal végzik (Marsali, 2000). A 2-butanon koncentrációjának csökkenése jelzi, ha a tej elérte szavatossági idejének végét. Ugyancsak a 2-butanon koncentrációjának csökkenését figyelték meg még joghurt fermentációjánál SPME mintavételt alkalmazva (Soukoulis és mtsai, 2010) és sajtgyártás során is (Verzera és mtsai, 2010).

Az aldehidek különböző osztályokba tartozó savakból keletkeznek oxidáció útján. A rövid szénláncú aldehidek, mint a 2-metilpropanal és a 3-metilbutanal az aminosavak hőhatás miatt bekövetkező bomlása során keletkeznek (Vazquez-Landevarde és mtsai, 2005).

Az aldehidek a tejiparban egyaránt javíthatják és ronthatják is az élelmiszerek minőségét. A CAR-PDMS SPME szál használható a tej romlását jelző komponensek azonosítására (Marsali, 2000). Az aldehid koncentráció növekedése megmutatja, hogy a tej milyen közel áll szavatossági idejének lejártához. A zsírok autooxidációja által keletkező pentanal, hexanal és heptanal koncentrációjának túlzott növekedése nemkívánatos jelenség, mivel jellegzetes, avas illatuk révén kellemetlen zamatot eredményeznek (Gioacchini és mtsai, 2010). Mindazonáltal, a kis molekulatömegű aldehidek (kb. ≤ 100 g/mol) kismértékű megjelenése kívánatos a fermentált tejtermékek esetében. A SPME analízist alkalmazták benzaldehid, acetaldehid és különböző keetonok koncentrációjának

meghatározására is (Verzera és mtsai, 2010; Vítová és mtsai, 2010). Az acetaldehidek a legfőbb hozzájárulói a joghurt aroma kialakulásának (Soukoulis és mtsai, 2010), valamint néhány sajtban a legnagyobb mennyiségben jelenlévő aldehidek (Bergamini és mtsai, 2010; Cais-Sokolinska és Majcher, 2010; Majcher és mtsai, 2010).

3.6.8.4. Észterek

Az észterek általában savak vagy aldehidek és alkohol között fellépő kondenzációs folyamatok során képződnek (Heaven és Nash, 2012). Az élelmiszer aromák egyik csoportját képezik, melyek jelen vannak pl. a sajtokban és gyümölcsökben is (Leksrisonpong és mtsai, 2010; Torrea és mtsai, 2011).

A tejtermékek vizsgálata során CAR-PDMS-SPME szálát használnak az etil-acetát és a metil-észterek koncentrációnövekedésének megállapítására, mivel ezek jelzik a tej korát (Marsil, 2000). A tejben az észterek egyik jelentős forrása a zsírsavak észteresedése a gyártási folyamatok során (Innocente és mtsai, 2011; Lubbers és Butler, 2010; Wang és mtsai, 2010). A tejtermékekben, különösen sajtokban a zsírsav-észterek főleg enzimaktivitás hatására keletkeznek (Bergamini és mtsai, 2010; Delgado és mtsai 2010; 2011; Wolf és mtsai, 2010), de adagolhatják őket a gyártási folyamatok során is a tejekhez és joghurtokhoz direkt adagolással, vagy mesterséges enzimaktivitást előidézve (Erkaya és Şengül, 2011; Gioachini és mtsai, 2010; Majcher és mtsai, 2010; Soukoulis és mtsai, 2010; Verzera és mtsai, 2010; Vítová és mtsai, 2010; Wang és mtsai, 2010).

Az észterek szennyezőanyagként is megjelenhetnek az élelmiszerekben. A ftalátok endokrin rendszert károsító hatása ismert (Talsness és mtsai, 2009). Ezek jelenlétét kimutatták már tejből (Feng és mtsai, 2005, Zhang és mtsai, 2011). Ezekben az esetekben SPME módszerrel

azonosítottak műanyag csövekből származó, lágyítóként használt ftalátokat. Feng és mtsai (2005) tejből háromféle ftalátot, a gyakrabban előforduló di-(2-etilhexil)-, dibutil- és a dietil-ftalátot mutatták ki.

3.6.8.5. Alkoholok

Az alkoholok olyan hidroxilcsoporttal rendelkező kémiai komponensek, melyek SPME módszerrel az egyik leggyakrabban azonosított vegyületek a gyümölcsökben és zöldségekben, bár azonosíthatók tejtermékekből is, ide értve a feldolgozatlan tejet (Zhang és mtsai, 2011).

Az alkoholok a legtöbb tejtermékben megtalálhatók. Nyers tejből egyenes láncú és metilezett alkoholokat mutatott ki DVB-CAR-PDMS SPME szál alkalmazásával Zhang és mtsai (2011). A joghurtokban Vítová és mtsai (2010), az olasz „Fossa” sajtban Gioacchini és mtsai, (2010) az alkoholokat az észtereket követő, második leggyakrabban előforduló kémiai vegyületesoporként azonosították. A sajtok a legkedveltebb célpontjai a tejtermékek SPME módszeren alapuló alkoholtartalom vizsgálatának (Barba és mtsai, 2010).

A sajtokban a legnagyobb koncentrációban megtalálható alkohol rendszerint az etanol (Majcher és mtsai, 2010; Vítová és mtsai, 2011; Wolf és mtsai, 2010), bár kecskesajtokban az 1-feniletanol (Serhan és mtsai, 2010) és a 2-butanol fordul elő nagyobb koncentrációban (Delgado és mtsai, 2011). Az etanolt a joghurtok és lágy sajtok fermentációjának sikerességét jelző indikátor komponensként is használják (Erkaya és Şengül, 2011; Soukoulis és mtsai, 2010). Más típusú alkoholok jelenléte általában a sajtok érleléséhez használt különböző baktériumtörzsek jelenlétének köszönhető (Bergamini és mtsai, 2010; Jaillais és mtsai, 1999; Wolf és mtsai, 2010). Alkoholok a zsírsavak és aminosavak enzimatis átalakulása során is keletkeznek. A

sajtok alkoholtartalma az idő előrehaladtával csökken, azok észterekké alakulása következtében (Delgado és mtsai, 2010).

3.6.8.6. Kéntartalmú szerves vegyületek

A kéntartalmú szerves vegyületek általában kisméretű molekulák, melyek kellemetlen illatuk és/vagy ízük miatt rendszerint nem kívánatos vegyületek az élelmiszerekben (Moreira és mtsai, 2011). Kéntartalmú aminosavak, vagy vitaminok bomlástermékeként jelenhetnek meg (Du és mtsai, 2011). Bizonyos kéntartalmú szerves vegyületek kis koncentrációban viszont kedvező érzékszervi hatást is kifejthetnek az élelmiszerekben, pl. sajtokban (Kataoka és mtsai, 2000).

A tejtermékekben a kéntartalmú szerves vegyületek melegítés során keletkeznek. A kénvegyületek a tejben, mint pl. a dimetil-szulfid, a kéntartalmú aminosavak hőközlés miatt bekövetkező bomlásából származnak (Marsili, 2000). Hasonlóképpen egy másik tanulmányban savófehérjék SPME analízise során öt kéntartalmú szerves vegyületet detektáltak, melyek fehérjebomlás miatt keletkeztek (Leksrisompong és mtsai, 2010). Ezzel ellentétben, sajtok esetében a kéntartalmú vegyületek inkább mikrobiális aktivitás útján keletkeznek és nem hőközlés hatására (Kataoka és mtsai, 2000). A kéntartalmú szerves vegyületek SPME analízise lehetővé tette több jelentős illókomponens detektálását, mint amilyen a metántiol, mely jellegzetes fokhagyma illatot kölcsönöz a Camembert sajtnak (Jaillais és mtsai, 1999) és a kecskesajtnak (Delgado és mtsai, 2011).

3.6.8.7. Furánok

A furánok öttagú gyűrűt tartalmazó oxigéntartalmú aromás heterociklusos vegyületek. A furánok azóta kerültek a kutatás középpontjába

mióta feltételezik, hogy karcinogén vegyületeket képeznek az élelmiszerek hőkezelése során (Liu és Tsai, 2010).

A tejtermékek közül a füstölt (Majcher és mtsai, 2010) és a rántott (Cais-Sokolińska és Majcher, 2010) sajtokban nagy mennyiségben detektálhatóak a furán vegyületek PDMS-CAR-DVB SPME módszerrel. Lekrisompong és mtsai (2010) a tejtermékekre nem jellemző furán vegyületet a 2-oktil-furánt azonosították savófehérjéből, bár ez a vegyület jellemzően a húsban és a csontokban fordul elő. A tejek hőközlést mellőző előállítási folyamatát vizsgálva DVB-CAR-PDMS SPME szállal, a kutatók 2(5H)-furanont azonosítottak a végtermékben (Zhang és mtsai, 2011).

3.6.8.8. Fenolok

A fenolok aromás vegyületek, melyekben egy OH funkciós csoport kapcsolódik közvetlenül az aromásgyűrűhöz. A fenolok gőztéranalízises vizsgálata bonyolult folyamat, mivel a legtöbb fenol nem illékony a mintamátrixszal kialakuló erős intermolekuláris kölcsönhatás miatt (Santana és mtsai, 2009).

Csak néhány tanulmány közöl módszereket a fenolok SPME analízissel történő meghatározásáról tejtermékek esetében. Sajtok vizsgálata során megállapították, hogy fenolkoncentrációjuk növekszik egy 90 napos érlelés alatt (Delgado és mtsai, 2010). Majcher és mtsai (2010) hét különböző etil- és metil-fenolt azonosítottak juh és tehéntejből készült sajtokban.

3.7. Gázkromatográf-tömegspektrométer (GC-MS)

3.7.1. Gázkromatográfia (GC)

A gázkromatográfia olyan kényszeráramlásos elválasztástechnikai módszer, ahol a mozgófázis gáz halmazállapotú. Mivel gáz halmazállapotú

mozgófázist használunk a komponensek áramoltatására, így azoknak is gáz halmazállapotban kell lenniük. Ebből következik, hogy a gázkromatográfia alapvetően az illékony komponensek elemzésére szolgál (Kremmer és Torkos, 2010).

3.7.2. Gázkromatográfias rendszer felépítése

A gázkromatográfias rendszer főbb felépítési egységei a gázrendszer, mely tartalmazza a nagy tisztaságú áramló fázist, néhány esetben a segédgázokat, valamint az ezekhez tartozó szabályozó egységeket. A rendszer tartalmaz még egy mintabeviteli egységet vagy injektort. Az injektorba szilikonmembránon keresztül juttathatjuk be a mintát. Az injektorba csatlakozik be a vivőgáz, követelmény, hogy az injektor 350°C-ig fűthető legyen. A kromatográfias oszlop a kolonna termosztátban helyezkedik el, melyben intenzív ventiláció biztosítja az egyenletes hőeloszlást. Kritérium a termosztáttal szemben, hogy 400°C-ig fűthető legyen, változtatható legyen a felfűtési sebesség és a beállított hőmérséklettől a valós hőmérséklet eltérés ne haladja meg a $\pm 0,1$ °C-ot. A gázkromatográfiában használatos detektorok az oszlopról eluálódott összetevők mennyiségével arányos elektromos jelet szolgáltatnak, amelyet az adatkezelő rendszer alakít át hasznos információvá (Kremmer és Torkos, 2010).

3.7.3. Tömegspektrométer, mint detektor

A gázkromatográfiában használt detektálási módok közül a tömegspektrométer (MS) a leghatékonyabb, egyrészt, mert univerzális detektor, tehát minden komponens detektálható vele, amely az oszlopról eluálódik, valamint megfelelő mértékben ionizálódik, másrészt az ionizációs módszertől függően az adott komponensre jellemző tömegspektrum alapján

lehetővé válik a komponensek azonosítása. A tömegspektrométerek nagy vákuumban (10^{-6} - 10^{-8} kPa) működnek, bennük az oszlopról eluálódó komponensek az ionforrásban molekulaszervezeti tulajdonságaiknak megfelelően fragmentálódnak, valamint részben ionizálódnak. A keletkező ionok az analizátorban tömeg/töltés (m/z) értékük alapján elválnak, és a detektorban mintabeli koncentrációjukkal arányos nagyságú jelet adnak (Kremmer és Torkos, 2010).

3.8. Takarmányozás hatása a tej és tejtermékek minőségére

A takarmányozás befolyásolja a tej és tejtermékek összetételét, ízét, színét, zsírsavösszetételét, valamint a keménysajtok minőségét. A tejalkotók közül elsősorban a tej zsírtartalmát befolyásolja, mivel a tőgy mirigyhámsejtjeiben lejátszódó zsírszintézis során a tejzsírt felépítő zsírsavak kb. 65%-a a bendőben képződő illó zsírsavakból származik, melyek szénhidrátok (legfőképpen nyersrostok) mikrobiológiai bomlása útján képződnek.

A tej zsírtartalmát a takarmány zsírtartalma is befolyásolja. Abban az esetben, ha a takarmány 4%-nál több olyan zsírmolekulát tartalmaz, melyben nagy mennyiségben van jelen telítetlen zsírsav, a tej zsírtartalma csökkenni fog. Ennek oka, hogy a telítetlen zsírsavak rontják a bendő mikroorganizmusainak aktivitását, ezáltal csökkentik a cellulózbontást.

A takarmányozás a tej zsírtartalmán kívül a tejzsír és a vaj zsírsavösszetételét is befolyásolja, mivel a zsírsavak felszívódását követően megindul a triglicerid szintézis a bélhámsejtekben, melyek a nyirokereken keresztül a vérkeringésbe jutnak, így adott annak lehetősége, hogy a zsírsavak a máj megkerülésével bejussanak a tőgy mirigyhámsejtjeibe és ezáltal befolyásolják a tej zsírsavösszetételét (Schmidt és Zsédely, 2011).

A zsírsavösszetételt tekintve a monogasztrikus és a kérődző állatok tejének zsírja eltérő. Ennek oka, hogy a kérődzők a bendőfermentáció során keletkező páros szénatomszámú illó zsírsavakból felépítenek olyan zsírsavakat is, melyek a monogasztrikus állatok tejében nincsenek jelen. A kérődzők tejszírját felépítő zsírsavak több forrásból származhatnak. A 4-10 szénatomszámú zsírsavak a tőgy mirigyhámsejtjeiben szintetizálódnak a bendőből származó illó zsírsavakból. A 12-16 szénatomszámú zsírsavak származhatnak a bendőben fermentálódó, tőgy mirigyhámsejtjeiben szintetizálódó illó zsírsavakból, közvetlenül a takarmányból, de képződhetnek a zsírszövetben valamint a májban lejátszódó „de novo” szintézisből. A 16-os szénatomszámnál hosszabb zsírsavak származhatnak közvetlenül a takarmányból, vagy a „de novo” szintézisből.

A takarmányozás a tejszír mennyiségén kívül annak minőségét is befolyásolja, mivel a takarmány zsírsavainak egy része közvetlenül is beépülhet a tejszírba. A tejszír minőségét annak zsírsavösszetétele határozza meg és a jódszámmal jellemezhetjük. Az átlagos jódszám 32-37 között van. Abban az esetben, ha a takarmány zsírja nagy mennyiségben tartalmaz telítetlen zsírsavakat és ezek egy része beépül a tejszírba, a zsír és a belőle készült vaj lágyabb lesz. Az ilyen tejek jódszáma 37 fölött van. A jódszám csökkenését a telített zsírsavak mennyiségének növekedésével magyarázhatjuk. Ebben az esetben a vaj keményedik, morzsalékosá és nehezen kenhetővé válik.

Az állatok energiaellátásának változtatásával a tej fehérjetartalma is változik. A tej cukortartalma stabil, mennyisége nem változik a takarmányozás hatására (Schmidt, 1996).

3.8.1. Kérődzők takarmányfelvétele

A kérődzők takarmányfelvételét a központi idegrendszer szabályozza a hipotalamuszon keresztül. A hipotalamusz takarmányfelvételt szabályozó tevékenységét beindíthatják szervezetből kiinduló ingerek, mint az egyes metabolitok koncentrációjának megváltozása a vízterekben, vagy az elfogyasztott takarmány emésztőcsőre gyakorolt fizikai hatása, de külső ingerek is stimulálhatják, mint a látás, szaglás és a tapintás, melyek az étvágy megváltoztatásával befolyásolják a takarmányfelvételt (Schmidt és Zsédely, 2011).

3.8.2. Takarmányozás hatása a tej és tejtermékek terpén tartalmára

A terpenoidok SPME analízisével megállapítható, hogy az állatok milyen takarmányozásban részesültek illetve, hogy mely régiókból származnak (Abilleira és mtsai, 2010; Cais-Sokolińska és Majcher, 2010; Erkaya és Şengül, 2011; Fernández-García és mtsai, 2008; Majcher és mtsai, 2010). Pouloupoulou és mtsai (2012a, 2012b) SPME módszerrel vizsgáltak juh- és kecsketejeket és azokból készült tejtermékeket. A vizsgálat során megállapították, hogy a kimutatott terpenoidok az elfogyasztott takarmány biomarkereiként jelenhetnek meg a tejben. Bár a terpének kiemelt fontosságú vegyületek, detektálásuk tejmintákból SPME módszerrel rendkívül nehéz. Ennek oka a tejsír mátrixhatása és az egyes terpének jelentősen különböző gőznyomása (Abilleira és mtsai, 2010).

A tejipari termékekbe a terpenoidok legfőképpen a megemésztett növényi táplálékból kerülhetnek át. A mono- és szeszkviterpén vegyületek kétféleképpen származhatnak át a növényekből a tejbe, az emésztőrendszeren, vagy a légutakon keresztül. Az első esetben a molekulák a növényekből a bendőbe kerülnek, ahol előfordulhat, hogy a terpének

kémiai átalakuláson esnek át. Az összes ilyen molekula a növényekből a bendőbe jut, majd a bendőből felszívódik és a vérbe kerül, onnan pedig a tejbe. A növényekből átszármazó terpének csakúgy, mint a bendőben keletkezők, jól detektálhatók (Schlichtherle-Cerny és mtsai, 2004). A második esetben a komponensek a levegőben terjedve bejutnak az állat tüdejébe onnan pedig a vérbe (Viallon és mtsai, 2000). Az illókomponensek tejbe jutásával, megváltozhatnak annak beltartalmi értékei, különösképpen a mikrobiológiai- és aromaanyagok összetétele (Bugaud és mtsai, 2001a, Viallon és mtsai, 2000, Scehovic és mtsai, 1998, Buchin és mtsai, 1999).

Az eredmények azt mutatják, hogy a különböző termelési területekről (felföld, alföld), évszakokból (tél, nyár) származó tejek eltérnek egymástól (Bugaud és mtsai, 2001a, Scehovic és mtsai, 1998, Buchin és mtsai, 1999).

A tejelő állatok takarmányozása egy fontos faktor a sajtok karakterének kialakításában, hiszen befolyásolja a tejure jellemző paramétereket, mint a tejsírt, fehérjét, ízt, mikroflórát, valamint a sajtkészítésben jelentős szerepet játszó tejsavbaktériumok működését is (Collomb és mtsai, 1999, Grandison és mtsai, 1985). Számos kutatás világít rá arra a tényre, hogy a kétszikű növényekkel benőtt legelőn legeltetett állatok tejében jelentősen nagyobb mennyiségű aromakomponens található, mint a szénával, takarmánnyal, vagy egyszikű növényekkel etetett társaik tejében (Dumont és Adda, 1978, Viallon és mtsai, 1999). Ez a különbség annak köszönhető, hogy a kétszikű növényekben jelentősebb mennyiségű terpén vegyület található, különösen mono- és szeszkviterpének (Mariaca és mtsai, 1997).

Számos csoport összefüggést talált a sajtok érzékszervi, valamint fizikai-kémiai tulajdonságai és az előállítás helye, az állatok

takarmányozása, valamint a takarmányból átszármazó vegyületek között (Mariaca és mtsai, 1997; Viallon és mtsai, 1999; Bugaud és mtsai, 2001a; Bugaud és mtsai, 2001b; Viallon és mtsai, 2000; Scehovic és mtsai, 1998; Jeangros és mtsai, 1997; Cornu és mtsai, 2001; Buchin és mtsai, 2002).

Dumont és Adda (1978) megállapították, hogy a szeszkviterpén vegyületek kizárólag nyáron készült Beaufort sajtokban jelentek meg, amikor a tejlő tehénállomány a hegyvidéki legelőkön legelt. Mariaca és mtsai (1997) a hegyekben készült Gruyere és Etivaz sajtokban 42 terpén vegyületet azonosítottak, mint a β -pinén, β -mircén, linalool, limonén, α -fellandré, α -terpinén, δ -3-karén, p -cimol, α -kopaén és α -humulén, melyek szintén jelen vannak a legelőkön fellelhető 13, legfőképpen kétszikű növényben. Bugaud és mtsai (2001b) terpén komponenseket vizsgáltak olyan sajtokból, melyek különböző területeken legeltetett tehének tejéből készültek. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált sajtok terpén profilja összefüggésben állt a legelők botanikai összetételével, valamint, hogy ezek a vegyületek jelentősebb mennyiségben voltak jelen a hegyvidéki, kétszikűeket nagyobb mennyiségben tartalmazó legelőkön, mint a síkvidéken, ahol túlnyomórészt az egyszikű növények vannak jelen.

Több sajttípuson is végeztek már aromakomponens vizsgálatokat ezek közül a legismertebbek és legnépszerűbbek az Ementáli, Cheddar, Camembert és a Parmigiano (Thierry és mtsai, 1999; Suriyaphan és mtsai, 2001; Pionnier és mtsai, 2002; Barbieri és mtsai, 1994; Bellesia és mtsai, 2003). A szerves illókomponensek széles skálája felelős a sajtok aromájáért. Ezek a komponensek a különböző sajt típusokban nagyon hasonlóak, de arányaikban eltérések mutatkozhatnak (Ziino és mtsai, 2005). A szakirodalomban nincs elegendő adat, hogy bizonyítani lehessen a mono- és szeszkviterpén vegyületek sajtok ízére gyakorolt hatását, kivéve a limonént,

mely bizonyítottan citrusos aromát kölcsönöz számos sajtnak (Capelle, 1997).

3.8.3. Takarmányozási kísérlet során felhasznált gyógynövények

3.8.3.1. Kamilla (*Matricaria recutita* L.)

A kamilla, más néven az orvosi székfű (*Matricaria recutita* L. syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) az egyik legsokoldalúbban alkalmazható gyógynövény. Kelet-Európában és a Közel-Keleten őshonos, de ma már több földrészen megtalálható. Legnagyobb mennyiségben Argentínában állítják elő a drogot, de hazánkban is nagy területen termesztik. A növény 10-40 cm nagy, fészkes virágzatú, fehér nyelvű és sárga csöves virágokkal. A többi kamilla fajtól eltérően a vacok kúpos és belül üreges. Az orvosi székfű különösen az USA-ban, német nyelvterületen és Kelet-Közép Európában népszerű, külföldön gyakran magyar vagy német kamilla néven ismerik. A világ kamilla termelésének felét Németországban használják fel. Jól jelzi népszerűségét, hogy gyakran csak „*Alles Zutraut*”-ként (mindenre képes) emlegetik. A növény kozmetikai célú és élvezeti teaként történő felhasználása is igen jelentős.

A Ph. Hg. VIII-ban a *Matricariae Flos* (kamillavirágzat), a *Matricariae extractum fluidum* (kamilla folyékony kivonat) és a *Matricariae aetheroleum* (kamillaolaj) hivatalos. A kamillavirágzat legalább 4 mL/kg illóolajat, és minimálisan 0,25% apigenin-7-glükozidot tartalmaz. A kamillaolaj két alaptípusa ismeretes: az egyik α -bizabololban (levomenolban), a másik bizabolol-oxidban gazdag. A kamilla folyékony kivonata legalább 0,3% kék színű illóolaj maradványt tartalmaz.

A kamillafajok közül a *Matricaria chamomilla* (Asteraceae) gyógyhatásait tanulmányozták a legalaposabban. Európa nyugati felén az

orvosi székfűnél népszerűbb a római kamilla (*syn. nemes pipitér; Chamaemelum nobile, syn. Anthemis nobilis*), amelynek virágzata a Gyógyszerkönyvben római kamillavirág néven szerepel (*Chamomillae romanae flos*) (Szendrei és Csupor, 2009).

Virágzata és illóolaja a Magyar Gyógyszerkönyvben (Ph. Hg. VIII.) *Matricariae flos*, illetve *Matricariae aetheroleum* elnevezéssel szerepel. A kamilla virágát és illóolaját az európai gyógyszerkönyvek többsége, a virágdrog az ESCOP monográfiák közé sorolja (Bernáth és Németh, 2007).

Az orvosi székfű hatásáért felelős anyagai között lipofil és a hidrofil vegyületek egyaránt megtalálhatók. A hidrofil vegyületek közé tartoznak a poliszacharidok és a flavonoidok. Ezek a vegyületek megtalálhatók a vízzel, vagy alkohol-víz elegyével készült kivonatokban, így a házilag készített kamillateában is.

A virágzatban 0,5-1,5%-nyi mennyiségben megtalálható illóolajat lipofil karakterű vegyületek alkotják. A feldolgozás előtt a drog egyik komponense a szintelen matricin, ami az olaj kinyerését célzó vízgőz-desztilláció során kamazulén-karbonsavon keresztül kamazuléné bomlik. Az illóolaj jellegzetes kék színét a kamazulén adja. Az azuléneket szolgáltató vegyületeket, mint amilyen a matricin, proazuléneknek nevezzük. Az illóolaj további fontos komponensei a bizabolol és származékai (Szendrei és Csupor, 2009).

Fő hatásai a nagy illóolaj-, kamazulén- és bisaboloid-, kumarin-, flavonoid-, pektinszerű nyálkaanyag- és keserűanyag-tartalmából következnek (Németh, 2008).

3.8.3.2. Lestyán (*Levisticum officinale* L.)

A lestyán Perzsiából származó, az ernyősvirágzatúak (*Apiaceae*) családjába tartozó növény. Ősidők óta termesztik, kivadult állományai

napjainkban nem csak Délnyugat-Ázsiában, de a Földközi-tenger régiójában és Észak-Amerikában is megtalálhatók. Pannóniába római közvetítéssel jutott. A középkori Magyarország népszerű fűszere volt, s a népi orvoslás is mindig nagy becsben tartotta. Napjainkban likőrök, röviditalok előállításához is felhasználják.

A *Levisticum officinale* Koch. robusztus, 1-2 m magas évelő növény. A gyógyászatban a növény erős, húsos gyökerét és rizómáját használják fel. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben gyökere *Levistici radix* néven található meg. Az egész drog legalább 4 mL/kg, az aprított drog minimálisan 3 mL/kg illóolajat tartalmaz (Szendrei és Csupor, 2009).

A lestyándrog a feldolgozott és megszáritott gyöktörzsből és gyökérrészekből áll (*Levistici rhizoma et radix*). A lestyángyökér illóolajának (*Aetheroleum levistici*) minőségi követelményeit az ISO 11019:1998 szabvány tartalmazza. A lestyán egyéb részeit is, így levelét (*Levistici folium*) és termését (*Levistici fructus*) drogként és fűszerként egyaránt hasznosítják. A gyökérdrog több gyógyszerkönyvben, így a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos, *Levistici radix* néven (Bernáth és Németh, 2007).

A lestyándrog kb. 0,6-1% illóolaj tartalmú, melynek 70%-a alkil-ftalid, úgy, mint butil-ftalid, ligusticum-lakton, ligustilid, senkiunolid, fellandrén, pinén, terpinén, kamfén, mircén. A drog az illóolajon felül tartalmaz még kumarint, furokumarinokat (umbelliferon, bergaptén, pszoralén), szitoszterolt, fenolkarbonsavakat és poliint (falkarindiol) (Szabó, 2005).

3.8.3.3. Kerti izsóp (*Hyssopus officinalis* L.)

A kerti izsóp az ajakosvirágúak (*Labiatae*) családjába tartozó, a Földközi-tenger vidékéről származó, nálunk nagyban termesztett, illatos

félcserje. Szára 50-70 cm magas, egyenes, négyoldalú, tövén elfásodó. Levelei keresztben átellenesen állnak, 2-4 cm hosszúak, hosszúkás lándzsa alakúak, hegyesek, vagy tompák, ép szélűek. A virágok 7-9-esével állórvökben állnak, fehér, kék, vagy piros színűek; július-augusztusban nyílnak. A növény virágzó, leveles hajtásainak felső, legfeljebb 40 cm hosszú részeit kell levágni a drog kinyeréséhez. Évente kétszer aratható.

A növény (*Hyssopi herba*) illóolajat, glikozidot, cseranyagot, keserűanyagot, festéket, gyantát, cukrot tartalmaz (Rápoti és Romváry, 1997). Drogjában 0,3-1% illóolaj található, melyben főleg monoterpenketon, pinokámfon, továbbá pinének, pinokamfeol, flavonoidok, valamint cserzőanyag van jelen (Szabó, 2005).

3.8.3.4. Kapor (*Anethum graveolens* L.)

A kapor Spanyolország és Portugália partjaitól a Földközi-tenger vidékén át egészen Dél-Oroszországig őshonos, és vadon jelenleg is megterem. Egy svájci, tóparti település régészeti feltárása során bizonyítást nyert, hogy termesztése az újkőkorból kezdődött, de ókori egyiptomi írások is említik, valamint kedvelt volt a görögök és a rómaiak körében is. Utóbbiaknál egyrészt a tehetőség jelképe volt, másrészt, mint egészséges fűszernövényt is nagyra tartották. Hippokratész a fehérborban megfőzött, mézzel édesített kapormag-készítményt szájöblögetésre javasolta, harci sebesülésekre, a sebek begyógyítására pedig pirított kapormag-töretet alkalmaztak. A középkorban a kaprot bájjalok készítéséhez, gonosz varázslatok kivédése ellen használták, az 1570-es években azonban már, mint közönséges kerti fűszernövényt említik a leírások. Napjainkban a kapor elsősorban Észak-Afrika, Oroszország és Skandinávia konyhájában kap fontos szerepet.

Levele finom sallangokra szeldelt. Ernyős virágzata sok nyúlánk sugárból áll, a szirmok sárgák. Termése 2-4 mm hosszú, elliptikus, éretten két résztermésre esik szét.

Az ernyősvirágzatúak (*Umbelliferae*) családjába tartozó, közismert fűszernövény termesztése ipari célokra nagy területeken folyik. A kapor azonban nem csupán kedvelt fűszer, hanem, főleg a virágos hajtásából (*Anethiherba*) emésztést serkentő, szélhajtó és bélféregűző teát is készítenek. Virágos hajtásából és terméséből (*Anethi fructus*) illóolajat is állítanak elő a konzervipar számára. A konzervkészítményeket célszerűbben ízesíthetik a fűszernövények illóolajával, mint a növényi részek örleményével.

Levélzete a szárról lemorzsolva is forgalomba kerül. A kaporlevél 0,5-1,5% illóolajat (15% karvon tartalommal) és fellandrént tartalmaz (Rápoti és Romváry, 1997).

A kaportermés 2,5-4% illóolajat, 10-20% zsíros olajat, proteint és 1% amint tartalmaz. A kapor illóolaja 40-60% karvont, d-limonént, fellandrént, terpinént, miriszticint, kapor-apiolt, A- és C-vitamint tartalmaz. Az érés növekedésével szaporodik az olaj karvontartalma, a fellandréntartalma pedig csökken (Rápoti és Romváry, 1997).

3.8.3.5. Szagos müge (*Asperula odorata* L.)

Más néven erdőmesterfű, májusfű. A buzérfélék (*Rubiaceae*) családjába tartozó, árnyas erdőkben, főként bükkösökben nagy állományokban termő, évelő, illatos növény. Gyökértörzse kúszó, vékony. Szára átlagosan arasznyi magas, egyenes, lágy, négyélű, egyszerű. *Levelei* 6-9-esével örvökben állnak. Az alsó levelek hosszúkás, visszás tojásdadok, 4-6 cm hosszúak, a középsők és a felsők nagyobbak, szállahegyűek, kopaszok, zöldek, érdes szélűek. Virágai a szár tetején hosszú kocsányú sátorozó bogernyőben állnak. A virágok kicsinyek, pártájuk fehér színű; május

második felében nyílnak. A növény föld feletti részét kell virágzaskor gyűjteni. Kb. 5 kg friss virágból állítható elő 1 kg szárított termék (Rápoti és Romváry, 1997).

A drog (*As-perulae herba*) kumarint, keserűanyagot, cseranyagot és baktériumölő anyagokat tartalmaz. Teáját vese-, máj- és epebántalmak ellen, valamint nyugtatóként, vértisztítóként és izzasztónak használják. A fűvel dohányt is illatosítanak (Rápoti és Romváry, 1997).

3.8.3.6. Közönséges cickafark (*Achillea millefolium* L.)

A cickafark az egyik legrégebb és legközismertebb gyógynövényünk. A növény latin neve egy legendára utal, amely szerint Achilles a trójai háborúban sebesült tarsának vérzését cickafarkkal állította el. Az ókori Rómában sebgyógyító, vérzéscsillapító gyógynövényként ismerték, hasonló céllal alkalmazták a kínai orvosok is. Észak-Amerikában is elterjedt a használata, az indiánok előszeretettel használták sebkezelésre és belsőleg különféle gyulladással megbetegedések gyógyítására. A modern gyógyászatban a cickafark illóolajával gyulladáscsökkentő kenőcsök, végbélkúpok hatóanyagaként találkozhatunk, herbája gyomorteák alkotórésze.

A közönséges cickafark az *Asteraceae* családba tartozó, Európában elterjedt évelő lágyszárú növény. Nevét selymes tapintású, hosszúkás leveleiről kapta. Megjelenése alapján rendkívül nehéz a rokon fajoktól megkülönböztetni. A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben az *A. millefolium* L. drogja (*Millefolii herba* – közönséges cickafark virágos hajtás) hivatalos, amely hazánkban csupán nyomokban fedezhető fel. A Gyógyszerkönyv követelményeinek megfelelő drog legalább 2 mL/kg illóolajat és legalább 0,02% kamazulénben kifejezett proazulént tartalmaz (Szendrei és Csupor, 2009).

A növény illóolaja (mintegy 1%, igen változékony összetételű), szeszkviterpéneket, flavonokat (apigenin, luteolin és glikozidjaik) és flavonolokat (artemetin, kaszticin), poliacetiléneket, fenolkarbonsavakat, azonosítatlan alkaloidokat és cserzőanyagokat tartalmaz. A szeszkviterpén-laktonok egy része proazuléntípusú (pl. achillin, achillicin): az illóolaj kinyerése során (vízgőz-desztilláció) azulénné alakulnak. Ez a folyamat a teakészítés során is lejátszódik. A jó minőségű drog proazuléntartalma legalább 0,02%.

Az illóolajban található azuléntípusú szeszkviterpén-laktonok gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek. Ezek legjellemzőbb vegyülete a kamazulén, amely az egyes rokon fajok illóolajában különböző mértékben van jelen. A kamazulén tartalomra az illóolaj színéből következtetni lehet (kékeszöldtől a sötétkékig változhat), a kék szín intenzitása egyúttal a drog minőségét is jelzi (Szendrei és Csupor, 2009).

3.8.3.7. Kecskerutafű (*Oalega officinalis* L.)

A kecskerutafű honos Délkelet-Európában, Elő-Ázsiában. Országszerte előforduló cserje, főként nedves réteken, árterületeken, ligeterdőkben, szegély-gyomtársulásokban él. Könnyen természetes. Júliusban, augusztusban virágzik. Kb. 40 cm-es virágos hajtásvégeit forgatással, árnyékos helyen szárítják (Szabó, 2005).

A hüvelyesek (*Leguminosae*) családjába tartozó, vízpartokon, áradásos helyeken élő, évelő növény. Szára 1 m magasra is megnő, egyenes, elágazó. Levelei szárnyasan összetettek, a levélkék 2-3 cm hosszúak, lándzsásak; szállahegyűek. Virágai fürtösek, pártájuk fehéreslila színű. A növény vékonyabb, legfeljebb 40 cm hosszú virágos, leveles hajtásait kell gyűjteni.

A drog (*Oalegae herba*) galegnvalkaloidát, galuteolin flavonglikozidát, keserűanyagot, cseranyagot, szaponint, szacharózt, zsírosolajat tartalmaz (Rápoti és Romváry, 1997).

3.8.3.8. Tárkony (*Artemisia dracunculus* L.)

A tárkony honos Kelet-Európában, valamint a mérsékelt égövi Ázsiában (valószínűleg Szibéria az őshazája), az Indiai szubkontinensen és Észak-Amerikában is sokfelé termesztik. Könnyen kivadul. Mint fűszernövénynek két fajtaköre ismert: francia, vagy német és az orosz. Előbbi a kedvelt, inkább termesztett. Tősarjakkal, tőosztással szaporítják. Árnyékos helyen szárítják (Szabó, 2005).

A fészkesvirágzatúak (*Compositae*) családjába tartozó, termesztett, élő fűszernövény. Gyökérzete tarackszerű, a talajban messzire kúszik. Szára 60-100 cm magas, elágazó. Levelei 3-8 cm hosszúak, szásláncok, hegyesek, kissé fénylők. Fészkes virágzatai dúsan szétágazó bugában állnak. A virágok sárgásbarnák, augusztus-szeptemberben nyílnak (Rápoti és Romváry, 1997).

A drog 0,5-2,0% illóolaj melynek fő alkotója az estragol, de tartalmaz még szeszkviterpén-laktonokat és flavonoidokat is (Szabó, 2005).

3.8.3.9. Lándzsás útifű (*Plantago lanceolata* L.)

A Plantaginaceae családba tartozó *Plantago lanceolata* L. Európában és Ázsiában egyaránt megtalálható élő, törzsás növény. Gyógyászati célú alkalmazásának története több száz éves, már középkori herbáriumok is említik. A magyar gyógyszerkönyvek közül először a VI. Magyar Gyógyszerkönyvben szerepel, de a népi gyógyászat sokkal régebb óta ismeri.

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben egész, vagy aprított, szárított levele, a *Plantaginis lanceolate folium* a hivatalos drog, amelynek akteozidban kifejezett összes orto-dihidroxi-fahéjsav-származék tartalma legalább 1,5%. Levele a virágzás alatt gyűjtendő. Fontos a drog gyors szárítása, mivel a hatóanyagok bomlékonyak. A drog színe jelzi a bomlási folyamatot, a fekete színű drog gyógyászati szempontból értéktelen. (Szendrei és Csupor, 2009)

Nagy mennyiségben, akár 7%-ban tartalmaz nyálkatípusú poliszacharidokat, továbbá iridoid-glikozidokat, amelyek fő komponensei az aukubin és a katapol. Cserzőanyagokat, flavonoidokat, kovasavat, kávésav-észtereket (pl. akteozid, klorogénsav) is tartalmaz (Szendrei és Csupor, 2009).

3.8.3.10. Orvosi zsálya (*Salvia officinalis* L.)

A növény a Földközi-tenger környékén honos, a világ számos részén termesztett örökzöld, évelő félcserje. A *Salvia* név a latin *salvare* szóból ered és gyógyító tulajdonságára utal. Az ókori egyiptomiak termékenységserkentő szerként használták. Vizes kivonatát az ókorban vérzéscsillapítóként, fekélyek és kelések tisztítására, a belőle préselt levét pedig rekedtség és köhögés kezelésére alkalmazták. A zsálya a mediterrán népek kedvelt fűszere, kis mennyiségben adagolva húsételek ízesítésére használható.

A gyógyászatban a *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) egész vagy aprított, szárított levelét (*Salviae officinalis folium* Ph. Hg. VIII., orvosi zsályalevél), illetve az abból készült kivonatokat alkalmazzák. A levéldrog szaga jellemző, íze keserű, aromás. Illóolaja tujonban gazdag. Az illóolaj-tartalom egész levelekből álló drog esetében legalább 15 mL/kg, aprított levelekből álló drog esetén legalább 10 mL/kg.

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben a *Salviae tinctura* (orvosi zsályalevél-tinktúra) is megtalálható, amelyet aprított növényi drogból 70%-os etanolos kivonással állítanak elő. Barnás színű, jellemző szagú folyadék. Hatékonyságához tartalmaznia kell legalább 0,1% tujonban gazdag illóolajat (Szendrei és Csupor, 2009). A levéldrog 1-2,5% illóolajat (fő komponensek: tujon, cineol, kámfor), 3-8% cserzőanyagot, flavonoidokat, diterpéneket és szaponint tartalmaz (Szendrei és Csupor, 2009).

4. Kísérleti eljárások

4.1 Kísérletekhez felhasznált vegyszerek és gyógynövények

Elemzéseimhez a következő vegyszereket és gyógynövényeket használtam fel: 99% *p*-cimol, 98% 4-allil-anizol, 75% szabinén, 98% α -pinén, 96% α -humulén, 99% β -pinén, 98% *transz*-kariofillén, 96% α -tujon, 99,5% nátrium-azid (Sigma, Sigma-Aldrich Kft., Magyarország), 94% limonén, 98% linalool, 99,8% metanol (Merck, Merck Kft., Magyarország), kámfor és mentol Ph Hg VIII. (gyógyszertári).

A vizsgálataimhoz a következő tíz kereskedelmi forgalomban kapható, szárított és aprított gyógynövény mintát használtam fel: cickafark (*Achillea millefolium* L.), izsóp (*Hyssopus officinalis* L.), kamilla (*Matricaria chamomilla* L.), kapor (*Anethum graveolens* L.), kecskeruta, (*Galega officinalis* L.), lestyán (*Levisticum officinale* L.) szagos müge (*Galium odoratum* L.), tárkony (*Artemisia dracuncululus* L.), lándzsás útifű (*Plantago lanceolata* L.) (továbbiakban útifű), orvosi zsálya (*Salvia officinalis* L.) (továbbiakban zsálya).

4.3 Minták és mintavételi eljárások

4.3.1. Szarvasmarhától származó minták

A tejminták a Bicskei Mezőgazdasági Zrt. tejelő állományának hat különböző gyógynövény-társulással beültetett legelőjén 10-10 napig legeltetett 4135 (továbbiakban 1-es kísérleti egyed) és 4364 (továbbiakban 2-es kísérleti egyed) fűszámú teheneinek, a gyógynövényes legeltetés 10. napját követő reggeli, illetve esti fejésű tejeiből származtak. Az egyes takarmányozási fázisokban legeltetett takarmányok cickafarkat, izsópot-zsályát-szagos mügét, kamillát, kecskerutát-lestyánt-tárkonyt, kaprot, lándzsás útifüvet tartalmaztak, valamint egy hetedik fázisban kakukkfűves

szénát kaptak az egyedek. A mono- és szeszkviterpén vegyületek átszarmazása a takarmányból a tejbe gyorsnak mondható. Szarvasmarhák esetében a monoterpének már 8 óra, míg a szeszkviterpének már 32 óra elteltével detektálhatók a tejből (Viallon és mtsai, 2000). Ezzel szemben, juhok gyógynövényes táplálása során a terpenoidok csak 2 nap elteltével jelentek meg a tejben (Poulopoulou és mtsai, 2012a). Poulopoulou és mtsai (2012b) kecskéken végzett kísérletek során megállapították, hogy az orálsan adagolt tiszta α -pinén, limonén és β -kariofillén vegyületek már 2 órával az adagolást követően megjelentek a vérben és még 24 óra elteltével is detektálhatók nagyon kis koncentrációban. A szakirodalmi adatok alapján úgy gondolom a 10. napon elvégzett mintavétel megalapozottnak mondható. A két tejelő állat vérmintáinak heparinos csőbe történő levétele a tejmintavételekkel egy időben történt.

A hét sajt minta közül egy gomolya és kettő trappista sajt a gyógynövényes legelőn legeltetett állatok tejből készült. A natúr gomolya és a két natúr trappista sajtot pedig kontroll mintának alkalmaztam. A gyógynövényes és natúr trappista sajtok közül egy-egy 4 napos (friss), illetve 6 hetes (érett) érlelési idővel készült. A gomolya és trappista sajtokon kívül vizsgálat tárgyát képezte még egy rézüstös Hegedűs sajt, mely szintén a gyógynövényes legelőn legeltetett tehének tejből készült.

A mintavétel körülményeinek optimalizálásához, valamint a berendezés kalibrációjához szükséges tejsírt biztosító vajat kiskereskedelmi forgalomból szereztem be.

4.3.2. Kecskétől származó minták

A tejminták Csató József kertai gazdálkodó juh- és kecskeállományának hat különböző gyógynövényes takarmánnyal 10-10 napig etetett 3-3 kísérleti egyedének, a gyógynövényes etetés 10. napját

követő esti fejésű tejeiből származtak. Az egyes takarmányozási fázisokban etetett takarmányok cickafarkot, zsályát, szagos mügét, kamillát, tárkonyt valamint útifüvet tartalmaztak. A mintavétel körülményeinek optimalálásához, valamint a berendezésünk kalibrációjához szükséges nyers tejet a kontroll állatoktól vettem.

4.4. Mintaelőkészítés

A gyógynövény és takarmány mintákból 200 g mennyiséget nagyteljesítményű (750 W) Desire típusú (Russels Hobbs) elektromos konyhai aprítógép segítségével 10 percen keresztül aprítottam. Az így egységesített mintákat a további felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztószekrényben tároltam.

A tehenek esetében vérmintákból viszonylag kis mennyiség állt rendelkezésemre. Ezért, hogy a vizsgálatokhoz minimálisan szükséges 5 mL vérplazmát biztosítani tudjam, a két tehéntől származó mintát egyesítettem, majd a zárt mintavételi csőben 1 óra hosszat 5500 g gyorsuláson centrifugáltam (Sigma 3K, Németország). A felülúszó plazmát a felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam. A vérminták előkészítéséhez Estell és mtsai (2010) cikkét vettem alapul, de végül a hatékony elválasztás érdekében az irodalomban közölt paramétereken változtatnom kellett.

Rövidebb idejű tároláshoz (2-3 nap) a tejmintákat a beérkezésükkor 1 g/L koncentrációban hozzáadott nátrium-aziddal tartósítottam. A hosszabb időtartamú megőrzéshez (>3 nap) a mintákat a felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottam.

A tejszírok elválasztásához az Abilleira és mtsai (2010) által alkalmazott kétlépéses centrifugálást vettem alapul, melyhez ők is Viallon és mtsai (2000) cikkéből merítettek ihletet. Az általam végzett tejszír kinyerési eljárás során a tartósított tejek 80 grammját 3300 g gyorsuláson $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 15

percig centrifugáltam. A felülúszó tejszínt zárt centrifugacsőben 35 °C-on 5500 g gyorsuláson 2,5 órán keresztül további centrifugálásnak vetettem alá, majd a felülúszó tejszírt a felhasználásig -20°C-on tároltam. Az eredeti módszer szerint 2000 g-n 4°C-on elválasztották a tejszínt majd ezt 17000 g-n tovább centrifugálták 20 percig. A 17000 g-s centrifugálást ilyen nagy teljesítményű centrifuga hiányában sajnos nem tudtam elvégezni, de 5500 g-n 2,5 óra centrifugálással is teljes mértékben el tudtam választani a tejszínből a zsírfrakciót.

A kiskereskedelmi forgalomból származó vajminta zsírtartalmát a felolvasztása utáni 35 °C-on és 5500 g gyorsuláson történő 1 óra időtartamú centrifugálást követően különítettem el a vizes fázistól.

A közvetlen SPME analízisre érkező kecsketejminták 5-5 g-ját a beérkezést követően kifűtött, csavaros kupakkal ellátott 24 mL-es fiolába mértem be analitikai mérlegen (Sartorius TE214S, Németország) és további felhasználásig -20 °C-on tároltam.

4.5. Szilárdfázisú mikroextrakció (SPME)

Módszerfejlesztésemhez Abilleira és mtsai (2010) által kifejlesztett HS-SPME-GC-MS eljárást vettem alapul. Az illóalkotók kinyerését SPME módszerrel és gőztér-analízissel (HS) végeztem. A mintavételhez Supelco gyártmányú kézi SPME mintavevőt (57330-U) alkalmaztam. SPME szálként a gyógynövények, valamint a takarmányok vizsgálatához, az apoláris illó komponensek elemzéséhez gyakorta alkalmazott 1 cm hosszú 100 µm PDMS bevonatú, a vérplazma, a tej, tejszír, valamint a sajt minták vizsgálatához a gyártó (Supelco) által az illó vegyületek nyomelemzéséhez ajánlott 2 cm hosszúságú 50 µm divinilbenzol és 30 µm karboxénes PDMS-bevonatú (DVB/CAR/PDMS) „stableflex” szálát használtam, Abilleira és mtsai (2010) ajánlása szerint. Azért, hogy a SPME szálakból az állás során a

levegőből megkötött illékony alkotókat eltávolítsuk, a szálakat a GC-MS készülékeink injektorában 260 °C-on 15 percig fűtöttem, ezzel szemben Abilleira és mtsai (2010) 270°C-on 1 órát kondicionáltatták a szálakat a mintavételt megelőzően.

Az előkészített mintákból alikvot mennyiséget (gyógynövények és takarmányok 2-2 g, vérplazmák 5-5 mL, tejek 5-5 g, tejszírok és sajtok 5-5 g), gyógynövényeknél és takarmányoknál 43 mL, tejeknél, vérplazmáknál, tejszíroknál és sajtoknál 24 mL térfogatú borostyán színű üvegfiolába mértem. Abilleira és mtsai (2010) az előkészített tejszírokból csupán 1 g-ot mért 4 mL-es fiolába. A fiolákat a gőztér mintavételhez kifejlesztett teflonbevonatú Mininert (Supelco) nyit-zár szeleppel ellátott csavaros zárókupakkal zártam le. A mosogatás során az üvegfiolákra került mosogatószer illatanyagokat, a fioláknak szárítószekrényben (Thelco 70M, Precision Scientific) 150 °C-on történő, 1 óra időtartamú hőkezelésével távolítottam el. A nyit-zár szeleppel ellátott zárókupakokat ugyanezen célból a metanolos (analitikai tisztaságú) öblítést követően 80 °C-on 2 órát kifűtöttem.

A mintákat tartalmazó fiolákat 50 percig elektromos blokkfűtőben (Multi-Blok, Lab-Line) vérplazmáknál 40 °C, gyógynövényeknél 55 °C, tejeknél, kecsketejeknél és takarmány mintáknál 60 °C, tejszíroknál pedig 80 °C hőmérsékleten termosztáltam, majd az SPME szálakat a nyit-zár szelepen keresztül a mintákat tartalmazó fiolák gőzterébe vittem. Abilleira és mtsai (2010) csupán 40 °C-on 10 percig kondicionáltatták a tejszír mintákat a mintavételt megelőzően, módszerem optimalálásánál látható, hogy az általam alkalmazott vizsgálati körülmények között sem a hőmérséklet sem az időtartam nem volt elegendő ahhoz, hogy a fiola gőzterében a komponensek között egyensúlyi állapot jöjjön létre. A mintavétel gyógynövényeknél

5 min, takarmányoknál és tejszíroknál 50 min, a vérplazmáknál, tejeknél és sajtoknál pedig 60 min volt. Az SPME szálát a mintavételt követően a vizsgálatokhoz alkalmazott GC-MS készülék injektorába helyeztem, ahonnan a deszorpciós idő (5,5 min) letelte után eltávolítottam.

4.6. Gázkromatográf-tömegspektrométer (GC-MS) rendszer

A gyógynövények illóalkotóinak elemzéséhez GCQ (Finnigan MAT) típusú, ioncsapdás, míg a vérplazmák, a tejek, valamint a tejszírok gőztér vizsgálataihoz QP-5000 (Shimadzu) típusú kvadrupól analizátorral ellátott gázkromatográf-tömegspektrométer rendszereket használtam. Az alkalmazott vizsgálati körülményeket az 1. táblázatban tüntettem fel összehasonlítva az Abilleira és mtsai (2010) által használt GC-MS vizsgálati körülményekkel. Mivel a terpének mennyiségi meghatározása közvetlenül, tehéntejmintákból sikertelennek bizonyult, ezért a kecsketejminták esetében már más, optimált vizsgálati körülményeket alkalmaztam (2. táblázat).

1. táblázat Optimált GC-MS vizsgálati körülmények gyógynövényekre, vérplazmákra, tehéntejekre és sajtokra

	GCQ	QP-5000	Abilleira és mtsai (2010)
Injektor	280 °C, osztott, 1:30	260 °C, osztatlan, 5 min	240°C, osztatlan, 5 min
Deszorpciós idő	5 min	5,5 min	-
Liner	2 mm ID, kvarc	0,75 mm ID, üveg	-
Oszlop	RTX-5 (Restek) 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm film	RTX-5 (Restek) 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm film	Supelcowax (Supelco) 60 m, 0,25mm ID, 0,25 µm film
Program	50-200 °C, 3 °C/min	50-185 °C, 3 °C/min	40°C-110°C 5°C/min 110°C-240°C 10°C/min (Juan és mtsai (2007)
Vivőgáz	He (5.0, Linde), 35 cm/s	He (5.0, Linde), 35 cm/s	He 1mL/min
Transzferline hőm. (°C)	250	250	250
Ionforrás	EI, 70 eV, 200 °C	EI, 70 eV, 200 °C	EI, 70 eV, 200 °C
Pásztázás (Th: Thomson- egység)	full scan 45-345 Th, 0,5 s	vérplazma, tehéntej, sajt: full scan 45-300 Th, 0,25 s vajzsír: SIM 0,2 s	full scan 19-250 Th, 2 s

2. táblázat Optimált GC-MS vizsgálati körülmények kecsketejekre

QP-5000	
Injektor	260 °C, osztatlan, 4 min
Deszorpciós idő	4,5 min
Liner	0,75 mm ID, üveg
Oszlop	RTX-5 (Restek) 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm film 40-160 °C, 3 °C/min
Vivőgáz	He (5.0, Linde), 35 cm/s
Transzferline	250 °C
Ionforrás	EI, 70 eV, 200 °C
Pásztázás	Nyerstej SIM 0,2 s, előkísérlet és alkánsor: full scan 45-300 Th, 0,25 s

4.7. Gyógynövények illóalkotóinak azonosítása

Ahhoz, hogy a gyógynövényekből a tejekbe és tejtermékekbe, illetve a vérplazmákba átszármazó terpénvegyületeket sikeresen meghatározhassam, első lépésként szükséges annak megállapítása, hogy a takarmányozáshoz felhasznált gyógynövényeknek milyen a terpén profiljuk.

A gyógynövények illó komponenseit alkotó terpén, illetve terpén-származékok között számos vegyület hasonló, ezért átlapoló tömegspektrumú, ami azonosításukat bizonytalanná teszi. Ennek kiküszöbölésére az egyes alkotókra felvett tömegspektrumok alapján történő azonosítást kiegészítettem a gázkromatográfiában gyakorta alkalmazott Kováts-féle retenciós index alapján való azonosítással.

A Kováts-féle retenciós index meghatározásához 8-20 szénatomszámú *n*-alkán (Sigma-Aldrich) homológ sort tartalmazó *n*-hexán (Merck) oldatot injektáltam a GC-MS rendszerbe és a 4.6-os alfejezetben leírt GC-MS beállítás alkalmazásával felvettem ezen *n*-alkán homológ sor, illetve a vizsgálandó gyógynövények gőzterének összión kromatogramjait. A kromatogramok csúcsmaximumaiból meghatároztam a *n*-alkánok, valamint a

gőztérben található vegyületek retenciós idejét. A retenciós idők valamint a holtidő alapján a Kováts-féle retenciós indexet (KI), röviden Kováts-indexet, az alábbi egyenlettel számoltam (Kováts, 1958).

$$KI = 100 \left[\frac{\lg(t_R - t_0) - \lg(t_{R,n} - t_0)}{\lg(t_{R,n+1} - t_0) - \lg(t_{R,n} - t_0)} + n \right] \quad (1)$$

Ahol n az n -alkán szénatomszáma,
 KI az adott alkotó Kováts-indexe,
 t_0 holtidő,
 t_R az adott alkotó retenciós ideje,
 $t_{R,n}$ az adott alkotó előtt eluálódó n szénatomszámú n -alkán retenciós ideje,
 $t_{R,n+1}$ az adott alkotó után eluálódó $n+1$ szénatomszámú n -alkán retenciós ideje.

A gőztérben található komponensek azonosítása az adott alkotó Kováts-indexének, valamint a kromatográfias csúcsmaximumban felvett tömegspektrumának irodalmi Kováts-indexekkel és tömegspektrumokkal (Adams, 2001) végzett összehasonlításával történt.

4.8. SPME mintavételi körülmények optimalizálása tejsír mintákra

A terpén jellegű illóalkotók kvantitatív vizsgálatát az egyes tejmintákból kinyert vajzsírok gőztérének 2 cm hosszúságú 50/30 μm DVB/CAR/PDM szállal történő SPME mintavételével végeztem. Az optimális SPME mintavételi körülmények meghatározáshoz vizsgáltam a szálban oldódott terpének és terpén származékok mintavételi hőmérséklet és mintavételi idő függését.

Az optimális mintavételi hőmérséklet meghatározását 5 g, hozzáadott terpén standardot tartalmazó (adalékolt) kiskereskedelmi forgalomból beszerzett vaj tejsíradékának 40, 60 és 80 °C-os gőztéréből 60 min mintavételi idővel vett minták elemzésével végeztem. Az optimális

mintavételi idő meghatározása az adalékolt vajminták gőzteréből 80 °C-on és 1, 2, 5, 10, 20, 30, illetve 50 min hosszan történt.

4.9. Kalibráció tejsír minták esetében

A kidolgozott GC-MS módszer kalibrációját standard addíciós eljárással kiskereskedelmi forgalomból származó vajmintából kinyert adalékolt tejsír elemzésével végeztem. Az adalékolt mintákat a következő módon állítottam elő: 24 mL térfogatú fiolákba 5-5 g tömegű kiskereskedelmi fogalomból beszerzett vajból kinyert tejsírt mértem. A zsiradékokat 40 °C-os vízfürdön megolvasztottam, hozzáadtam 50-50 µL térfogatú, a terpéneket megfelelő koncentrációban tartalmazó metanolos oldatot. A fiolákat lezártam és vortexszel (VELP Scientifica Rx³, Olaszország) alaposan összeráztam. Az így nyert adalékolt tejsír minták terpéntartalma szabinénre 15-770 ng/g, α-pinénre, p-cimolra, limonénre, linaloolra, α-tujonra, kámforra és metilkavikolra a 20-100 ng/g, β-pinénre 25-1230 ng/g, kariofillén E-re és α-humulénre pedig a 40-2000 ng/g koncentrációtartományba esett. Az adalékolt minták gőzteréből 80 °C-on 50 perces mintavételi idővel mintát vettem, és a mintavevő SPME szálat a GC-MS készülék injektorába vittem. A GC-MS berendezéssel felvett ionkromatogramok csúcsterületei és a hozzájuk tartozó terpénkoncentráció értékpárookra a legkisebb négyzetek módszerével egyenest illeszttem. Az illesztett egyenesek a meredekségéből meghatároztam a módszer érzékenységét, valamint meghatározás alsó határát (LOQ).

$$LOQ = 10SD/m \quad (2)$$

Ahol SD a detektált csúcs alatti területek szórás értéke,

m az illesztett kalibráló egyenes meredeksége.

4.10. SPME mintavételi körülmények optimalása nyers kecsketej mintákra

A terpén jellegű illóalkotók kvantitatív vizsgálatát az egyes tejminták gőzterének 2 cm hosszúságú 50/30 μm DVB/CAR/PDM szállal végzett, SPME-s mintavételével végeztem. Az optimális SPME mintavételi körülmények meghatározáshoz megvizsgáltam a száلبan oldódott terpének és terpén származékok mintavételi hőmérséklet és mintavételi idő függését.

Az optimális mintavételi hőmérséklet meghatározását 5 g, hozzáadott terpén standardot tartalmazó (adalékolt), mágneses keverővel kevertetett nyers kecsketej 40, 60 és 80 °C-os gőzteréből 60 min mintavételi idővel vett minták elemzésével végeztem. Az optimális mintavételi idő meghatározásához a mintavételt az adalékolt tejminta gőzteréből 60 °C-on 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40, illetve 60 min hosszan végeztem.

4.11. Kalibráció nyers kecsketej minták esetében

A mérőberendezés kalibrációját standard addíciós módszerrel kontroll kecskéktől származó adalékolt tejminták elemzésével végeztem. Az adalékolt mintákat a következő módon állítottam elő:

A 24 mL térfogatú fiolákba 5-5 g tömegű nyers kecsketej mintát mértem. A tejekhez szobahőmérsékleten hozzáadtam 50-50 μL térfogatú, a terpéneket megfelelő koncentrációban tartalmazó metanos oldatot. A fiolákat lezártam a gőztér-mintavételi kupakkokkal. Az így nyert adalékolt tejminták terpén tartalma szabinénre 20-1320 ng/g, α -pinénre 15-1040 ng/g, *p*-cimolra 30-1300 ng/g, limonénre 20-1270 ng/g, linaloolra 25-1300 ng/g, α -tujonra 35-1530 ng/g, kámforra 20-1400 ng/g és mentolra a 20-1425 ng/g, β -pinénre 15-1370 ng/g, metilkavikolra 20-1370 ng/g kariofillénre 15-1470 ng/g és α -humulénre pedig a 15-1350 ng/g koncentrációtartományba esett. Az adalékolt minták gőzteréből 60 °C-on 60 perces mintavételi idővel mintát

vettem, és a mintavevő SPME szálát a GC-MS készülék injektorába vittem. A kalibrációt a tejsír minták esetében említett eljárásnak megfelelően végeztem.

5. Eredmények és tárgyalásuk

5.1 Gyógynövények és gyógynövényekkel kevert takarmányok illó alkotóinak vizsgálata

5.1.1. Gyógynövények gőztérbeli illó alkotóinak azonosítása

Vizsgálataimban a takarmányokba bekeverésre került 10 gyógynövény minta 55°C-os zárt gőztérben az (1) egyenlet felhasználásával kiszámolt KI értékek, valamint az egyes alkotók kromatográfias csúcsmaximumaihoz tartozó tömegspektrumok segítségével 46 különböző illékony vegyületet azonosítottam (3. táblázat). Az azonosítás során az egyes illóolajok alkotóinak KI értékeit, valamint tömegspektrumait magába foglaló adatbázisból (Adams, 2001) kiválasztottam az ismeretlen vegyület retenciós indexével és tömegspektrumával legjobb egyezést mutató illóalkotót. Az így azonosított komponenseket, azok retenciós idejét (t_R), és a belőlük az (1) egyenlet segítségével kiszámolt KI értékeket, valamint ezek eltérését (Δ) a szakirodalmi értéktől (Adams, 2001), továbbá tömegspektrumuk egyezésének mértékét (MS Fit) a szakirodalmi tömegspektrumokkal (Adams, 2001) a 3. táblázatban tüntettem fel. A legkisebb retenciós idejű alkotónak a szantolin-triént ($t_R=6,8$ min), a legnagyobb pedig az α -biszabolol-oxid B-t találtam. Az általam számolt valamint, a szakirodalmi retenciós index értékek jó egyezést mutattak. Tíznél nagyobb eltérést (Δ) egyetlen egy esetben sem, ötnél nagyobb eltérést pedig, csak tíz vegyület, úgymint 1,8-cineol (8), (*Z*)- β -ocimén (6), linalool (7), *cisz*-tujon (9), *transz*-tujon (10), α -terpineol (6), metilkavicol (7), karvon (10) α -terpenil-acetát (6), metil-eugenol (8) esetében tapasztaltam (3. táblázat).

3. táblázat Gyógynövények gőzterében (55 °C) talált alkotók, képlete, relatív molekulatömege (M_r), retenciós ideje (t_R), általam számolt Kováts-féle retenciós indexe (KI), ezek eltérése (Δ) a szakirodalmi retenciós indextől (Adams, 2001), valamint tömegspektrometriás azonosításuk megbízhatósága (MS Fit).

N°	Vegyület	Képlet	M_r (g/mol)	t_R /min	KI	Δ	MS Fit
1.	szantolin-trién	$C_{10}H_{16}$	136	6,80	911	1	884
2.	α -tujén	$C_{10}H_{16}$	136	7,42	931	1	889
3.	α -pinén	$C_{10}H_{16}$	136	7,65	939	0	866
4.	kamfén	$C_{10}H_{16}$	134	8,15	954	0	879
5.	szabinén	$C_{10}H_{16}$	136	9,00	977	2	971
6.	β -pinén	$C_{10}H_{16}$	136	9,10	980	1	-
7.	mircén	$C_{10}H_{16}$	136	9,63	993	2	-
8.	α -fellandré	$C_{10}H_{16}$	136	10,15	1006	3	899
9.	<i>p</i> -cimol	$C_{10}H_{14}$	134	10,95	1029	3	960
10.	limonén	$C_{10}H_{16}$	136	11,12	1033	4	763
11.	1,8-cineol	$C_{10}H_{18}O$	154	11,33	1039	8	700
12.	(Z)- β -ocimén	$C_{10}H_{16}$	136	11,50	1043	6	833
13.	(E)- β -ocimén	$C_{10}H_{16}$	136	11,95	1054	4	833
14.	γ -terpinén	$C_{10}H_{16}$	136	12,37	1064	4	872
15.	artemiszia-ke	$C_{10}H_{16}O$	152	12,52	1067	5	889
16.	cisz-szabinén-hid	$C_{10}H_{18}O$	154	12,83	1074	4	792
17.	terpinolén	$C_{10}H_{16}$	136	13,63	1091	2	910
18.	linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	14,23	1104	7	-
19.	cisz-tujon	$C_{10}H_{16}O$	152	14,52	1111	9	771
21.	kámfor	$C_{10}H_{16}O$	152	16,18	1151	5	822
22.	β -pinén-oxid	$C_{10}H_{16}O$	152	16,72	1163	4	-
23.	transz-pinokám	$C_{10}H_{16}O$	152	16,87	1166	3	758
24.	pinokarvon	$C_{10}H_{14}O$	150	17,00	1169	4	831
25.	borneol	$C_{10}H_{18}O$	154	17,10	1171	2	832
26.	<i>p</i> -menta-1,5-di	$C_{10}H_{16}O$	152	17,22	1174	4	831
27.	cisz-pinokám	$C_{10}H_{16}O$	152	17,50	1179	4	788

3. táblázat (folytatás)

N°	Vegyület	Képlet	M _r (g/mol)	t _R /min	KI	Δ	MS Fit
28.	kaporéter	C ₁₀ H ₁₆ O	152	18,03	1190	3	900
29.	α-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	18,30	1195	6	882
30.	metilkavikol	C ₁₀ H ₁₂ O	148	18,67	1203	7	969
31.	transz-krizantém- acetát	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	20,27	1242	4	791
32.	karvon	C ₁₀ H ₁₄ O	150	20,77	1253	10	-
33.	bornil-acetát	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	22,58	1292	3	613
34.	α-terpenil-acetát	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	25,27	1355	6	860
35.	neiso-dihidro- karveol-acetát	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	25,40	1358	-1	-
36.	cikloszativén	C ₁₅ H ₂₄	204	26,17	1375	4	-
37.	Bourbonén	C ₁₅ H ₂₄	204	26,75	1388	0	905
38.	metil-eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178	27,80	1412	8	844
39.	α-gurjunén	C ₁₅ H ₂₄	204	27,80	1412	2	950
40.	kariofillén E	C ₁₅ H ₂₄	204	28,23	1423	4	904
41.	α-humulén	C ₁₅ H ₂₄	204	29,70	1459	4	797
42.	(E)-β-farnezen	C ₁₅ H ₂₄	204	29,82	1462	4	-
43.	allo-aromadendren	C ₁₅ H ₂₄	204	29,97	1465	5	929
45.	szpatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	222	34,68	1582	4	-
46.	α-bisabolol-oxid B	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	37,62	1660	2	-

Ezek az eltérések leginkább a szakirodalmi retenciós indexek (Adams, 2001) meghatározásánál (DB5), illetve az általam végzett vizsgálatoknál alkalmazott gázkromatográfiás kapilláris oszlop (Restek, RTX-5) megosztó fázisának kismértékű különbözőségével magyarázhatók. A tömegspektrometriás azonosítás során már korántsem ilyen jó az egyezés mértéke az irodalmi (Adams, 2001) tömegspektrumokkal. Annak ellenére, hogy néhány vegyületet nagy megbízhatósággal sikerült tömegspektrumuk alapján azonosítani, számos vegyületre (β-pinén, mircén, linalool, β-pinén-oxid, karvon, *neiso*-dihidro-karveol-acetát, cikloszativén, (*E*)-β-farnezen, szpatulenol, α-bisabolol-oxid B) szoftverünk (GCQ 2.2) tömegspektrum kereső programja nem adott megfelelő találatot. Pontosabban, a kereső

program csak a beazonosítani kívánt alkotó tömegspektrumával az első 10 legjobban egyező tömegspektrumú vegyület nevét listázza ki, melyek között a kérdéses vegyületek nem szerepeltek. Ennek egyik oka az, hogy számos terpén, vagy terpén származék illóolaj alkotó ad nagyon hasonló tömegspektrumot, ezért ez alapján történő megbízható azonosításuk nehéz. Másik probléma, hogy az adatbázis tömegspektrumait kvadrupól analízátorral felszerelt tömegspektrométerrel vették fel, míg a saját elemzéseimnél ioncsapdás analízátorral ellátott készüléket használtam. Ez utóbbinál, az ioncsapdában alkalmazott és a tömegspektrometriában már „nagyak” számító 1 mbar nyomású hélium okozta kémiai ionizáció miatt, az ioncsapdás készülékekkel felvett tömegspektrum eltérhet az ugyanazon vegyületre kvadrupól analízátorokkal mért tömegspektrumtól. Ezen eltérés mértéke függ a vizsgált vegyülettől, valamint az adott készülék beállításától is.

A gőztér illóalkotóinak a GC-MS elemzése során alkalmazott retenciós index és tömegspektrum felhasználásával történő azonosításuk, a cimol izomerjei kivételével sikeresnek mondható. Kizárólag csak a mért tömegspektrumok értelmezésével, illetve csak a számolt retenciós indexek szakirodalmi értékekkel való összehasonlításával a gyógynövények gőztér alkotóinak minőségi meghatározása nem lett volna megbízhatóan kivitelezhető.

5.1.2. SPME mintavétel gyógynövények gőzteréből

A szilárdfázisú mikroextrakció (SPME) alkalmazása gyors és egyszerű megoldást nyújtott a gyógynövények illóalkotóinak kvalitatív meghatározására. A mintavételhez választott 55 °C-os hőmérséklet megfelelő nagyságúnak bizonyult ahhoz, hogy kellően nagy gőznyomást biztosítson a zárt mintavételi fiolában a gyógynövények monoterpénjei számára, ugyanakkor kellően kis hőmérsékletet ahhoz, hogy a hőérzékeny vegyületek még ne bomoljanak el.

5.1.3. Gyógynövények illóalkotói

Az egyes gyógynövények gőzterében SPME mintavétellel talált illóvegyületeket, azok t_R , KI értékeit, valamint a 45-345 Th m/z tartományban felvett össziónáramuk relatív csúcsterületeit a 4. táblázat tartalmazza.

Cickafark: A monoterpének közül nagyobb mennyiségben szabinént (14,8%), β -pinént (14,6%), limonént (6,4%), 1,8-cineolt (8,0%), cisz-szabinén-hidrátot (7,9%), borneolt (5,0%) és α -terpenil-acetátot (6,6%) találtam. A kevésbé illékony szeszkviterpének között a kariofillén E-t (8,3%) detektáltam nagyobb mennyiségben.

Kerti izsóp: Gőzterében leginkább monoterpéneket találtam. Ezek közül említésre méltó a cisz-pinokámfon (39,2%) és transz-pinokámfon (10,9%), a β -pinén (12,2%), valamint a limonén (6,4%).

Kamilla: A monoterpének között limonént (24,5%), míg a kevésbé illékony szeszkviterpének között a (E)- β -farnezeit (47,7%) találtam a gőzterében.

Kapor: A gőzterére leginkább monoterpének jelenléte a jellemző, úgymint α -fellandrént (31,0%), kaporéter (30,1%), limonén (13,9%).

Kecskeruta: A gőztéranalízis során a mindegyik gyógynövényben előforduló limonén (21,9%) mellett a metilkavikol (20,5%) és az α -terpenil-acetát (25%) volt nagyobb mennyiségben megtalálható.

Lestyán: A kecskerutához hasonlóan a gőzterében szintén a limonén (22,2%) valamint az α -terpenil-acetát (50,0%) volt az uralkodó illó komponens.

Szagos müge: Az α -felandrén (9,3%), limonén (17,7%), kaporéter (25%), *transz*-krizantém-acetát (9,7%), valamint α -terpenil-acetát (6,3%) monoterpének mellett, gőzterében kariofillén E (5,6%), α -humulén (3,9%) és *allo*-aromadendrén szeszkviterpéneket detektáltam a gőzterében.

Tárkony: A nagy mennyiségű metilkavikol (64,8%) mellett, limonén (10,3%), valamint metil-eugenol (12,5%) monoterpéneket sikerült kimutatnom az illóalkotói közül.

Lándzsás útifű: A nyákoldó hatása miatt köptetőnek is használt gyógynövényben jelentősebb mennyiségben mircén (5,9%), α -felandrén (6,8%), limonén (27,1%), kaporéter (6,8%) és metilkavikol (37,9%) monoterpéneket találtam.

Zsálya: Gőzterében a monoterpének közül α -felandrént (6,9%), limonént (8,0%), *cisz*-tujont (12,4%), *transz*-tujont (28,4%) és kaporétert (9,7%), a szeszkviterpének közül pedig kariofillén E-t (6,8%) valamint α -humulént (9,0%) detektáltam.

4. táblázat Különböző gyógynövények gőzterében azonosított vegyületek retenciós ideje (t_R), retenciós indexe (KI), valamint össziónáramuk relatív csúcsterületei.

N°	t_r /min	KI	Vegyület	Relatív csúcsterület (%)										
				Cickafark	Izóp	Kamilla	Kapor	Kecskeruta	Lestyán	Sz. müge	Tárkony	Útifű	Zsálya	
1.	6,80	911	szantolina-trién	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	7,42	931	α -tujén	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	7,65	939	α -pinén	3,4	1,2	1,4	1,4	1,7	2,0	-	2,9	2,9	1,3	
4.	8,15	954	kamfén	0,5	-	-	-	-	0,3	-	-	-	0,3	
5.	9,00	977	szabinén	14,8	2,2	1,0	-	-	0,9	-	5,2	2,8	-	
6.	9,10	980	β -pinén	14,6	12,2	0,8	-	3,1	0,6	-	-	1,1	-	
7.	9,65	993	mircén	0,4	1,7	-	-	-	1,9	-	-	-	-	
8.	10,17	1007	α -fellandré	0,3	1,0	0,8	31,0	-	1,1	9,3	-	5,9	6,9	
9.	10,97	1029	orto- v. p-cimol	2,4	2,2	6,1	3,3	6,7	2,7	3,3	1,9	6,8	1,8	
10.	11,10	1033	limonén	6,4	9,5	24,5	13,9	21,9	22,2	17,7	10,3	27,1	8,0	
11.	11,23	1036	1,8-cineol	8,0	0,7	1,2	0,6	3,8	-	-	-	-	1,6	
12.	11,50	1043	(Z)- β -ocimén	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	
13.	11,95	1054	(E)- β -ocimén	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	
14.	12,37	1064	γ -terpinén	-	0,4	-	-	-	0,4	-	-	-	-	
15.	12,52	1067	artemisszia-ke	1,6	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	
16.	12,83	1074	cisz-szabinén-hidrát	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17.	13,63	1091	terpinolén	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	
18.	14,23	1104	linalool	-	0,6	-	0,7	-	-	-	-	-	-	
19.	14,52	1111	cisz-tujon	-	0,4	0,7	2,3	-	-	3,5	-	-	12,4	

4. táblázat (folytatás)

N°	t _r /min	KI	Vegyület	Relatív csúcsterület (%)									
				Cickafark	Izóp	Kamilla	Kapor	Kecskeruta	Lestyán	Sz. müge	Tárkony	Útifű	Zsálya
20.	15,07	1125	<i>transz</i> -tujon	-	-	0,5	1,3	-	-	2,3	-	-	5,6
21.	16,18	1151	kámfor	2,8	-	1,2	2,7	2,5	-	4,2	-	3,4	28,4
22.	16,80	1165	β -pinén-oxid	0,7	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-
23.	16,87	1166	<i>transz</i> -pinokámfon	-	10,9	-	-	-	-	3,1	-	-	-
24.	17,00	1169	pinokarvon	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-
25.	17,10	1171	borneol	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9
26.	17,22	1174	<i>p</i> -menta-1,5-dién-8-ol	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27.	17,50	1179	<i>cisz</i> -pinokámfon	-	39,2	1,5	-	3,3	2,1	1,4	-	-	-
28.	18,08	1191	kaporéter	1,6	0,9	5,5	30,1	7,1	8,2	25,7	-	6,8	9,7
29.	18,32	1196	α -terpineol	1,4	-	-	-	-	2,8	-	-	-	-
30.	18,67	1203	metilkavikol	1,6	1,9	3,2	5,2	20,5	2,8	9,7	64,8	37,9	1,2
31.	20,27	1242	<i>transz</i> -krizantém-acetát	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32.	20,77	1253	karvon	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-
33.	22,50	1290	bornil-acetát	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34.	25,28	1355	α -terpenil-acetát	6,6	2,2	0,1	-	25,0	50,0	6,3	0,9	2,6	-
35.	25,40	1358	<i>neois</i> -dihidro-karveol-acetát	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
36.	26,17	1375	cikloszativén	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37.	26,73	1387	bourbonén	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38.	27,80	1412	metil-eugenol	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-
39.	27,80	1412	α -gurjunén	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-

4. táblázat (folytatás)

N°	t _r /min	KI	Vegyület	Relatív csúcsterület (%)									
				Cickafark	Izóp	Kamilla	Kapor	Kecskeruta	Lestyán	Sz. müge	Tárkony	Útifű	Zsálya
40.	28,22	1423	kariofillén E	8,3	1,7	1,0	1,4	0,8	-	5,6	1,5	2,7	6,8
41.	29,67	1458	α -humulén	0,8	-	-	1,5	-	-	3,9	-	-	9,0
42.	29,78	1461	(E)- β -farnézén	1,2	-	47,7	-	-	-	0,7	-	-	-
43.	29,97	1465	<i>allo</i> -aromadendrén	-	1,8	-	-	-	-	2,5	-	-	-
44.	30,80	1485	germakrén D	1,9	0,8	0,8	0,3	1,3	-	0,9	-	-	-
45.	34,68	1582	szpatulenol	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
46.	37,62	1660	α -biszabolol-oxid B	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-

5.1.4. SPME mintavétel gyógynövénnyel kevert takarmányok gőzteréből

Kísérleteim során a gyógynövényekkel kevert takarmányok gőzteréből szilárdfázisú mikroextrakcióval a 4.5 fejezetben leírt módon mintát vettem. A takarmányok illó terpénjeinek meghatározásához legmegfelelőbbnek a 100 µm-es PDMS bevonatú SPME mintavételi szál bizonyult. A nagy érzékenyséű 50/30 µm-es DVB/CAR/PDMS bevonatú szál alkalmazása az illó terpének detektálhatóságát nem javította, mivel nemcsak az illó terpénekre növelte meg a módszerünk érzékenységét, hanem a takarmányokban található illó zsírsavakra és azok észtereire is. Hasonló jelenséget tapasztaltam a különböző hőmérsékleten végzett HS-SPME mintavétel során is. A 40°C-os mintavételi hőmérséklet még nem biztosított megfelelő parciális gőznyomást a kevésbé illó terpének detektálásához. A 80°C-os HS-SPME mintavételi hőmérséklet viszont az egyéb illóalkotók parciális gőznyomását is megnövelte a takarmányok gőzterében, oly mértékben, hogy már észrevehetően zavarták a terpének detektálását és azonosítását. Így a takarmányminták vizsgálatánál legmegfelelőbb mintavételi hőmérsékletnek a 60 °C-ot találtam.

5.1.5. Gyógynövénnyel kevert takarmányok illóalkotói

A SPME alkalmazása gyors és egyszerű megoldást nyújtott a gyógynövényes takarmányok illóalkotóinak kvalitatív meghatározására. A mintavételhez választott 60 °C-os hőmérséklet megfelelő nagyságúnak bizonyult ahhoz, hogy kellően nagy parciális gőznyomást biztosítson a zárt mintavételi fiolában lévő gyógynövényes takarmányok terpénjei számára, ugyanakkor kellően kis hőmérsékletet ahhoz, hogy a hőérzékeny vegyületek még ne bomoljanak el.

A takarmányok illó terpénjeinek minőségi meghatározásához az illó alkotók retenciós idejét, valamint a „full-scan” üzemmódban felvett tömegspektrumait hasonlítottam össze az egyes gyógynövények illó alkotóinak retenciós idejével (3. táblázat), valamint a NIST MS adatbázis tömegspektrumaival. Az általam takarmányokban azonosított terpenoidokat és azok retenciós idejét az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat Különböző gyógynövényekkel kevert takarmányok gőzterében azonosított terpénvegyületek (+) és azok retenciós ideje (t_R).

N°	Vegyület	t_R /min	Kontroll	Cickafark	Izsóóp, zsálya, szagos müge	Kamilla	Kecskeruta	Kapor	Lándzsás útifű	Kakukkfűves széna
1	α -tujén	7,42	-	+	-	-	+	+	-	-
2	α -pinén	7,65	+	+	-	-	+	+	+	+
3	kamfén	8,15	+	+	+	-	-	-	-	-
4	szabinén	9,00	-	+	-	-	+	+	+	+
5	β -pinén	9,10	-	+	-	-	+	+	+	+
6	mircén	9,65	-	+	-	-	+	+	-	-
7	α -fellandré	10,17	-	+	-	-	+	+	-	-
8	<i>p</i> -cimol	10,97	+	+	+	-	+	+	-	+
9	limonén	11,10	+	+	+	-	+	+	+	+
10	1,8-cineol	11,23	+	+	+	-	-	-	-	-
11	γ -terpinén	12,37		+	+	-	+	+	-	+
12	linalool	14,23	+	+	+	+	+	+	+	+
13	α -tujon	15,22	+	+	+	-	-	-	-	-
14	β -tujon	15,69	-	+	+	-	-	-	-	-
15	kámfor	16,18	-	+	+	-	-	-	-	-
16	<i>transz</i> -pinokámfon	16,87	-	+	+	-	+	-	+	+
17	borneol	17,10	-	+	+	-	-	-	-	-
18	<i>cisz</i> -pinokámfon	17,50	-	-	+	-	-	-	+	+

5. táblázat (folytatás)

N°	Vegyület	t./min	Kontroll	Cickafark	Izsóp, zsálya, szagos müge	Kamilla	Kecskeruta	Kapor	Lándzsás útifű	Kakukkfűves széna
19	kaporéter	18,08	-	-	-	-	-	-	-	-
20	α -terpineol	18,32	-	+	+	-	-	-	+	+
21	metilkavikol	18,67	-	-	-	-	+	-	-	-
22	karvon	20,77	-	-	-	-	+	+	-	-
23	bornil-acetát	22,50	-	+	+	-	-	-	-	-
24	terpenil-acetát	25,28	-	-	-	-	+	-	-	-
25	β -bourbonén	26,73	-	+	-	-	-	-	-	-
26	metil-eugenol	27,80	-	-	-	-	+	-	-	-
27	kariofillén E	28,22	-	+	+	+	+	+	+	+
28	α -humulén	29,67	+	+	+	+	+	+	+	+
29	β -farnezén	29,78	+	-	-	+	-	-	-	-
30	germakrén D	30,80	-	+	-	-	-	-	-	-

5.2. Gyógynövényes takarmánnyal etetett tejelő szarvasmarhák tejsír illó terpén tartalmának vizsgálata

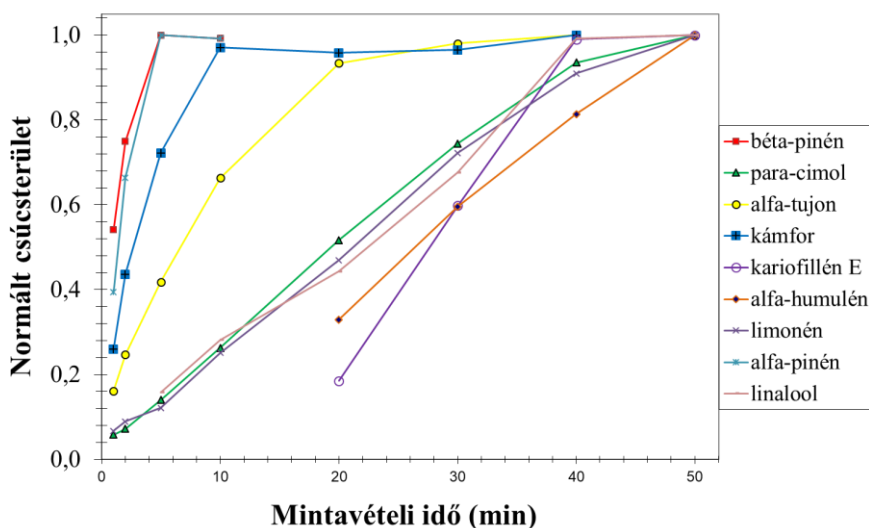
Kísérleteim során a gyógynövényekkel etetett kísérleti szarvasmarha egyedek tejsírsíjainak gőzteréből szilárdfázisú mikroextrakcióval a 4.5 fejezetben leírt módon mintát vettem.

5.2.1. HS-SPME mintavételi körülmények optimalása

A tehéntej minták vizsgálata során megfelelő ismételhetőséget csak 40 °C-os mintavételi hőmérsékleten kaptam. Ez a hőmérséklet azonban nem biztosított kellően nagy gőznyomást és ennél fogva megfelelő érzékenységet a terpének elemzéséhez. Tekintettel arra, hogy az apoláros tulajdonságokkal rendelkező terpének a tej lipofil részében a tejsírban találhatóak, ezért Abilleira és mtsai (2010) módszerét követve a tejmintákból kinyert tejsírral végeztem további vizsgálataimat.

A HS-SPME mintavétel optimalását hozzáadott terpént tartalmazó, kereskedelmi forgalomból származó vajból kinyert szarvasmarha tejsíradékkal végeztem. A vizsgált SPME szálak közül a 2 cm hosszúságú és 50/30 µm DVB/CAR/PDMS bevonatú szál alkalmazása biztosította a legnagyobb érzékenységet. A három különböző 40, 60, valamint 80 °C-os hőmérsékleten végrehajtott HS-SPME mintavételek közül a legnagyobb a 80 °C-os biztosította a méréseim legjobb érzékenységét, valamint az egyensúlyi állapot leggyorsabb beálltát. Az optimális mintavételi időt terpénekkel adalékolt tejsír gőzterének 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 és 50 perces mintavételével határoztam meg úgy, hogy ábrázoltam az egyes terpének normált csúcsterületének mintavételi időtől való függését (5. ábra). Itt jól látható, hogy az illékony β -pinén 5, a kámfor 10, az α -tujon 20, a kariofillén

pedig 40 perc után érte el a csúcsterület maximumot, azaz az egyensúlyi állapotot. Meglepő, hogy a kariofillénnél illékonyabb *p*-cimolnál, csak 50 perc után állt be az egyensúlyi állapot. Bár az α -humulénél 50 perc elteltével sem értük el a teljes egyensúlyi állapotot, azonban hosszabb mintavételi idő az érzékenységet jelentősen nem növelte, viszont jelentősen csökkentette a méréseim produktivitását. Az előbbieket figyelembe véve a tejsírmintáknál mintavételi időnek az 50 percet választottam.



5. ábra. Illó alkotók normált GC-MS csúcsterületének függése a mintavételi időtől ($T=80^{\circ}\text{C}$) szarvasmarha tejsír SPME-s gőztérbeli mintavételénél.

5.2.2. Minőségi és mennyiségi meghatározás

A tejsír minták illó terpénjeinek minőségi meghatározásához az illó alkotók retenciós idejét, valamint a „full-scan” üzemmódban felvett tömegspektrumait hasonlítottam össze az egyes gyógynövények illó alkotóinak retenciós idejével (2. táblázat), továbbá a NIST MS adatbázis tömegspektrumaival.

A tejszírok illó terpén tartalmának mennyiségi meghatározásához a mérőberendezés kalibrálását SIM (kiválasztott ion nyomon követése) üzemmódban, standard addíciós módszerrel tizenegy terpénre végeztem el. A kalibráláshoz felhasznált standard terpénvegyületeket, a mennyiségi meghatározásukhoz alkalmazott ionok tömeg/töltését, a terpének retenciósidjét, valamint az egyes terpének analitikai mérőgörbéinek lineáris tartományait, meredekségeit és korrelációs együtthatóit (R) az 6. táblázatban, tüntettem fel. Az alkotónként hét, növekvő koncentrációértéken felvett analitikai mérőgörbe lineáris tartománya szabinénre 5-770 ng/g, β -pinénre 10-1230 ng/g, kariofillénre és az α -humulénre a 20-2000 ng/g, a többi terpénre pedig a 10-1000 ng/g koncentrációtartományba esett. A mérőrendszer érzékenysége (analitikai mérőgörbe meredeksége) a tizenegy terpénre a 8-6640 g/ng értékek között változott. Legnagyobb érzékenységet metilkavikolra ($6\,640 \pm 188$ g/ng) és *p*-cimolra (6216 ± 86 g/ng), legkisebbet pedig kariofillén E-re (276 ± 8 g/ng) kaptam. A kalibráció során a mérési pontokra illesztett analitikai mérőgörbék meredekségeinek kis bizonytalanságai, valamint az egyenes illesztések 0,994-nél nagyobb korrelációs együtthatói a kalibrációim jóságát bizonyítják.

6. táblázat Terpének GC-MS meghatározásához alkalmazott ionok tömeg/töltés (m/z) értékei, retenciós idők (t_R), az analitikai mérőgörbék lineáris tartománya, átlagos meredeksége és szórása ($\pm SD$), valamint a korrelációs együtthatói (R) tejsír mintáknál.

N°	Vegyület	m/z Th	t_R (min)	Lineáris tart. (ng/g)	Meredekség $\pm SD$ (g/ng)	R
1.	α -pinén	93	7,63	10-1000	4550 \pm 64	0,999
2.	szabinén	93	9,02	5-770	3472 \pm 38	0,999
3.	β -pinén	93	9,13	10-1230	2857 \pm 74	0,997
4.	p -cimol	119	11,00	10-1000	6216 \pm 86	0,999
5.	limonén	93	11,14	10-1000	2007 \pm 36	0,998
6.	linalool	93	14,25	10-1000	945 \pm 12	0,999
7.	α -tujon	110	14,48	10-1000	797 \pm 14	0,998
8.	kámfor	95	16,19	10-1000	1418 \pm 26	0,998
9.	metilkavikol	148	18,61	10-1000	6640 \pm 188	0,994
10.	kariofillén E	133	28,06	20-2000	276 \pm 8	0,994
11.	α -humulén	93	29,50	20-2000	1576 \pm 42	0,995

5.2.3. Ismételhetőség és meghatározási határ

Méréseim ismételhetőségét adalékolt tejsír minták három-három párhuzamos elemzésével kapott koncentrációértékeinek korrigált tapasztalati szórása adta. A terpének átlagkoncentrációját az ismételhetőségekkel valamint a 10:1 jel-zaj arányhoz tartozó becsült meghatározási határokat a 7. táblázatban tüntettem fel. Tejsírok esetében az ismételhetőségek a metilkavikol kivételével 10% alattiak voltak. A becsült meghatározási határok 2-16 ng/g közötti értéket vettek fel. A legkisebb 2 ng/g értéket a p -cimolra és a metilkavikolra, a legnagyobbat pedig, 16 ng/g-ot a kariofillénre kaptam.

7. táblázat Analitikai teljesítmény adatok adalékolt tejszírminták SPME gőztér elemzésekor (C_{ad} – adalékolási koncentráció (ng/g), RSD (%) - párhuzamos elemzések során mért csúcsterületek relatív korrigált tapasztalati szórása (n=3), LOQ - a módszer becsült meghatározási határa).

N°	Vegyület	C_{ad} (ng/g)	RSD (%)	LOQ (ng/g)
1.	α -pinén	46	3,2	3
2.	szabinén	23	6,6	3
3.	β -pinén	141	3,6	4
4.	<i>p</i> -cimol	65	9,5	2
5.	limonén	143	9,8	4
6.	linalool	98	6,1	8
7.	α -tujon	66	8,6	6
8.	kámfor	47	6,7	4
9.	metilkavikol	16	12,9	2
10.	kariofillén E	388	2,5	16
11.	α -humulén	136	3,4	6

5.2.4. Terpének különböző gyógynövényekkel kevert takarmánnyal etetett tehenek tejsírjában

Borge és mtsai (2016) vizsgálták, hogy a terpenoidok a tejben vagy az abból készült tejszínben vannak-e jelen nagyobb koncentrációban. Vizsgálataik kimutatták, hogy a tejszín nagyobb mennyiségben tartalmaz terpéneket, mely az általam megfigyelt kísérleti eredményt is alátámasztja, miszerint a terpénvegyületek a tej zsírfrakciójához kötődnek, így azokat a tejszírből sokkal könnyebb detektálni. A különböző takarmányokkal etetett állatok tejsírjában azonosított és meghatározott terpéneket és azok koncentrációit a 8. táblázatban tüntettem fel.

A cickafarkos takarmánnyal etetett 1-es és 2-es kísérleti állat reggeli és esti fejesű tejeiben α -tujén, α -pinén, kamfén, szabinén, β -pinén és mircénen kívül a tejsírokban további hat terpént, *p*-cimolt, limonén,

metilkavikolt, kariofillén E-t és α -humulént azonosítottam. Legnagyobb koncentrációban kariofillént (179 ng/g), legkisebben pedig metilkavikolt (2 ng/g) találtam.

Az izsóppal, zsályával és szagosmügével etetett kísérleti tehének tejeiben α -pinént, kamfént, szabinént, β -pinént, limonént, valamint kariofillént és α -humulént sikerült kimutatnom. A tejszírokban – nagyon kis mennyiségben – ezeken kívül még kámfort és metilkavikolt találtam. A legnagyobb koncentrációban két szeszkviterpén, a kariofillén (128-470 ng/g) és az α -humulén (90-430 ng/g), míg legkisebb koncentrációban a kámfor (3-7 ng/g) és a metilkavikol (2-39 ng/g) voltak jelen. A 2-es számú kísérleti szarvasmarha esti ($2E^2$) fejésű tejének tejszírájában 114 ng/g koncentrációban talált linalool valószínűsíthetően külső szennyezésből származik.

A kamillával etetett kísérleti tehének tejszíráiban talált öt terpén közül legjelentősebb koncentrációban (28-71 ng/g) a limonén, legkisebb koncentrációban (2-3 ng/g) pedig a *p*-cimol volt jelen, míg a szeszkviterpének közül csak kariofillént és α -humulént találtam. A kamilla illóanyagának jelentős részét adó és a takarmányban is számottevő mennyiségben talált β -farnezent a tejsírban nem tudtam detektálni.

A kecskerutával kiegészített takarmánnyal etetett két kísérleti egyed tejszíráiban α -pinént, limonént és α -humulént tudtam csak azonosítani, melyek koncentrációi 6 és 37 ng/g közötti értékeket vettek fel.

A kaporral etetett tehének $1E^5$, a $2R^5$ és a $2E^5$ jelzésű tejszíráiban α -pinént (5-23 ng/g), α -fellandrént, *p*-cimolt (6-8 ng/g), limonént (18-35 ng/g) és α -humulént (11-40 ng/g) mutattam ki. Az $1R^5$ tejnél az előbbieken kívül még kariofillént (41 ng/g) találtam.

A lándzsás útifűvel kevert takarmánnyal etetett tehének tejszíráiban α -pinén, limonén és α -humulén jelent meg. Ezen három terpén

koncentrációja az „1R⁶”, „1E⁶”, „2R⁶” és „2E⁶” jelzésű tejszírokban rendre α -pinénnél 6, 16, 12 és 6 ng/g, limonénnél 9, 13, 15 és 15 ng/g, α -humulénre pedig 9, 22, 36 és 11 ng/g volt.

A kakukkfűves szénával takarmányozott tehének tejsírjaiban a kakukkfű jellemző illó vegyületei közé tartozó timolt nem tudtam kimutatni. Azonban a kakukkfű másik jellemző illó alkotója a *p*-cimol, a szénában talált kis mennyisége ellenére megjelent a tejszírokban, ahol koncentrációja 2-5 ng/g közötti értéket vett fel. A 1-es kísérleti tehén reggeli és esti fejésű tejében α -pinént találtam, melynek koncentrációja 4-22 ng/g közötti értéket vett fel a tejszírokban. Ugyanezen tehén előbbi két tejének tejsírjában találtam még 6-9 ng/g közötti koncentrációban β -pinént. Limonént, ugyan nagyon kis koncentrációban, de találtam a 2-es kísérleti tehén tejsírjaiban. Az α -humulén szintén nagyon kis koncentrációban (3-14 ng/g), de mind a négy tejsírban jelen volt.

A legtöbb azonosított komponens jelenlétéről már beszámoltak tejek, vagy sajtok esetében (Dumont és Adda, 1978; Guichard és mtsai, 1987; Buchin és mtsai, 1998, 1999; Viallon és mtsai, 1999, 2000; Fernandez és mtsai, 2003). Tornambé és mtsai (2006) tejelő tehéneket legeltettek gyógynövényes legelőn és tejsírjaikat dinamikus SPME módszerrel vizsgálták. A legnagyobb mennyiségben, a monoterpének közül a β -pinént, α -pinént, γ -terpinént, limonént, terpinolént és α -fellandrént, míg a szeszkviterpének közül a β -kariofillént és α -kopaént azonosították. Vasta és mtsai (2012) anyajuhokat legeltettek és vizsgálták a tejszírok aromakomponenseinek alakulását. A terpénvegyületek közül α -pinént, *p*-cimolt és a limonén sikerült kimutatniuk. Borge és mtsai (2016) legeltetett és istállóban takarmányozott tehének tejéből fölözött tejszínek terpén tartalmát hasonlították össze. Az istállóiban takarmányozásból származó mintákban és a

legeltetett egyedek mintáiban is α -pinént és limonént tudtak kimutatni, azonban az α -pinén mennyisége a legeltetett egyedek, míg a limonén mennyisége az istállóban takarmányozott egyedek mintáiban volt szignifikánsan nagyobb. A szakirodalmi eredmények (Buchin és mtsai, 1999) és a saját eredményeim alapján kijelenthető, hogy a limonén az egyik legjellemzőbb monoterpén a tejek és tejtermékek esetében, mivel a legtöbb növényben jelen van.

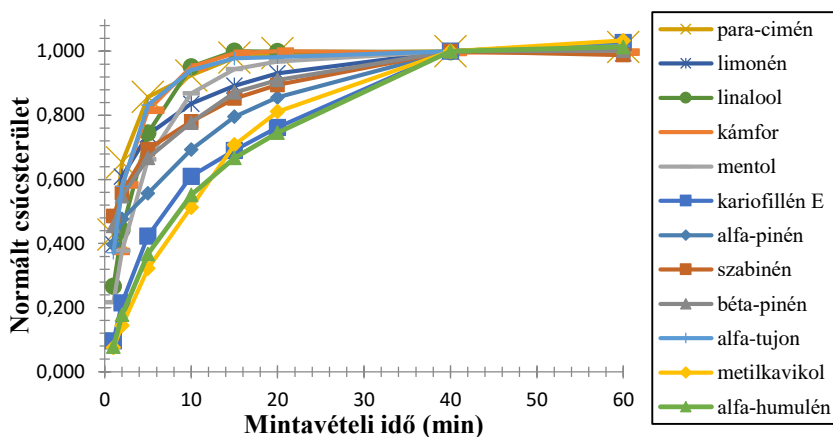
8. táblázat Különböző összetételű takarmányokkal etetett állatok tejszírából azonosított terpéneket (+), azok GC-MS retenciós ideje és átlagos koncentrációi.

N°	Vegyület	t _R min	Kontrol	Cickafark				Izóp, Zsálya, Szagosmüge				Kamilla				Kecskeruta				Kapor				Lándzsás útifű				Kakukkfűves széna								
				1R ¹	1E ¹	2R ¹	2E ¹	1R ²	1E ²	2R ²	2E ²	1R ³	1E ³	2R ³	2E ³	1R ⁴	1E ⁴	2R ⁴	2E ⁴	1R ⁵	1E ⁵	2R ⁵	2E ⁵	1R ⁶	1E ⁶	2R ⁶	2E ⁶	1R ⁷	1E ⁷	2R ⁷	2E ⁷					
1	<i>alfa-tujén</i>	7,42		8	7	4	4																													
2	<i>alfa-pinén</i>	7,65	10	31	33	12	19	22	79	38	35	9	23	6	8	6	24	6	5	23	22	5	7	6	16	12	6	14	22	4	7					
3	kamfén	8,15	+	+	+	+	+	+	+	+	+																									
4	szabinén	9,00		23	28	13	18	2	6	3	3				6																					
5	<i>béta-pinén</i>	9,10		70	54	21	29	16	104	47	37																									
6	<i>mircén</i>	9,65		+	+	+	+																													
7	<i>alfa-fellandré</i> n	10,17																		+	+	+	+													
8	<i>para-cimén</i>	10,97	3	9	5	6	4	4	6	6	8	3	3	3	2					6	6	6	8													
9	limonén	11,10	15	69	45	48	26	55	89	89	114	49	37	71	28	24	37	20	27	35	30	18	22	9	13	15	15									
10	linalool	14,23									114																									
11	kámfor	16,18						3	7	3	4																									
12	4-allylanizol	18,67		9	3	2	2	7	2	4	39																									
13	kariofillén E	28,22	20	179	108	55	67	128	470	180	183	38	58							41																
14	<i>alfa-humulén</i>	29,67	16	34	20	8	11	90	430	130	140	44	46	16	12	21	23	23	22	40	36	11	14	9	22	36	11	12	14	5 [#]	3 [#]					

5.3. Gyógynövényekkel kiegészített takarmánnyal etetett kecskék tejeinek illó terpén tartalma

5.3.1. HS-SPME mintavételi körülmények optimalálása

A HS-SPME mintavétel optimalálását hozzáadott terpént tartalmazó, kontroll kecsketej mintákkal végeztem. A vizsgált SPME szálak közül a 2 cm hosszúságú és 50/30 μm DVB/CAR/PDMS bevonatú szál alkalmazása biztosította a legnagyobb érzékenységet. A három különböző 40, 60, valamint 80 °C-os SPME mintavételi hőmérsékletek közül a 40 °C még nem biztosított megfelelő érzékenységet a kevésbé illó alkotók számára, 80 °C-on pedig már a minta felszínének „bőrösödése” csökkentette az érzékenységet, ezért vizsgálataimhoz az SPME gőztér-mintavételt 60 °C-on hajtottam végre. Az optimális mintavételi időt terpénnel adalékolt kecsketejek gőztérének 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40, és 60 perces mintavételével határoztam meg úgy, hogy ábrázoltam az egyes terpének normált csúcsterületének mintavételi időtől való függését (6. ábra). Az ábrán jól látható, hogy az illékonyabb β -pinén, kámfor, α -tujon, α -pinén, szabinén, *p*-cimol, limonén, linalool és mentol már 20 perc után elérte a csúcsterület maximumot, azaz az egyensúlyi állapotot. Nem meglepő módon a kevésbé illékonyabb metilkavikolnál, kariofilénnél és humulénnél csak 40 perc után állt be az egyensúlyi állapot. Ezek ellenére mégis a 60 perces mintavételi időt választottam kecsketejminták esetében, mivel megfelelő ismételhőséget csak ezzel a mintavételi idővel tudtam produkálni, melynek oka valószínűleg a tejmintákban fellelhető kis mennyiségű terpénvegyület érzékenysége volt a környezeti paraméterekre.



6. ábra Illó alkotók GC-MS csúcsterületének függése a mintavételi időtől ($T=60^{\circ}\text{C}$) kecsketej SPME-s gőztérbeli mintavételénél.

5.3.2. Minőségi és mennyiségi meghatározás

A kecsketej minták illó terpénjeinek minőségi meghatározásához az illó alkotók retenciós idejét, valamint a „full-scan” üzemmódban felvett tömegspektrumait hasonlítottam össze az egyes gyógynövények illó alkotóinak retenciós idejével (2. táblázat), valamint a NIST MS adatbázis tömegspektrumaival.

Kecsquetej minták esetében az alkotónként nyolc különböző koncentrációértéken felvett analitikai mérőgörbék lineáris tartománya szabinénre 10-1320 ng/g, α -pinénre 5-1040 ng/g, p -cimolra 15-1300 ng/g, limonénre 10-1270 ng/g, linaloolra 10-1300 ng/g, α -tujonra 15-1530 ng/g, kámforra 10-1400 ng/g és mentolra a 10-1425 ng/g, β -pinénre 5-1370 ng/g, metilkavikolra 10-1370 ng/g kariofillén E-re 5-1470 ng/g és α -humulénre pedig a 5-1350 ng/g koncentrációtartományba esett. Legnagyobb érzékenységet p -cimolra (10817 ± 96 g/ng) és metilkavikolra (9969 ± 161 g/ng), legkisebbet pedig kariofillénre (1733 ± 35 g/ng) és kámforra (1875 ± 34 g/ng) kaptam. A kalibráció során a mérési pontokra

illesztett analitikai mérőgörbék meredekségeinek kis bizonytalanságai, valamint az egyenes illesztések 0,996-nál nagyobb korrelációs együtthatói, mind a kalibrációnak kellő pontosságát bizonyítják.

9. táblázat Terpének GC-MS meghatározásához alkalmazott ionok tömeg/töltés (m/z) értékei, retenciós idők (t_R), az analitikai mérőgörbék lineáris tartománya, átlagos meredeksége és szórása (\pm SD), valamint korrelációs együtthatói (R) kecsketej mintáknál.

N°	Vegyület	m/z (Th)	t_R (min)	Lineáris tart. (ng/g)	Meredekség (\pm SD) (g/ng)	R
1	α -pinén	93,1	9,703	5-1040	3115 \pm 71	0,996
2	szabinén	93,05	11,383	10-1320	2610 \pm 45	0,997
3	β -pinén	93,15	11,48	5-1370	3282 \pm 83	0,996
4	<i>p-cimol</i>	119,15	13,673	15-1300	10817 \pm 96	0,997
5	limonén	68,1	13,83	10-1270	5421 \pm 32	0,998
6	linalool	71,1	17,297	10-1300	3437 \pm 15	0,998
7	α -tujon	81,15	17,493	15-1530	2235 \pm 12	0,998
8	kámfor	95,15	19,29	10-1400	1875 \pm 34	0,999
9	mentol	71,1	20,66	10-1425	2788 \pm 81	0,999
10	metilkavikol	148,2	21,837	10-1370	9969 \pm 161	0,998
11	kariofillén E	69,15	31,423	5-1470	1733 \pm 35	0,999
12	α -humulén	93,15	32,85	5-1350	5196 \pm 69	0,998

5.3.3. Ismételhetőség, meghatározási határ

Méréseim ismételhetőségét adalékolt nyers kecsketej minták három-három párhuzamos elemzésével kapott koncentrációértékek korrigált tapasztalati szórása adta. A terpének átlagkoncentrációját az ismételhetőségekkel valamint a 10:1 jel-zaj arányhoz tartozó becsült meghatározási határokat a 10. táblázatban tüntettem fel.

Kecsketejek esetében az ismételhetőségek az α -tujon kivételével 8%-nál jobbak. A becsült meghatározási határok 1-8 ng/g közötti értéket vettek fel. A legkisebb 1 ng/g értéket a β -pinénre, *p*-cimolra és a limonénre, a legnagyobbat pedig, 8 ng/g-ot, a linaloolra kaptam.

10. táblázat Analitikai teljesítmény adatok adalékolt kecsketej SPME gőztér elemzésekor (C_{ad} – adalékolási koncentráció (ng/g), RSD (%) - párhuzamos elemzések során mért csúcsterületek relatív korrigált tapasztalati szórása (n=3), LOQ - a módszer becsült meghatározási határa).

N°	Vegyület	C_{ad} (ng/g)	RSD (%)	LOQ (ng/g)
1	α -pinén	29	7,5	3
2	szabinén	43	7,8	3
3	β -pinén	31	6,7	1
4	<i>p</i> -cimol	56	7,5	1
5	limonén	38	5,7	1
6	linalool	51	7,4	8
7	α -tujon	71	9,3	6
8	kámfor	40	7,8	2
9	mentol	43	7,8	2
10	metilkavikol	44	7,2	2
11	kariofillén E	34	7,7	2
12	α -humulén	29	7,0	2

5.3.4. Illó terpének különböző gyógynövényekkel etetett kecskék tejében

Számos tanulmány igazolja, hogy nagy számban és változatosságban fordulnak elő terpenoidok a tejben. Ezek mennyisége és minősége függ a tejelő állományokkal etetett takarmány botanikai összetételétől (Fernandez és mtsai, 2003; Prache és mtsai, 2005; Tornambé és mtsai, 2006; Fedele és mtsai, 2004). A tejben megjelenő mono- és szeszkviterpén vegyületek aránya függ attól, hogy ugyanezen vegyületek milyen összetételben voltak jelen az állatok takarmányában (Viallon és mtsai, 2000; Bugaud és mtsai,

2001a). Azonban a terpénvegyületek mennyiségi és minőségi analízisét eddig kizárólag a nyers tejből elválasztott zsírfrakcióból tudták elvégezni. Az általam kifejlesztett új HS-SPME-GC-MS analitikai eljárás azonban lehetővé teszi a terpenoidok minőségi és mennyiségi meghatározását közvetlenül nyers tej mintamatrixokból, így az analízis nem igényel előzetes mintaelőkészítési eljárást.

A kecskék etetési kísérleteiből származó kecsketej minták terpén koncentrációit (ng/g) és az eredmények relatív szórását (%) a 11. táblázatban tüntettem fel. Az útifüves takarmánnyal etetett kecskék tejében 6 illó terpénvegyületet azonosítottam a 12 vegyületből, melyekre a HS-SPME-GC-MS módszeremet kalibráltam. Az útifüves tejben mért illó terpén koncentrációk 7-32 ng/g közötti értékeket vettek fel. A gázkromatográfias módszerem kidolgozása során SIM üzemmódban felvett 10 monoterpén közül az útifüves tejben azonosítottam α -pinént 7 ng/g, szabinént 3 ng/g, β -pinént 2 ng/g, *p*-cimolt 23 ng/g, limonént 32 ng/g és α -tujont 20 ng/g koncentrációban.

A zsályás takarmánnyal etetett kecskék tejében 8 illó terpénvegyületet azonosítottam a 12 vegyületből, melyekre a HS-SPME-GC-MS módszeremet kalibráltam. A zsályás tejben mért illó terpén koncentrációk 1-49 ng/g közötti értékeket vettek fel. A gázkromatográfias módszer megalkotása során SIM üzemmódban felvett 10 monoterpén közül a zsályás tejben azonosítottam α -pinént 15 ng/g, szabinént 5 ng/g, β -pinént 6 ng/g, *p*-cimolt 31 ng/g, limonént 49 ng/g, α -tujont 10 ng/g és metilkavikolt 1 ng/g koncentrációban. A kalibráció során használt 2 szeszkviterpén vegyület közül α -humulént azonosítottam 3 ng/g koncentrációban.

A tárkonyos takarmánnyal etetett kecskék tejében 6 illó terpénvegyületet azonosítottam. A tárkonyos tejben 1-12 ng/g

koncentrációértékek között figyeltem meg terpéneket. A kalibrációhoz használt 10 monoterpén közül a tárkonyos tejben α -pinént 3 ng/g, β -pinént 1 ng/g, *p*-cimolt 1 ng/g, limonént 1 ng/g és α -tujont 12 ng/g koncentrációban azonosítottam. A kalibráció során használt 2 szeszkviterpén vegyület közül kariofillén E-t azonosítottam 2 ng/g koncentrációban.

A szagos mûgés takarmánnyal etetett kecskék tejében 6 illó terpénvegyületet azonosítottam. A mért illó terpén koncentrációk 1-13 ng/g közötti értékeket vettek fel. Monoterpének közül a szagos mûgés kecsketejben azonosítottam α -pinént 1 ng/g, β -pinént 1 ng/g, *p*-cimolt 1 ng/g, limonént 2 ng/g, α -tujont 13 ng/g és kámfort 2 ng/g koncentrációban. A kalibráció során használt 2 szeszkviterpén vegyület közül egyik sem jelent meg a szagos mûgés tejben.

A kamillás takarmánnyal etetett kecskék tejében 7 illó terpén vegyületet azonosítottam a kalibrációhoz használt 12 vegyületből. A kamillás tejben meghatározott illó terpén koncentrációk 2-54 ng/g közötti értékeket vettek fel. A kalibrációhoz felhasznált 10 monoterpén közül a kamillás tejben azonosítottam α -pinént 14 ng/g, szabinént 6 ng/g, β -pinént 6 ng/g, *p*-cimolt 37 ng/g, limonént 54 ng/g és α -tujont 14 ng/g koncentrációban. A kalibráció során használt 2 szeszkviterpén vegyület közül α -humulént azonosítottam 2 ng/g koncentrációban.

A cickafarkos takarmánnyal etetett kecskék tejében 5 illó terpén vegyületet azonosítottam a 12 vegyületből, melyekre a HS-SPME-GC-MS módszeremet kalibráltam. A cickafarkos tejben mért illó terpén koncentrációk 1-18 ng/g közötti értékeket vettek fel. A gázkromatográfias módszerem kidolgozásakor SIM üzemmódban felvett 10 monoterpén közül a cickafarkos tejben azonosítottam limonént, α -tujont és kámfort.

A kontroll kecskék tejében, melyek takarmányozása során semmilyen gyógynövény kiegészítést nem alkalmaztam 5 terpénvegyületet azonosítottam abból a 12 vegyületből, melyekre az analitikai módszert kalibráltam. A kontroll tejben mért terpén koncentrációk 1-13 ng/g értékek közé estek. Az azonosított terpének közül 4 monoterpén (α -pinén, szabinén, p -cimol, limonén) és egy szeszkviterpén (α -humulén).

Kecsketejekkel végzett méréseim relatív szórása a 10%-ot egyetlen egyszer haladta meg, az útifüves takarmánnyal etetett kecskék tejében azonosított p -cimol (13,6%) esetében.

De Noni és Battelli (2008) azt is megállapították, hogy a különböző legelők botanikai összetétele változásokat idéz elő a tejek és a belőlük készült sajtok terpén profiljában. Ez az eredmény egybevág az általam mért eredményekkel miszerint más-más gyógynövényekkel takarmányozva, a tehén és kecsketejek terpénösszetétele változik.

11. táblázat Gyógynövényes kecsketej minták terpén koncentrációja (ng/g) és az eredmények relatív szórása, RSD (%),
(n=3).

N°	Vegyület	Kontroll		Cickafark		Zsályá		Szagos müge		Kamilla		Tárkony		Útifű	
		\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD
1.	α -pinén	2	5,6	–	–	15	6,3	1	8,5	13	7,1	3	3,1	7	4,7
2.	szabinén	2	7,4	–	–	5	8,8	–	–	6	6,3	–	–	3	4,2
3.	β -pinén	–	–	–	–	7	5,0	1	7,5	7	3,7	1	8,8	2	3,4
4.	<i>p</i> -cimol	2	9,1	–	–	34	9,1	1	9,1	40	9,2	1	4,7	23	13,6
5.	limonén	13	7,2	1	7,9	53	7,3	2	5,9	57	7,3	1	1,8	32	9,6
6.	linalool	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7.	α -tujon	–	–	18	7,6	11	6,3	13	3,0	15	3,6	13	8,5	20	1,2
8.	kámfor	–	–	2	7,6	–	–	2	2,6	–	–	–	–	–	–
9.	mentol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10.	metilkavikol	–	–	–	–	2	6,3	–	–	–	–	–	–	–	–
11.	kariofillén E	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	9,8	–	–
12.	α -humulén	1	8,6	–	–	3	9,1	–	–	2	8,0	–	–	–	–

5.4. Gyógynövényekkel adalékolt takarmánnyal etetett tejelő szarvasmarhák vérplazmáinak és tejeinek, valamint azokból készült sajtoknak az illó terpén tartalma

Poulopoulopu és mtsai (2012a) α -pinént, limonént és β -kariofillént orálisan adagoltak tejelő juhoknak és vizsgálták azok vérbe, tejbe és sajtba jutását, melyhez SPME mintavételi eljárást alkalmaztak és a GC-MS elemzéseik alapján arra az eredményre jutottak, hogy a terpének kivétel nélkül megjelentek a kezelt egyedek vérében és onnan átszármaztak a tejbe, valamint a sajtgyártás során a kísérleti egyedek tejeiből készült sajtokból is kimutathatók voltak. Ezek a megállapítások alátámasztják az alább bemutatott kísérleti eredményeimet.

5.4.1. Vérplazma minták

Néhány tanulmány már korábban is foglalkozott a terpénvegyületek vérbe történő átszármazásának vizsgálatával, azonban egyikben sem HS-SPME-GC-MS módszerrel végezték az elemzést. Estell és mtsai (2010) szilárdfázisú extrakcióval végezték a mintavételt és gázkromatográfiás lángionizációs detektoros módszerrel (GC-FID) a terpének detektálását. Boyle és mtsai (2002) az ausztráliában élő közönséges rókakuzuk vérében vizsgálták SPME mintavételi eljárással azok táplálékául szolgáló eukaliptusz növényből származó cineol mennyiségét ugyancsak GC-FID módszerrel. Malecky és mtsai (2012) pedig dinamikus SPME eljárással mintavételezték, majd gázkromatográfiás módszerrel vizsgálták a terpenoidokat kecskék vérplazmájából.

Kísérleteim során a gyógynövényekkel kevert vérplazmák gőzteréből szilárdfázisú mikroextrakcióval a 4.5 fejezetben leírt módon mintát vettem. A plazmaminták elemzésekor féltő volt, hogy a kelleténél

nagyobb mintavételi hőmérséklet okozta plazmafehérjék kicsapódása hatással lesz a terpének detektálhatóságára, és mivel a mintavétel optimális paramétereinek meghatározására kellő mennyiségű minta nem állt rendelkezésemre, ezért a biztonságosabb, 40 °C-os hőmérsékleten hajtottam végre a mintavételt a gőztérből.

A gyógynövényekkel etetett tehének vérplazmáiban azonosított és meghatározott terpéneket és azok koncentrációit a 12. táblázatban tüntettem fel. A cickafarkos takarmányban talált huszonhat terpén közül 12 terpén, az α -tujén, az α -pinén, a *p*-cimol, a limonén, az 1,8-cineol, az α -tujon, a β -tujon, a kámfor, a *transz*-pinokámfon, a *cisz*-pinokámfon, az α -terpineol és a bornil-acetát jelenlétét mutattam ki a plazmában. A plazmában azonosított terpenil-acetátot a takarmányban jelenlévő illékony zsírsavak és azok észterei okozta spektrális zavarások miatt takarmányból – a tömegspektrum alapján – nem tudtam azonosítani.

Az izsóppal, zsályával, szagosmügével kevert takarmánnyal etetett kísérleti egyedek vérplazmájában 10 terpént tudtam azonosítani, úgymint, α -pinén, kamfén, szabinén, β -pinén, limonén, *cisz*-pinokámfon, α -terpineol, bornil-acetát, kariofillén E és α -humulén.

A kecskerutával kevert takarmányban talált tizenkilenc terpén közül 6 monoterpén (α -tujén, α -pinén, szabinén, β -pinén, *p*-cimol, limonén) és egy szeszkviterpén (α -humulén) jelent meg a vérplazmában.

A kamillával etetett tehének vérplazmájában csak α -pinént és *p*-cimolt tudtam azonosítani. A kaporral takarmányozott tehének vérplazmájának vizsgálatához nem állt kellő mennyiségű minta a rendelkezésemre.

A lándzsás útifűvel kevert takarmánnyal etetett tehének vérplazmájában kettő monoterpént (α -pinént és limonént), valamint egy szeszkviterpént (α -humulént) tudtam azonosítani.

A kakukkfűves takarmánnyal etetett egyedek vérplazmájában azonosított terpének közül hiányzik a kakukkfű jellemző illóvegyületei közé tartozó timol, melyet már a kakukkfűves szénából sem sikerült azonosítani. A kakukkfű másik jellemző illó alkotója a p -cimol, a szénában talált kis mennyisége ellenére azonban megjelent a vérplazmában. A p -cimolon kívül sikerült azonosítanom α -pinént, szabinént, β -pinént, limonént és kariofillén E-t. A kontroll vérplazmában a monoterpének közül α -pinén, kamfén és limonén, a szeszkviterpének közül pedig az α -humulén jelentek meg.

12. táblázat Különböző gyógynövényekkel etetett tehének vérplazmájában HS-SPME-GC-MS módszerrel azonosított terpének (+) és retenciós idejük

N ^o	Vegyület	t _R (min)	Kontroll	Cickafark	Izsóp, zsálya, szagos müge	Kamilla	Kecskeruta	Lándzsás útifű	Kakukkfűves széna
1	α -tujén	7,42	–	+	–	–	+	–	–
2	α -pinén	7,65	+	+	+	+	+	+	+
3	kamfén	8,15	+	–	+	–	–	–	–
4	szabinén	9,00	–	–	+	–	+	–	+
5	β -pinén	9,10	–	–	+	–	+	–	+
6	<i>p</i> -cimol	10,97	–	+	–	+	+	–	+
7	limonén	11,10	+	+	+	–	+	+	+
8	1,8-cineol	11,23	–	+	–	–	–	–	–
9	α -tujon	15,22	–	+	–	–	–	–	–
10	β -tujon	15,69	–	+	–	–	–	–	–
11	kámfor	16,18	–	+	–	–	–	–	–
12	<i>transz</i> - pinokámfon	16,87	–	+	–	–	–	–	–
13	<i>cisz</i> -pinokámfon	17,50	–	+	+	–	–	–	–
14	α -terpineol	18,32	–	+	+	–	–	–	–
15	bornil-acetát	22,50	–	+	+	–	–	–	–
16	kariofillén E	28,22	–	–	+	–	–	–	+
17	α -humulén	29,67	+	–	+	–	+	+	–

5.4.2. Tehéntej minták

Tejmintáknál a 40 °C-os mintavételi hőmérséklet még nem biztosított kellő érzékenységet, míg 80 °C-on pedig a tejek bőrösödése, valamint a melegítés hatására keletkező aromakomponensek (laktonok) már számottevő zavarást okoztak, ezért kompromisszumként a tejek elemzését is 60 °C-on végeztem.

A különböző gyógynövényekkel etetett állatok tejeiben azonosított terpéneket és azok retenciós idejét a 13. táblázatban tüntettem fel. A két cickafarkkal etetett tehén reggeli és esti fejésű tejeiben α -tujént, α -pinént, kamfént, szabinént, β -pinént és mircént mutattam ki.

Az izsóppal, zsályával, szagosmügével kevert takarmánnyal etetett állatok tejében hat monoterpént (α -pinén, kamfén, szabinén, β -pinén és limonén) és két szeszkviterpént (kariofillén E-t és α -humulént) azonosítottam.

A kamillával etetett kísérleti egyedek tejeiben α -pinént, limonént és α -humulént találtam, ezeken felül az 1-es kísérleti egyed reggeli és esti fejésű tejeiben megjelent a *p*-cimol, valamint ugyanennek az egyednek az esti fejésű tejében a kariofillén E is.

A kecskerutával kevert takarmányban talált tizenkilenc terpén közül öt monoterpén (α -tujén, α -pinén, szabinén, *p*-cimol, limonén) és egy szeszkviterpén (α -humulén) jelent meg az 1-es kísérleti egyed esti fejésű tejében. A 2-es kísérleti egyed esti fejésű tejében α -pinént, *p*-cimolt és limonént, az 1-es és 2-es kísérleti egyed reggeli fejésű tejeiben pedig α -pinént, limonént és kariofillén E-t tudtam csak azonosítani.

A kísérleti egyedek tejeiben talált terpének számát vizsgálva a legnagyobb szórást a kaporral kevert takarmánnyal etetett szarvasmarhák tejénél tapasztaltam. A kaporral kevert takarmányban kimutatott tizennégy

terpénből az „1E⁵” jelzésű tejben kilenc, a „2E⁵”-ben öt, a „2R⁵”-ben négy, a „1R⁵”-ben pedig csak egy terpént tudtam kimutatni a kidolgozott analitikai módszerrel.

A lándzsás útifüves takarmányban talált tíz terpén (α -pinén, szabinén, β -pinén, limonén, linalool, *transz*-pinokámfon, *cisz*-pinokámfon, α -terpineol, kariofillén, α -humulén) közül csak kettő (α -pinén, limonén) jelent meg mind a négy tejmintában. A „2E⁶” tejben az előbbi két vegyületen kívül az α -humulént sikerült kimutatnom.

A kakukkfüves szénában azonosított terpénvegyületek közül hiányzik a kakukkfűre jellemző timol, azonban a *p*-cimol, mely a másik kakukkfűre jellemző monoterpén a szénában talált kis mennyisége ellenére megjelent a kísérleti egyedek tejeiben. A *p*-cimolon kívül az 1-es kísérleti egyedtől származó reggeli és esti fejésű tejekben egyaránt azonosítottam az α -pinént.

13. táblázat Különböző gyógynövényekkel etetett szarvasmarhák tejeiben azonosított terpéneket (+) és azok retenciós ideje (t_R)

N°	Vegyület	t_R / min	Kontrol	Cickafark				Izóp, Zsálya, Szagosmüge				Kamilla				Kecskeruta				Kapor				Lándzsás útifű				Kakukkfűves széna			
				1R ¹	1E ¹	2R ¹	2E ¹	1R ²	1E ²	2R ²	2E ²	1R ³	1E ³	2R ³	2E ³	1R ⁴	1E ⁴	2R ⁴	2E ⁴	1R ⁵	1E ⁵	2R ⁵	2E ⁵	1R ⁶	1E ⁶	2R ⁶	2E ⁶	1R ⁷	1E ⁷	2R ⁷	2E ⁷
1	<i>alfa</i> -tujén	7,42		+	+	+	+									+				+											
2	<i>alfa</i> -pinén	7,65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	kamfén	8,15	+	+	+	+	+	+	+	+	+																				
4	szabinén	9,00		+	+	+	+	+	+	+	+					+				+											
5	<i>béta</i> -pinén	9,10		+	+	+	+	+	+	+	+					+					+	+									
6	mircén	9,65		+	+	+	+													+											
7	<i>alfa</i> -fellandré	10,17																		+	+	+									
8	<i>para</i> -cimén	10,97	+					+	+	+	+	+	+			+		+		+	+	+						+	+	+	+
9	limonén	11,10	+					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10	<i>cisz</i> -pinokámfon	17,50								+	+																				
11	kariofillén E	28,22	+					+	+	+	+		+																		
12	<i>alfa</i> -humulén	29,67						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+						+					

5.4.3. Sajt minták

A HS-SPME-GC-MS módszerrel vizsgált sajt mintákban összesen tizenkettő különböző terpént azonosítottam, amelyek eredményeit a 14. táblázatban tüntettem fel. A friss natúr trappista sajt öt terpént, úgymint α -pinént, mircént, limonént, γ -terpinént és α -humulént tartalmazott. A friss gyógynövényes trappista sajtban az előzőeken kívül még hat újabb terpént, α -tujént, szabinént, β -pinént, α -fellandrént, p -cimolt és kariofillén E-t találtam. A két sajt minta gőzteréből HS-SPME módszerrel vett mintának teljes spektrumletapogatási („full-scan”) üzemmódban kapott GC-MS ionkromatogramjait a 14. és a 15. mellékletben tüntettem fel. Összevetve a két ionkromatogramot jól látható az előbbi hat vegyület kromatográfias csúcsának megjelenése, valamint a β -pinén kromatográfias csúcsterületének jelentős növekedése a gyógynövényes trappista ionkromatogramjában (15. melléklet).

A natúr gomolyában három monoterpént, α -pinént, mircént és p -cimolt találtam. A gyógynövényes gomolya sajtban előbbi hármon kívül további öt alkotót, szabinént, β -pinént, α -fellandrént és limonént azonosítottam. A natúr gomolya és gyógynövényes gomolya sajtok illó terpén tartalma közti különbséget jól szemléltetik a két sajt gőzteréből vett HS-SPME-GC-MS ionkromatogramok (16. és 17. melléklet).

A gyógynövényes rézüstben készített sajt gőzterében a γ -terpinén kivételével a gyógynövényes trappistában azonosított összes alkotót (α -tujén, α -pinén, szabinén, β -pinén, mircén, α -fellandrént, p -cimol, limonén, kariofillén, α -humulén) megtaláltam (18. melléklet).

Delgado és mtsai (2011) HS-SPME-GC-MS módszerrel vizsgálták kecskesajtok aroma összetételét, az SPME mintavételhez – hozzám hasonlóan – ők is a gyártó által is javasolt DIV/CAR/PDMS szálát

választották és az általam vizsgált terpének közül a limonént és a cimolt sikerült kimutatniuk. Ezzel szemben Pinho és mtsai (2003, 2004) „Terrincho” juhsajtok illókomponenseit vizsgálták különböző SPME szálakkal és a legmegfelelőbbnek a CAR/PDMS szálát találták, mellyel a junipén és limonén monoterpéneket sikerült azonosítaniuk. Ziino és mtsai (2005) „Provola dei Nebrodi” sajtok SPME-GC-MS analízise során szintén limonént azonosított, mint legjellemzőbb terpén vegyület, mely eredmény nem meglepő Viallon és mtsai (1999) megállapítása alapján, miszerint a szénhidrogének, különösen a limonén egyenesen a tehének takarmányából származik át a sajtokba. Ez az állítás megalapozza azt az eredményt is, hogy a kontroll egyedek tejéből készült sajtokban is megtalálható az említett monoterpén.

Giuseppe és mtsai (2005) „Piedmont” rikotta sajtok nyomkövethetőségét vizsgálták azok mono- és szeszkviterpén profilján keresztül. Arra a következtetésre jutottak, hogy a terpenoidok nem csak arra alkalmasak, hogy a különböző évszakokban legelőn legeltetett tehének és juhok, vagy tehének és kecskék elegyített tejéből előállított sajtokat megkülönböztessük egymástól, hanem arra is, hogy az egyes legelőkre visszavezethessük a sajtok származását. Mivel a legelőkön a növények botanikai összetétele eltérő, így a sajtok terpén profilja is ennek megfelelően változik, ahogy az látható az általunk vizsgált gyógynövényes legelőn legeltetett tehének tejéből készült sajtok esetében is. Chion és mtsai (2010) „Toma piemontese” sajtok terpén profilját vizsgálták az évszakok függvényében. A különböző évszakokban készült sajtok terpén összetétele eltérést mutatott és a sajtok terpén profilja tükrözte a sajttej terpén profilját, ezzel is bizonyítva, hogy a tejből a terpének átvihetők a sajtokba, az általuk azonosított fő terpénvegyületek a limonén, az α -pinén és a β -pinén

voltak, ugyanezen terpének jelenlétéről számoltak be a „Fontina Valle d’Aosta”, a „Bitto” és a PDO sajtok esetében, melyeket az olasz alpok legelőin legeltetett állatok tejéből készítettek (De Noni és Battelli, 2008). Nogueira és mtsai (2005) Minas sajtok vizsgálata során főként α -pinént, limonént, kopaént és α -humulént találtak. Mallia és mtsai (2005) a „purge and trap” és az SPME mintavételi eljárás hatékonyságát hasonlították össze három, eltérő típusú kemény sajton (Gruyere, Manchego, Ragusano). Terpénvegyületek közül kizárólag a limonént sikerült azonosítaniuk Manchego sajtok esetében, azonban eredményeik bizonyítják, hogy az általam is választott SPME mintavételi eljárás sokkal hatékonyabbnak bizonyul nem csak terpenoidok, hanem más illókomponensek vizsgálata során is, mint a „purge and trap” technika.

14. táblázat Friss sajtok gőzterében HS-SPME-GC-MS módszerrel azonosított (+) illóterpének.

N ^o	Vegyület	Friss natúr trappista	Friss gyógynövényes trappista	Natúr gomolya	Gyógynövényes gomolya	Gyógynövényes rézüst
1	α -tujén	–	+	–	–	+
2	α -pinén	+	+	+	+	+
3	szabinén	–	+	–	+	+
4	β -pinén	–	+	–	+	+
5	mircén	+	+	+	+	+
6	α -fellandré	–	+	–	+	+
7	<i>p</i> -cimol	–	+	–	+	+
8	limonén	+	+	+	+	+
9	γ -terpinén	+	+	–	–	–
10	kariofillén E	–	+	–	–	+
11	α -humulén	+	+	–	–	+

A hathetes érleléssel készült trappista sajtok gőzterében, mind a gyógynövényesnél, mind a kontroll natúrnatál 12 illó terpént, úgymint α -pinént, szabinént, β -pinént, mircént, p -cimolt, limonént, γ -terpinént, linaloolt, *transz*-pinokámfont, *cisz*-pinokámfont, bornil-acetátot és α -humulént azonosítottam. A két sajt ionkromatogramjából azonosított gőztérkomponensek csúcsterületeit a 15. táblázatban tüntettem fel. A táblázatból jól látható, hogy a gyógynövényes sajt gőzterében azonosított komponensek csúcsterületei az α -humulén kivételével, mintegy két-háromszorosai a kontroll mintaként szolgáló natúr trappista sajt ugyanezen illó alkotói csúcsterületeinek. Kivételt képzett ezalól a bornil-acetát, ahol közel 12-szeres a különbség.

15. táblázat Hathetes érlelésű trappista sajtok gőzterének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramjában (m/z 93+119) azonosított illó terpének csúcsterületei, relatív bizonytalanság: 10%)

N ^o	Vegyület	Érett natúr (N) trappista (x10 ⁵)	Érett gyógynövényes (Gy) trappista (x10 ⁵)	Arányok (Gy/N)
1	α -pinén	2,96	6,49	2,2
2	szabinén	0,49	0,75	1,5
3	β -pinén	1,50	4,71	3,1
4	mircén	10,2	20,7	2,0
5	<i>p</i> -cimol	11,9	30,2	2,5
6	limonén	255,3	749,6	2,9
7	γ -terpinén	2,69	8,75	3,3
8	linalool	1,60	3,72	2,3
9	<i>t</i> -pinokámfon	6,08	15,36	2,5
10	<i>c</i> -pinokámfon	9,10	29,60	3,3
11	bornil-acetát	0,32	3,75	11,7
12	α -humulén	1,20	1,33	1,1

De Noni és Battelli (2008) „Bitto” sajtok terpén összetételét vizsgálták az érés során. A sajttejben detektált terpének megjelentek az érlelt sajtokban is, így ez a tanulmány is alátámasztja eredményeimet, valamint megerősíti azt a tényt, melyet már Dumont és Adda is leírtak 1978-ban, hogy a sajtgyártásnak és a sajtok érlelésének nincs hatása a sajtok terpén profiljára. A 16. táblázatban tüntettem fel a friss natúr és gyógynövényes trappista sajtok illó terpénjeire mért csúcsterületeket. A friss és érlelt sajtok vizsgálatai során kapott eredményeim az mutatják, hogy az érés során megjelennek olyan terpénvegyületek is mind a natúr, mind a gyógynövényes sajtok esetében, melyek a friss sajtokból nem detektálhatók. Ennek oka az

érés során bekövetkező vízvesztés következtében létrejövő koncentrációnövekedés, mely okozhatja, hogy a korábban kimutatási határ alatt lévő terpének is kimutatható koncentrációban dúsulnak az érlelt sajtokban. Bontinis és mtsai (2012) tradicionális (Xinotyri) görög sajtok, míg Kondyli és mtsai (2016) sólében érlelt fehér kecskesajtok illókomponenseit vizsgálták az érés során. Bontinis és mtsai (2012), valamint Chion és mtsai (2010) eredményei hasonlóan alakultak, mint az általam kapott eredmények, megállapították, hogy a friss sajtokból kimutatható terpének koncentrációi az érés folyamán változnak. A szerzők azonban a terpén profilban nem találtak az eredményeimhez hasonló változást, nem észlelték újabb terpenoidok megjelenését. Ezzel szemben de Carvalho és da Fonseca (2006) eredményei szerint a terpén profil az érés során jelentősen megváltozhat különböző biológiai átalakulások következtében. Azt tapasztalták, hogy az érés első szakaszában (45. napig) a terpének mennyisége növekszik. Az általam vizsgált sajtok 30 napos érlelésen estek át a terpének mennyiségének növekedése a szakirodalmi adatok alapján megalapozott, mivel további érlelés nem történt, a későbbi terpén koncentráció csökkenést, melyet Kondyli és mtsai (2016) publikáltak nem tudom alátámasztani saját eredményekkel.

16. táblázat Friss trappista sajtok gőzterének HS-SPME-GC-MS módszerrel felvett ionkromatogramjában (m/z 93+119) azonosított illó terpének csúcsterületei, relatív bizonytalanság: 10%)

N°	Vegyület	Natúr trappista (x10 ⁵)	Gyógynövényes trappista (x10 ⁵)	Arányok (Gy/N)
1	α -tujén	n.d.	0,57	-
2	α -pinén	0,67	9,49	14,2
3	szabinén	n.d.	1,46	-
4	β -pinén	n.d.	3,34	-
5	mircén	1,95	0,56	0,29
6	α -fellandrén	n.d.	0,99	-
7	<i>p</i> -cimol	n.d.	0,99	-
8	limonén	40,32	11,5	0,29
9	γ -terpinén	1,78	1,01	0,57
10	linalool	0,94	0,48	0,51
11	<i>t</i> -pinokámfon	n.d.	n.d.	-
12	<i>c</i> -pinokámfon	n.d.	n.d.	-
13	bornil-acetát	n.d.	n.d.	-
14	kariofillén E	n.d.	5,55	-
15	alfa-humulén	0,50	4,36	8,7

n.d. – nem detektált.

6. Összefoglalás és következtetések

A gyógynövények zárt gőzterének 55 °C-on történő, rövid idejű (5 min) szilárdfázisú mikroextrakciós (SPME) mintavétele megfelelőnek bizonyult az illóolaj-alkotó monoterpének és származékaik minőségi meghatározásához.

A gőztér illóalkotóinak a gázkromatográf-ioncsapdás-tömegspektrométeres (GC-ITMS) elemzéseim során alkalmazott retenciós index és tömegspektrum felhasználásával végzett azonosítása sikeresnek mondható. Ioncsapdás analizátor alkalmazása mellett és kizárólag csak a mért tömegspektrumok értelmezésével, illetve csak a számolt retenciós indexek irodalmi értékekkel való összehasonlításával, a gyógynövények gőztér alkotóinak minőségi meghatározása nem lett volna kivitelezhető.

A vizsgált SPME szálak közül az 50/30 µm-es DVB/CAR/PDMS bevonatú 2 cm hosszú SPME szál bizonyult legalkalmasabbnak a vérplazma-, a tej-, a tejsír- és a sajtminták illó alkotóinak vizsgálatára.

A vérplazma és a tehéntej minták közvetlen vizsgálata során a terpénekre csak kvalitatív, míg kecsketej minták esetében kvalitatív és kvantitatív elemzést is végeztem. A retenciós idő elemzéséből kapott információk a minőségi meghatározás megbízhatóságát tovább növelték. A plazma és tehéntej minták illó terpéneinek kvantitatív meghatározását a párhuzamos meghatározások nagy szórása, rossz ismételhetsége miatt nem tudtam elvégezni, azonban kecsketejek esetében a párhuzamos elemzések 10% alatti relatív szórása és jó ismételhetsége lehetővé tették az illó terpének kvantitatív elemzését is. Sajtok esetében a kvantitatív meghatározást nagymértékben megnehezítette az egyes mintamátrixok jelentős különbözősége, valamint az, hogy a melegítés hatására, 60 °C-on

szilárd és folyadék fázisra szétváló minták adalékolását nem sikerült megoldani.

A tejből kinyert tejszírok, valamint a kecsketejek illó alkotóinak meghatározására kifejlesztett HS-SPME-GC-MS eljárás nagy dinamikus tartománya, kellő érzékenysége és jó ismételtetősége (RSD<13%) következtében alkalmasnak bizonyult a tejszírokban és tejekben nagyon kis koncentrációban megjelenő illó terpének mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív meghatározására.

A vérplazmákból és közvetlenül a tejmintákból leginkább csak az illékonyabb monoterpéneket sikerült kimutatnom, míg a kevésbé illékony szeszkviterpéneket nem. Ez azzal magyarázható, hogy utóbbiak a detektálásukhoz elégséges gőztérbeli koncentrációt a vizsgálatok során alkalmazott 40 °C, illetve 60 °C-os mintavételi hőmérsékleteken nem érték el. A tejből kinyert tejsír mintáknál használt 80 °C-os mintavételi hőmérsékletre, valamint a kecsketejeknél 60 °C-os mintavételi hőmérsékletre kidolgozott HS-SPME-GC-MS módszer már lehetővé tette – a monoterpének mellett – a kevésbé illékony szeszkviterpének (kariofillén E, α -humulén) mennyiségi meghatározását is.

A tejminták tejsírsírjainak elemzése alkalmával a gyógynövények illó alkotói közül α -pinént és α -humulént 28, limonént 26, *p*-cimolt 16, kariofillén E-t 13, β -pinént 11, szabinént 9, metilkavikolt 8, kámfort pedig 4 mintából sikerült mennyiségileg meghatározni. A tejszírokban legnagyobb koncentrációban a kariofillént E-t (470 ng/g) és az α -humulént (430 ng/g), míg a legkisebb koncentrációban a *p*-cimolt (2 ng/g) és a kámfort (2 ng/g) határoztam meg (17. táblázat).

A gyógynövényes kecsketej minták elemzése során α -pinént 5, szabinént 3, β -pinént 5, *p*-cimolt 5, limonént 6, α -tujont 6, kámfort 2,

mentolt 0, metilkavikolt 1, kariofillén E-t 1 és α -humulént kétféle gyógynövénnyel etetett kecsketejben azonosítottam, míg linaloolt egyik ilyen mintából sem sikerült detektálni. A legtöbb terpént (8) a zsályás kecsketejben, míg a legkevesebbet (3) a cickafarkos kecsketejben sikerült kimutatnom (18. táblázat).

17. táblázat A vizsgált terpéneket a kimutatási határnál nagyobb koncentrációban tartalmazó minták száma (N), a tejszírokban mért terpén koncentrációk minimuma, maximuma, aritmetikai átlaga, szórása és mediánja

Terpén koncentráció (ng/g)									
	α -pinén	szabinén	β -pinén	<i>p</i> -cimol	limonén	kámfor	metilkavicol	kariofillén E	α -humulén
N	28	9	11	16	26	4	8	13	28
Min	4	2	3	2	3	3	2	39	3
Max	79	28	104	9	114	7	39	470	430
Átlag	18	11	36	4	38	4	8	127	46
Szórás	16	10	31	2	28	2	13	116	83
Medián	17	10	33	3	33	3	10	121	64

18. táblázat Kontroll és 6 különböző gyógynövényes kecsketejből meghatározott illó terpének átlagos koncentrációja (ng/g) és azok relatív szórásai (RSD (%), n=3)

N	Vegyület	Kontroll		Cickafarkos		Zsályás		Szagos mügés		Kamillás		Tárkonyos		Útifüves	
		\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD	\bar{C}	RSD
1.	α -pinén	2	6,3	–	–	15	6,3	1	8,5	13	7,1	3	3,1	7	4,7
2.	szabinén	2	8,8	–	–	5	8,8	–	–	6	6,3	–	–	3	4,2
3.	β -pinén	–	–	–	–	7	5,0	1	7,5	7	3,7	1	8,8	2	3,4
4.	<i>p</i> -cimol	2	9,1	–	–	34	9,1	1	9,1	40	9,2	1	4,7	23	13,6
5.	limonén	13	7,3	1	7,9	53	7,3	2	5,9	57	2,4	1	1,8	32	9,6
6.	linalool	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7.	α -tujon	–	–	18	7,6	11	6,3	13	3	15	3,6	13	8,5	20	1,2
8.	kámfor	–	–	2	7,6	–	–	2	2,6	–	–	–	–	–	–
9.	mentol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10.	metilkavikol	–	–	–	–	2	6,3	–	–	–	–	–	–	–	–
11.	kariofillén E	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	9,8	–	–
12.	α -humulén	1	9,1	–	–	3	9,1	–	–	2	8,0	–	–	–	–

A sajtok illó terpéntartalmának kvalitatív elemzése során a gyógynövényes takarmányt fogyasztott állatok tejéből készült friss sajtokban az illó terpének száma gomolya sajt esetében 3-ról 7-re, trappista sajtban 5-ről 11-re növekedett a gyógynövényes takarmányozás következtében. A hathetes érlelésű gyógynövényes és kontroll (natúr) trappista sajtban talált illó terpének száma, valószínűleg az érlelés során fellépő vízvesztés okozta koncentrációnövekedés következtében a korábbi 5-ről, illetve 11-ről 12-12-re növekedett. Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a gyógynövényes takarmány kiegészítés, a kontroll mintához (natúr trappista) képest mintegy két-háromszorosára növelte az azonosított illó komponensek koncentrációját a vizsgált sajtban (gyógynövényes trappista).

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Hanczné Dr. Lakatos Erika tanszékvezető asszonynak, hogy biztosította a feltételeket doktori munkám elvégzéséhez.

Köszönöm Prof. Dr. Szigeti Jenőnek a Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer- tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola Pulay Gábor Élelmiszertudományi Doktori Program egykori programvezetőjének, hogy felhívta figyelmemet a téma aktualitására, valamint Prof. Dr. Varga Lászlónak a Pulay Gábor Élelmiszertudományi Doktori Program jelenlegi programvezetőjének a sok támogatást és útmutatást.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Ajtony Zsolt docens úrnak a doktori tanulmányaim során nyújtott szakmai segítségéért és tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Schmidt János professzor úrnak és Dr. Zsédely Eszternek a takarmányozási kísérlet beállításában és a gyógynövények beszerzésében nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Csató József mezőgazdasági termelőnek a kecskékkal végzett etetési kísérletek helyszínének, kísérleti és kontroll egyedeinek biztosításáért, valamint az etetésekben és mintavételezésekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm a Bicskei Mezőgazdasági Zrt. munkatársainak a szarvasmarhákkal végzett etetési kísérletek elvégzését és a tej, vér, valamint az általuk készített sajtminták laboratóriumba szállítását.

Továbbá köszönetemet fejezem ki a Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar Élelmiszertudományi Tanszéke

valamennyi dolgozójának, hogy támogattak doktori tanulmányaim során és segítettek disszertációm létrejöttét.

Valamint hálás szívvel szeretném megköszönni családom segítségét, megértését, türelmét és önzetlen támogatását, amellyel hozzásegítettek céljaim eléréséhez.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt, a GOP-1.1.1-11-2012-0077 számú projekt, a GINOP-2.2.1-15-2016-00022 és az EFOP-3.6.2-16-2017-00012 azonosítószerű projekt támogatásával jöhetett létre. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

8. Új tudományos eredmények

1. Élelmiszer mátrixokban előforduló 12 terpénvegyület elválasztására, valamint azok nagyérzékenységű, szelektív azonosítására gázkromatográfunk injektálási hőmérsékletének, deszorpciós idejének, vivőgáz térfogatáramának, kolonna hőmérséklet programjának, továbbá a gázkromatográfhoz kapcsolt ionsapda, illetve a későbbiek során kvadrupol analizátorral ellátott tömegspektrométer ionforrás hőmérsékletének, pásztázási sebességének, pásztázott ionok tömegszámának és pásztázási idejének helyes megválasztásával, optimalizálásával gázkromatográf-tömegspektrometriás (GC-MS) módszert dolgoztam ki.
2. Gőztér (HS) mintavételes szilárdfázisú mikroextrakciós (SPME) módszert fejlesztettem ki tejszírok mono- és szeszkviterpén tartalmának meghatározásához. A korábban kidolgozott GC-MS eljárással mérve, HS-SPME mintavételt alkalmazva, meghatároztam 12 mono- és szeszkviterpénnel adalékolt tejszír gőzteréből az SPME szál bevonatára adszorbeált terpének mennyiségének mintavételi idő és hőmérséklet függését, továbbá a tejszír HS-SPME mintavételének optimális hőmérsékletét és időtartamát.
3. A tejszírok terpén koncentrációjának HS-SPME-GC-MS vizsgálatára kifejlesztett analitikai módszerem alkalmazhatóságát összesen 12 mono- és szeszkviterpén metanolos standard oldatával, különböző koncentrációban adalékolt tejszírok elemzésével kapott teljesítményjellemzők (meghatározási határ, lineáris tartomány, érzékenység, ismételhetség) meghatározásával igazoltam.

4. A tejsír mintamárixra kifejlesztett HS-SPME-GC-MS eljárással meghatároztam 28, gyógynövényes takarmányozás alá vetett kísérleti szarvasmarha tejmintáinak tejsírjában a terpének koncentrációit. A tehenek tejsírjában a kontroll mintához képest α -pinént 28, szabinént 9, β -pinént 11, *p*-cimolt 16, limonént 26, kámfort 4, metilkavikolt pedig 8 mintából mutattam ki, bizonyítva ezzel azt, hogy a tehenek takarmányának egyes terpénalkotói a laktáció során átjutnak az állatok tejébe.
5. A gyógynövényes takarmánnyal etetett kecskék tejének mono- és szeszkviterpén koncentrációja meghatározásához egy újabb HS-SPME mintavételi módszert fejlesztettem ki. Az SPME szálát a terpénvegyületekkel adalékolt nyers kecsketejek zárt gőzterébe vittem és a tejminták állandó kevertetése mellett a kifejlesztett GC-MS eljárás segítségével megmértem az SPME szál bevonatában oldott terpének koncentrációjának mintavétel időtől és hőmérséklettől való függését. Meghatároztam a nyers kecsketejek HS-SPME mintavételének optimális hőmérsékletét és időtartamát.
6. Azért, hogy igazoljam a kecsketej minták elemzéséhez kifejlesztett HS-SPME-GC-MS analitikai módszer jóságát, összesen 12 mono- és szeszkviterpén vegyület metanolos standardoldatával különböző koncentrációban adalékolt kecsketej minták HS-SPME-GC-MS elemzésének eredményeiből meghatároztam az analitikai módszerem lineáris tartományát, érzékenységet, ismételhetőségét, valamint meghatározási határát.
7. A kecsketej mintamárixra kifejlesztett HS-SPME-GC-MS eljárással meghatároztam 6 gyógynövényes takarmánnyal etetett kecske tejének terpénkoncentrációit. A kontroll mintához képest α -pinént 5,

szabinént 3, β -pinént 5, p -cimolt 5, limonént 6, α -tujont 6, kámfort 2, metilkavikolt 1, kariofillén E-t 1, α -humulént pedig 2 esetben mutattam ki. A legtöbb terpént (8) a zsályás, míg a legkevesebbet (3) a cickafarkos kecsketejéből azonosítottam.

8. A gyógynövényes takarmánnyal etetett tehenek vérplazmájából egy újabb HS-SPME-GC-MS módszerrel számos, a gyógynövényekből származó terpénvegyületet sikerült kimutatnom annak bizonyításául, hogy a gyógynövényes etetés során a terpének a takarmányból a tejelő állat vérébe juthatnak. Egy másik, ám ugyancsak HS-SPME-GC-MS vizsgálattal, gyógynövényes takarmánnyal etetett tehenek tejéből készült sajtmintákból sikerült terpéneket kimutatnom. Ezek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a gyógynövény eredetű terpénvegyületek a tejelő állatok vérből nemcsak az állatok tejébe, illetve tejszírába kerülhetnek át, hanem azok tejéből készült sajtokba is átvihetők.

9. Irodalomjegyzék

- Abilleira, E., Renobales, M., Nájera, A. I., Virto, M., Ruiz de Gordo, J. C., Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barron L. J. R. (2010) An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 120, 1162–1169.
- Adams, R. P. (2001) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Published Corporation.
- Adegoke, G. O., Iwahashi, H., Komatsu, Y., Obuchi, K., Iwahashi, Y. (2000) Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice. *Aframomum danielii*. *Flavour and Fragrance Journal* 15, 147-150.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Ryan, A. (2009) Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry. *Food Chemistry* 113, 208-215.
- Aguinaga, N., Campillo, N., Viñas, P., Hernández-Córdoba, M. (2007) Determination of 16 polycyclic products aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 596, 285-290.
- Alanis, P., Ashkan, S., Krauter, C., Campbell, S., Hasson, A. S. (2010) Emissions of volatile fatty acids from feed at dairy facilities. *Atmospheric Environment* 44, 5084-5092.

- Alissandrakis E., Tarantilis P.A., Harizanis P.C., Polissiou M. (2007) Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry* 100, 396–404.
- Alves, J. A., Lima, L. C. D. O., Dias, D. R., Nunes, C. A., Schwan, R. F. (2010) Effects of spontaneous and inoculated fermentation on the volatile profile of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) fermented beverages. *International Journal of Food Science and Technology* 45, 2358-2365.
- Ampuero, S., Bosset, J. O. (2003) The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 94, 1-12.
- Annous, B.A., Fratamico, P.M., Smith, J.L. (2009) Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science* 74, 24-36.
- Aprèa E., Biasioli F., Carlin S., Endrizzi I., Gasperi F. (2009): Investigation of volatile compounds in two raspberry cultivars by two headspace techniques: solidphase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (SPME/GC-MS) and proton-transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4011–4018.
- Arancibia C., Jublot, L. Costell E., Bayarri S. (2011): Flavour release and sensory characteristics of o/w emulsions: influence of composition, microstructure and rheological behaviour. *Food Research International* 44, 1632–1641.
- Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fiber. *Journal of Analytical Chemistry* 62, 2145-2148.

- Atanda, O. O., Akpan, I., Oluwafemi, F. (2006) The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control* 18, 601-607.
- Atkins, P. W. (2002) Fizikai kémia (I-III. kötet), Nemzeti Tankönyvkiadó
- Augusto, F., Leite e Lopes, A., Alcaraz Zini, C. (2003) Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 160–169.
- Babulka, P. (2004) Ismerjük fel a vadon termő gyógynövényeket, Gabo könyvkiadó és kereskedelmi Kft.
- Baccouri O., Bendini A., Cerretani L., Guerfel M., Baccouri B., Lercker G., Zarrouk M., Miled D.D.B. (2008) Chemical composition and oxidative stability of tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry* 111, 322–328.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21, 33–42.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 4, 446–475.
- Bakker J. (1995) in: A.G. Gaonkar (Ed.), *Ingredients Interactions: Effects on Food Quality*, Dekker, New York, pp. 411–439
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S. (2011) Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 4, 1-26.
- Baranauskiene R., Venskutonis P.R., Dewettinck K., Verhe R. (2006) Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.)

- flavors encapsuled into milk protein-based matrices. *Food Research International* 39, 413–425.
- Barba, C., Santa-Maria, G., Flores, G., Herraiz, M., Calvo, M. M. (2010) Enantiomeric analysis of chiral compounds in irradiated foods using multidimensional gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 752-756.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Careri, M., Mangia, A., Parolari, G., Spagnoli, S., Virgili, R. (1994) Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1170-1176.
- Barboni, T., Luro, F., Chiaramonti, N., Desjobert, J.M., Muselli, A., Costa, J. (2009) Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry* 116, 382–390.
- Baser, K. H. C., Demirci, F. (2007) Chemistry of essential oils. In: Berger RG (ed) *Flavours and fragrances—chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin, pp 43–86.
- Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2010) *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*.
- Basheer, C., Lee, H. K. (2004) Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples. *Journal of Chromatography A* 1047, 189–194.
- Beaulieu J.C., Lea J.M. (2006) Characterization and semiquantitative analysis of volatiles in seedless watermelon varieties using solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7789–7793.

- Bellesia, F., Pinetti, A., Pagnoni, U., Rinaldi, R., Zucchi, C., Caglioti, L., Palyi, G. (2003) Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese. *Food Chemistry* 83, 55-61.
- Belletti, N., Sado, S. K., Tabanelli G., Lanciotti, R., Gardini, F. (2010) Modeling of combined effects of citral, linalool and β -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 283-289.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T. and Remmal, A. (2004) Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Applied Microbiology* 38, 454–458.
- Bergamini, C. V., Wolf, I. V., Perotti, M. C., Zalazar, C. A. (2010) Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research* 94, 79-89.
- Bernáth, J., Németh, É. (2007) Gyógy- és fűszernövények gyűjtése, termesztése és felhasználása, Mezőgazdaiadó, Budapest.
- Bicas J.L., Barros F.F.C., Wagner R., Godoy H.T., Pastore G.M. (2008) Optimization of R-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35, 1061–1070.
- Bicchi, C., Drigo, S., Rubiolo, P. (2000) Influence of fiber coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 892, 469-485.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., Rubiolo, P. (2008) Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A* 1184, 220–233.

- Bontinis, Th. G., Mallatou, H., Pappa, E. C., Massouras, Th., Alichanidis, E. (2012) Study of proteolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research* 105, 193-201.
- Borge, G. I. A., Sandberg, E., Øyaas, J., Abrahamsen, R. K. (2016) Variation of terpenes in milk and cultured cream from Norwegian alpine rangeland-fed and in-door fed cows. *Food Chemistry* 199, 195-202.
- Boutou S., Chatonnet P. (2007) Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A* 1141, 1–9.
- Boyle, R. R., McLean, S., Brandon, S., Pass, G. J., Davies, N. W. (2002) Application of solid-phase microextraction to the quantitative analysis of 1,8-cineole in blood and expired air in a Eucalyptus herbivore, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of Chromatography B* 780, 397-406.
- Buchin, S., Martin, B., Dupont, D., Bornard, A., Achilleos, C. (1999) Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical and rheological and sensory properties of cheese. *Journal of Dairy Research* 66, 579–588.
- Buchin, S., Salmon, J.-C., Carnat, A.-P., Berger, T., Bugaud, C., Bosset, J. O. (2002) Identification de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et benzéniques dans un lait d’alpage très riche en ces substances. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93, 199–216.
- Bugaud, C., Buchin, S., Coulon, J.-B., Hauwuy, A., Dupont, D. (2001a) Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty

- acide and volatile compounds composition of milk. *Lait* 81, 401-414.
- Bugaud, C., Buchin, S., Noël, Y., Tessier, L., Pochet, S., Martin, B., Chamba, J. F. (2001b) Relationships between Abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. *Lait* 81, 593-607.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Caccioni, D.R., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A. and Ruberto, G. (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* 43, 73–79.
- Cais-Sokolińska, D., Majcher, M. (2010) Sensory properties and volatile composition of full and non-fat cheese produce from curd-ripened fried acid tvarog. *Acta Alimentaria* 39, 69-80.
- Cajka T., Hajslova J., in: Jeleń H (Ed.), (2012) Food Flavors. Chemical, Sensory and Technological Properties, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 355–407.
- Camara J.S., Alves M.A., Marques J.C. (2006) Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in madeira wines. *Talanta* 68, 1512–1521.
- Capelle, N. (1997) Interpretation of results obtained by chromatography-olfaction. Clermont Ferrand: Laboratoire Faveur, Engineering report ENSAIA and DEA de Biotechnologies et Industries alimentaires

- Carasek E., Pawliszyn J. (2006) Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8688–8696.
- Cardeal Z.L., Gomes da Silva M.D.R., Marriott P.J. (2006) Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2823–2836.
- Carrillo J.D., Garrido-Lopez A., Tena M.T. (2006) Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1102, 25–36.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1914–1920.
- Cava, R. Nowak, E. Taboada, A. Marin-Iniesta F. (2007) Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection* 70, 2757-2763.
- Cerrutti, P., Alzamora, S.M. (1996) Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *Journal of Food Microbiology* 29, 379-386.
- Chen J.L., Yan S., Feng Z., Xiao L., Song Hu X. (2006) Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Yali

- pear (*Pyrus bertschneideri* Reld) during storage. *Food Chemistry* 97, 248–255.
- Chen, Y., Shirey, R. E., Sidisky, L. M. (2010) Determination of diacetyl in butter and air samples by SPME coupled with GC-MS. *Chromatographia* 72, 999-1004.
- Cheong, K. W., Tan, C. P., Mirhosseini, H., Chin, S. T., Man, Y. B. C., Hamid, N. S. A., et al. (2011) Optimization of equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds of Malaysian soursop (*Annona muricata*): comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS). *Food Chemistry* 125, 1481-1489.
- Chion, A. R., Tabacco, E., Giaccone, D., Peiretti, P. G., Battelli, G., Borreani, G. (2010) Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and „toma piemontese” cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chemistry* 121, 393-399.
- Cho M.J., Buescher R. (2011) Degradation of cucumber flavor aldehydes in juice. *Food Research International* 44, 2975–2977.
- Coleman, W. M., Lawson, S. (1998) Solid-phase microextraction gas chromatographic-mass selective detection analysis of selected sources of menthol. *Chromatography Science* 36, 401-405.
- Collomb, M., Butikofer, U., Spahni, M., Jeangros, B., Bosset, J. O. (1999) Fatty acid and glyceride composition of cow's milk fat in high- and lowland regions. *Sciences des Aliments* 19, 97-110.
- Cornu, A., Carnat, A.-P., Martin, B., Coulon, J.-B., Lamaison, J.-L., Berdagué, J.-L. (2001) Solid-phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 203-209.

- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170–175.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. and Trombetta, D. (2007) Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55, 6300–6308.
- Csapó, J., Csapóné Kiss, Zs. (2002) Tej és tejtermékek a táplálkozásban Mezőgazda Kiadó
- Daifas, D.P., Smith, J.P., Blanchfield, B., Sanders, G., Austin, J.W., Koukoutsis, J. (2004) Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology* 94, 313–322.
- De Carvalho, C. C. C. R., Da Fonseca, M. M. R. (2006) Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances* 24, 134-142.
- De Frutos, M., Sanz, J., Martínez-Castro, I. (1991) Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 524-530.
- De Noni, I., Battelli, G. (2008) Terpenes and fatty acid profiles of milk fat and “Bitto” cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. *Food Chemistry* 109, 299-309.
- Delgado F. J., González-Crespo J., Cava R., García-Parra J., Ramírez R. (2010) Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of

- a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry* 118, 182–189.
- Delgado F. J., González-Crespo J., Cava R., Ramírez R. (2011) Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry* 129, 1156-1163.
- Dharmawan J., Kasapis S., Curran P., Johnson J.R. (2007) Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: freshly-squeezed juice. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 228-232.
- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F., Sahin, F. (2008) Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *International Journal of Food Microbiology* 124, 179-182.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308–316.
- Du, X., Song, M., Rouseff, R. (2011) Identification of new strawberry sulfur volatiles and changes during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 1293-1300.
- Ducki S., Miralles-Garcia J., Zumbé A., Tornero A., Storey D.M. (2008) Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta* 74, 1166–1174.
- Dumont, J. P., Adda, J., (1978) Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheese volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 364-367.
- Erkaya, T., Şengül, M. (2011) Comparison of volatile compounds in yoghurts made from cows', buffaloes', ewes' and goats' milks. *International Journal of Dairy Technology* 64, 240-246.

- Estell, R. E., Utsumi, S. A., Cibils, A. F. (2010) Measurement of monoterpenes and sesquiterpenes in serum, plasma and rumen fluid from sheep. *Animal Feed Science and Technology* 158, 104-109.
- Estevez M., Ramirez R., Ventanas S., Cava R. (2007) Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT - Food Science and Technology* 40, 58–65.
- Farajzadeh, M. A., Djozan, D., Nouri, N., Bamorowat, M., Shalamzari, M. S. (2010) Coupling stir bar sorptive extraction-dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples followed by GC-FID and GC-MS determinations. *Journal of Separation Science* 33, 1816-1828.
- Fedele, V., Claps, S., Rubino, R., Sepe, L., Cifuni, G. F. (2004) Variation in terpene content and profile in milk in relation to the dominant plants in the diet of grazing goats. *South African Journal of Animal Science* 34, 145-147.
- Feng, Y.-L., Zhu, J., Sensenstein, R. (2005) Development of a headspace solid-phase microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk. *Analytica Chimica Acta* 538, 41-48.
- Fernandez, C., Astier, C., Rock, E., Coulon, J.-B., Berdagué J.-L. (2003) Characterization of milk by analysis of its terpene fractions. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 445-451.
- Fernández-García, E., Imhof, M., Schlichtherle-Cerny, H., Bosset, J. O., Nuñez, M. (2008) Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal* 18, 147-157.

- Field, J. A., Nickerson, G., James, D. D., Heider, C. (1996) Determination of essential oils in hops by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1768-1772.
- Filho, A. M., dos Santos, F. N., Pereira, P. A. D. P (2010) Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta* 81, 346-354.
- Forde, C. G.; Cox, A.; Williams, E. R.; Boss, P. K. (2011) Associations between the sensory attributes and volatile composition of Cabernet Sauvignon wines and the volatile composition of the grapes used for their production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2573-2583.
- Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A. and Ricci, D. (2005) Composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* from Italy. *Chemistry of Natural Compounds* 41, 604-606.
- Gioacchini, A. M., De Santi, M., Guescini, M., Brandi, G., Stocchi, V. (2010) Characterization of the volatile organic compounds of Italian 'Fossa' cheese by solidphase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 3405-3412.
- Giuseppe, Z., Manuela, G., Marta, B., Vincenzo, G. (2005) Application of artificial neural network on mono- and sesquiterpenes compounds determined by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the Piedmont ricotta cheese traceability. *Journal of Chromatography A* 1071, 247-253.

- Grandison, A.S., Manning, D.J., Thomson, D.J., Anderson, M. (1985) Chemical composition, rennet coagulation properties and flavour of milks from cows grazing ryegrass or white clover. *Journal of Dairy Research* 52, 33-39.
- Green J.A., Parr W.V., Breitmeyer J., Valentin D., Sherlock R. (2011) Sensory and chemical characterisation of Sauvignon blanc wine: Influence of source of origin. *Food Research International* 44, 2788-2797.
- Guichard, E., Berdague, J., Grappin, R. (1987). Affinage et qualité du Gruyère de Comté. Influence de l'affinage sur la teneur en composés volatils. *Lait*, 67, 319-38.
- Guichard E. (2002): Interactions between flavour compounds and food ingredients and their influence on flavour perception. *Food Reviews International* 18, 49-70.
- Guillot, S., Peytavi, L., Bureau, S., Boulanger, R., Lepoutre, J.P., Crouzet, J., Schorr-Galindo, S. (2006) Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry* 96, 147-155.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2008) The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124, 91-97.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2009) Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 26, 142-150.

- Günther, C. S., Matich, A. J., Marsh, K. B., Nicolau, L. (2011) Development of a quantitative method for headspace analysis of methylsulfanyl-volatiles from kiwifruit tissue. *Food Research International* 44, 1331-1338.
- Gyórik, M., Ajtony, Zs., Dóka, O., Szigeti, J. (1998) Illékony aldehidek gőztér analízise SPME-GC-MS módszerrel. 44. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés. Előadások összefoglalói, Baja. pp. 150-155
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985-990.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (2004) Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 53, 1081-1085.
- Heaven, M.W., Nash, D. (2012) Recent analyses using solid-phase microextraction in industries related to food made into or from liquids. *Food Control* 27, 214-227.
- Ho, T. D., Canestraro, A. J., Anderson, J. L. (2011) Ionic liquids in solid-phase microextraction: a review. *Analytica Chimica Acta* 695, 18-43.
- Iglesias J., Medina I. (2008) Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of Chromatography A* 1192, 9-16.
- Innocente, N., Marchesini, G., Biasutti, M. (2011) Feasibility of the SPME method for the determination of the aroma retention capacity of proteose-peptone milk protein fraction at different pH values. *Food Chemistry* 124, 1249-1257.

- Jaillais, B., Bertrand, V., Auger, J. (1999) Cryo-trapping/SPME/GC analysis of cheese aroma. *Talanta* 48, 747-753.
- Jeangros, B., Troxler, J., Conod, D., Scheovic, J., Bosset, J.O., Bütikofer, U., Gauch, R., Mariaca, R., Pauchard, J.P., Sieber, R. (1997) Etude des relations entre les caractéristiques des erbages et celles du lait, de la crème et du fromage de type L'Etivaz ou Gruyère. *Revue Suisse d'Agriculture Journal* 29, 23-34.
- Jeleń, H.H., Mildner-Szkudlarz, S., Jasińska, I., Wąsowicz, E. (2007) A headspace-SPME-MS method for monitoring rapeseed oil autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84, 509-515.
- Jerković, I., Marijanović Z. (2009) A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1, 28-34.
- Juan, B., Barron, L. J. R., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A. J. (2007) Changes in the volatile composition of semihard ewe milk cheese induced by high-pressure treatment of 300 MPa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 747-754.
- Kalua C.M., Bedgood Jr. D.R., Prenzler P.D. (2006) Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time - Course experiments of olive oil. *Analytical. Chimica Acta* 556, 407-414.
- Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* 880, 35-62.

- Kataoka, H., Saito, K. (2011) Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54, 926-950.
- Kondyli, E., Pappa, E. C., Svarnas, C. (2016) Ripening changes of the chemical composition, proteolysis, volatile fraction and organoleptic characteristics of a white-brined goat milk cheese. *Small Ruminant Research* 145, 1-6.
- Kováts, E. (1958). Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* 41, 1915-1932.
- Kremmer, T., Torkos, K. (2010) Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata, Akadémiai Kiadó, MTA Kémiai Kutatóközpont
- Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K., Albanis, T. A. (2007) Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. *Journal of Chromatography A* 152, 70-96.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardini, F. (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology* 15, 201-208.
- Larreta, J., Vallejo, A., Bilbao, U., Alonso, A., Arana, G., Zuloaga, O. (2006) Experimental design to optimise the analysis of organic volatile compounds in cow slurry by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136, 1-9.

- Le, D. H., Kyang, K.H. (2006) Inhibition of yeast film formation in fermented vegetables by materials derived from garlic using cucumber pickle fermentation as a model system. *Food Science and Biotechnology* 15, 469-473.
- Leksrisonpong, P. P., Miracle, R. E., Drake, M. (2010) Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6318-6327.
- Le Thanh M., Thibeaudeau P., Thibaut M.A., Voilley A. (1992) Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water. *Food Chemistry* 43, 129-135.
- Liang, Z., Mittal, G.S., Griffiths M.W. (2003) Pasteurisation of unclarified apple juice using low energy pulsed electric field. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy* 1, 55-61.
- Lipinski, C.A. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44, 235-249.
- Liu, Y. T., Tsai, S. W. (2010) Assessment of dietary furan exposures from heat processed foods in Taiwan. *Chemosphere* 79, 54-59.
- Longbottom, C. J., Carson, C. F., Hammer, K. A., Mee, B. J. and Riley, T. V. (2004) Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 54, 386–392.
- Lubbers, S., Landy, P., Voilley, A. (1998) Retention and release of aroma compounds in food containing proteins. *Food Technology* 52, 68-72 208-214.

- Lubbers, S., Butler, E. (2010) Effects of texture and temperature on the kinetic of aroma release from model dairy custards. *Food Chemistry* 123, 354-350.
- Luna G., Aparicio R., Garcia-Gonzalez D.L. (2006) A tentative characterization of white dry-cured hams from Teruel (Spain) by SPME-GC. *Food Chemistry* 97, 621–630.
- Majcher, M., Qawrowski, P., Jeleń, H. (2010) Comparison of original and adul-terated oscypek cheese based on volatile and sensory profiles. *ACTA Scientiarum Polonorum e Technologia Alimentaria* 9, 265-275.
- Malecky, M., Broudiscou, A., Broudiscou, L. P. (2012) Optimisation of headspace solid-phase microextraction for quantitative analysis of monoterpenes in caprine blood. *Animal Feed Science and Technology* 173, 261-267.
- Mallia, S., Fernández-García, E., Bosset, J. O. (2005) Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal* 15, 741-758.
- Mancha Agresti P.D.C., Franca A.S., Oliveira L.S., Augusti R. (2008) Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile. *Food Chemistry* 106, 787-796.
- Marco A., Navarro J.L., Flores M. (2006) The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science* 73, 660-673.
- Marco A., Navarro J.L., Flores M. J. (2007) Quantitation of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different

- curing salts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3058-3065.
- Mariaca, R. G., Bosset, J. O. (1997) Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait* 77, 13-40.
- Mariaca, R. G., Berger, T. F. H., Gauch, R., Imhof, M. I., Jeangros, B., Bosset, J. O. (1997) Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavour compounds in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4423-4434.
- Marsili, R. T. (2000) Shelf-life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass spectrometry, and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3470-3475.
- Marušić, N., Petrović, M., Vidaček, S., Petrak, T., Medić, H. (2011) Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds. *Meat Science* 88, 786–790.
- Matan, N., Matan, N. (2008) Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration and Biodegradation* 62, 75–78.
- Mateo-Vivaracho L., Ferreira V., Cacho J. (2006) Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptopentyl acetate at ng L(-1) level by headspace solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination. *Journal of Chromatography A* 1121, 1-9.

- McGorrin R.J. (1996) in: R.J. McGorrin, J.V. Leland (Eds.), ACS Symposium Series 633, American Chemical Society, Washington, DC, pp. IX–XII.
- Mendes-Ferreira A., Barbosa C., Falco V., Leão C., Mendes-Faia A. (2009) The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 571-583.
- Merabtine Y., Lubbers S., Andriot I., Tromelina A., Guichard E. (2010) Retention/release equilibrium of aroma compounds in fat-free dairy gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1403-1409.
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. (1998) Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma. *Journal of Chromatography A* 808, 211-218.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Zlatković, B. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Central European Journal of Biology* 4, 411-416.
- Mildner-Szkudlarz S., Jeleń H.H. (2008) The potential of different techniques for volatile compounds analysis coupled with PCA for the detection of the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *Food Chemistry* 110, 751-761.
- Miller, K. G., Poole, C. F., Pawlowski, T. M. P. (1996) Classification of the botanical origin of cinnamon by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Chromatographia* 42, 639-646.
- Miller, M. E., Stuart, J. D. (1999) Comparison of gas-sampled and SPME-sampled static headspace for the determination of volatile flavor components. *Analytical Chemistry* 71, 23-27.

- Mills, G. A., Walker, V. (2000) Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A* 902, 267-287.
- Mindrup, R., Shirey, R. E. (2001) Improved Performance of SPME Fibers and Applications. Supelco, Supelco Park, Bellefonte, PA, 16823 USA
- Moate, P. J., Chalupa, W., Boston, R. C., Lean, I. J. (2007) Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 90, 4730-4739.
- Mondello, L., Costa, R., Tranchida, P. Q., Chiofalo, B., Zumbo, A., Dugo, P., et al. (2005) Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HSSPME-GC. *Flavour and Fragrance Journal* 20, 659-665.
- Moon S.Y., Cliff M.A., Li-Chan E.C.Y. (2006) Odour-active components of simulated beef flavour analysed by solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry and –olfactometry. *Food Research International* 39, 294-308.
- Moreira, N., de Pinho, P. G., Santos, C., Vasconcelos, I. (2011) Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry* 126, 1599-1607.
- Naknean P., Meenune M. (2010): Review article: factors affecting retention and release of flavor compounds in food carbohydrates. *International Food Research Journal* 17, 23-34.
- Negreira, N., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubí, E., Cela, R. (2009) Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and

- gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 638, 36-44.
- Nevas, M., Korhonen, A., Lindstrom, M., Turkki, P., Korkeala, H. (2004) Antibacterial efficiency of finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection* 67, 199-202.
- Németh, I. (2007) Gyógynövényismeret, Oktatási segédanyag, Eszterházy Károly Főiskola Környezettudományi Tanszék, Eger, 18-20.
- Németh, É. (2008) Gyógynövény ABC, Csepp Kiadó
- Nguefack, J., Letha, V., Zollob, P.H. A. and Mathura, S. B. (2003) Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 94, 329-334.
- Nogueira, M. C. L., Lubachevsky, G., Rankin, S. A. (2005) A study of the volatile composition of Minas cheese. *LWT Food Science and Technology* 38, 555-563.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., Yamagami, T., David, F., Tienpont, B., Sandra, P. (2005) Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. *Journal of Separation Science* 28, 1083-1092.
- Olbricht, K., Ulrich, D., Weiss, K., Grafe, C. (2011) Variation in the amounts of selected volatiles in a model population of *Fragaria Ananassa* Duch. As influenced by harvest year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 944-952.

- Oliveira, I., de Pinho, P. G., Malheiro, R., Baptista, P., Pereira, J. A. (2011) Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. *Food Chemistry* 128, 667-673.
- Panseri, S., Giani, I., Mentasti, T., Bellagamba, F., Caprino, F., Moretti, V. M. (2008) Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LWT Food Science and Technology* 41, 185-192.
- Parveen, M., Hasan, K., Tkahashi, J., Murata, Y., Kitagawa, E., Kodama, O. and Iwahashi, H., (2004) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 54, 46-55.
- Pawliszyn J. (2002) Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Pawliszyn, J. (2009) Handbook of Solid Phase Microextraction, Chemical Industry Press.
- Pawliszyn J., Lord H.L. (2010) Handbook of Sample Preparation, Wiley-Blackwell.
- Pereira, J., Pereira, J., Câmara, J. S. (2011) Effectiveness of different solid-phase microextraction fibres for differentiation of selected Madeira island fruits based on their volatile metabolite profile-identification of novel compounds. *Talanta* 83, 899-906.
- Petró, O-né, Domokos, J., Hornok, L., Ottó, A., Perédi, J., Zámbo, I. (1991) Újratermelhető alapanyagokból szuperkritikus extrakcióval előállítható élelmiszeripari, kozmetikai és gyógyszeripari termékek, technológiák. Elemző tanulmány. Országos Műszaki Információs Központ és Könyvtár, Budapest.

- Picó, Y., Kozmutza, C. (2007) Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 39, 1805-1814.
- Pillonel, L., Bosset, J. O., Tabacchi, R. (2002) Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 35, 1-14.
- Pinho, O., Pérès, C., Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2003) Solid-phase microextraction of volatile compounds in „terríncho” ewe cheese. Comparison of different fibers. *Journal of Chromatography A* 1011, 1-9.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Ferreira, M. (2004) Discriminate analysis of the volatile fraction from „Terrínco” ewe cheese: correlation with flavour characteristics. *International Dairy Journal* 14, 455-464.
- Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O., Santos L. H. M. L. M. (2006) Method optimization by solid-phase micro-extraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A* 1121, 145–153.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonc, Alves, M., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. and Martinez-de-Oliveira, J. (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology* 49, 1367-1373.
- Pionnier, E., Engel, E., Salles, C., Le Quere, J. L. (2002) Interaction between non-volatile water-soluble molecules and aroma compounds in Camembert cheese. *Food Chemistry* 76, 13-20.

- Pluhár, Zs., Németh, É., Bernáth, J., Héthelyi, É. (1996) Illóolaj tartalmú drogok szuperkritikus extraktumainak analízise. *Olaj, Szappan, Kozmetika* 45, 70-74.
- Plutowska, B., Wardencki, W. (2007) Aromagrams—Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry* 101, 845-872.
- Poinot P., GruaPriol J., Arvisenet G., Rannou C., Semenom M., Le Bail A., Prost C. (2007) Optimisation of HS-SPME to study representativeness of partially baked bread odorant extracts. *Food Research International* 40, 1170-1184.
- Poulopoulou, I., Zoidis, E., Massouras, T., Hadjigeorgiou, I. (2012a) Terpenes transfer to milk and cheese after oral administration to sheep fed indoors. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 172-181.
- Poulopoulou, I., Zoidis, E., Massouras, T., Hadjigeorgiou, I. (2012b) Transfer of orally administered terpenes in goat milk and cheese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25, 1411-1418.
- Prache, S., Cornu, A., Berdagué, J. L., Priolo, A. (2005) Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research* 59, 157-168.
- Prat, C., Besalú, E., Bañeras, L., Anticó, E. (2011) Multivariate analysis of volatile compounds detected by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography: A tool for sensory classification of cork stoppers. *Food Chemistry* 126, 1978-1984.
- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L. A., Etxebarría, N., Zuloaga, O. (2010) Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A* 1217, 2642-2666.

- Pungor, E. (1978) *Analitikai Kémiai Kislexikon*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest.
- Quach, M.L., Chen, X. D., Stevenson, R. J. (1998) Headspace sampling of whey protein concentrate solutions using solid-phase microextraction. *Food Research International* 31, 371-379.
- Rasooli, I., Moosavi, M.L., Rezaee, M.B. and Jaimand, K. (2002) Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *Journal of Agricultural Science and Technology* 4, 127-133.
- Rápoti, J., Romváry, V. (1997) *Gyógyító növények*, Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., Smith, R. M. (2007) Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A* 1153, 36-53.
- Risticovic, S., Lord, H., Gorecki, T., Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (2010) Protocol for solid-phase microextraction method development. *Nature Protocols* 5, 122-139.
- Roberts D.D., Taylor A.J. (1999) Flavor release, in: ACS Symposium Series 763, American Chemical Society, Washington, DC.
- Romeo V., Ziino M., Giuffrida D., Condurso C., Verdera A. (2007) Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry* 101, 1272-1278.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R. (2008) The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635-638.
- Rowland, C. Y., Blackman, A. J., D'Arcy, B. R., Rintoul, G. B. (1995) Comparison of organic extractives found in leatherwoos (*Eucryphia*

- lucida) honey and leatherwood flowers and leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 753-763.
- Saison D., De Schutter D.P., Delvaux F., Delvaux F.R. (2008) Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1190, 342-349.
- Saison D., De Schutter D.P., Delvaux F., Delvaux F.R. (2009) Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 5061-5068.
- Santana, C. M., Ferrera, Z. S., Padrón, M. E. T., Rodríguez, J. J. S. (2009) Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules* 14, 298-320.
- Scehovic, J., Jeangros, B., Troxler, J. Bosset, J. O. (1998) Effets de la composition botanique des herbages pâturés sur quelques composants des fromages de type L'Etivaz ou Gruyere. *Revue Suisse d'Agriculture Journal* 30, 167-171.
- Schelz, Z., Molnar, J. and Hohmann, J. (2006) Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77, 279-285.
- Schieberle P., Hofmann T., (2012) in: H. Jeleń (Ed.), Food Flavors. Chemical, Sensory and Technological Properties, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 413-436.
- Schlichtherle-Cerny, H., Imhof, M.I., Fernández-García, E., Bosset, J. O. (2004) Changes in terpene composition from pasture to cheese.

- Cheese art., in: 6th International Meeting on Mountain Cheese, Ragusa, Italy. CD-ROM. Corfilac Edition.
- Schmidt, J. (1996) A takarmányozás alapjai, Mezőgazda Kiadó.
- Schmidt J., Zsédely E. (2011) Kérődző állatok takarmányozása, Nyugat-magyarországi Egyetem.
- Serhan, M., Linder, M., Hosri, C., Fanni, J. (2010) Changes in proteolysis and volatile fraction during ripening of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Small Ruminant Research* 90, 75-82.
- Sides, A., Robards, K., Helliwell, S. (2000) Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends in Analytical Chemistry* 19, 322-329.
- Simándi, B., Sawinsky, J. (1996): Műveletek szuperkritikus oldószerekkel. *Olaj, Szappan, Kozmetika* 45, 3-11.
- Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. and Catalan, C. (2006) Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* 17, 745-752.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M.P. and Catalan, C.A.N. (2008) Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology* 46, 3295-3302.
- Soler, C., Mañes, J., Picó, Y. (2008) The role of liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 38, 93-117.
- Solms J., Osman-Ismail F., Beyeler M. (1973) The interaction of volatiles with food components. *Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology* 6, A10–A16.

- Soukoulis, C., Aprea, E., Biasioli, F., Cappellin, L., Schuhfried, E., Märk, T. D., et al. (2010) Proton transfer reaction time-of-flight mass spectrometry monitoring of the evolution of volatile compounds during lactic acid fermentation of milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 2127-2134.
- Sousa E.T., Rodrigues F.M., Martins C.C., Oliveira F.S., Pereira P.A.P., Andrade J.B. (2006) Multivariate Optimization and HS-SPME/GC-MS Analysis of VOCs in Red, Yellow and Purple Varieties of Capsicum chinese sp. Peppers. *Microchemical Journal* 82, 142-149.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R. (2007) Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 235-242.
- Sun, S. Y., Jiang, W. G., Zhao, Y.P. (2010) Characterization of the aroma-active compounds in five sweet cherry cultivars grown in Yantai (China). *Flavour and Fragrance Journal* 25, 206-213.
- Sun Q., Gates M.J., Lavin E.H., Acree T.E., Sacks G.L. (2011) Comparison of odor-active compounds in grapes and wines from vitis vinifera and non-foxy American grape species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 10657-10664.
- Supelco. (2007) Polyethylene glycol (PEG) SPME fibers, vol. 2011. Bellafonte, PA: Sigma-Aldrich.
- Suriyaphan, O., Drake, M. A., Chen, X. Q., Cadwallader, K. R. (2001) Characteristic aroma components of British farmhouse Cheddar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1382-1387.
- Szabó, M.Á., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Zs., Szegedi, E., Amaral, L., Molnár, J. (2010) Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research* 24, 782-786.

- Szabó, L.Gy. (2005) Gyógynövényismereti tájékoztató. Schmidt und Co. – Melius Alapítvány, Baksa-Pécs.
- Szendrei K., Csupor D. (2009) Gyógynövénytar-útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz. Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Szőke É. (2012) Gyógynövény és Drogismeret Farmakognózia – Fitokémia, gyógynövények alkalmazása III.4.1.1-2-4.
- Talsness, C. E., Andrade, A. J. M., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A., vom Saal, F. S. (2009) Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 2079-2096.
- Thierry, A., Maillard, M. B., Le Quere, J. L. (1999) Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. *International Dairy Journal* 9, 453-463.
- Tornambé, G., Cornu, A., Pradel, P., Kondjoyan, N., Carnat, A. P., Petit, M., Martin, B. (2006) Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. *Journal of Dairy Science* 89, 2309-2319.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Francis, I. L., Henschke, P. A. (2011) Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry* 127, 1072-1083.
- Tsai, W.-H., Huang, T.-C., Huang, J.-J., Hsue, Y.-H., Chuang, H.-Y. (2009) Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by

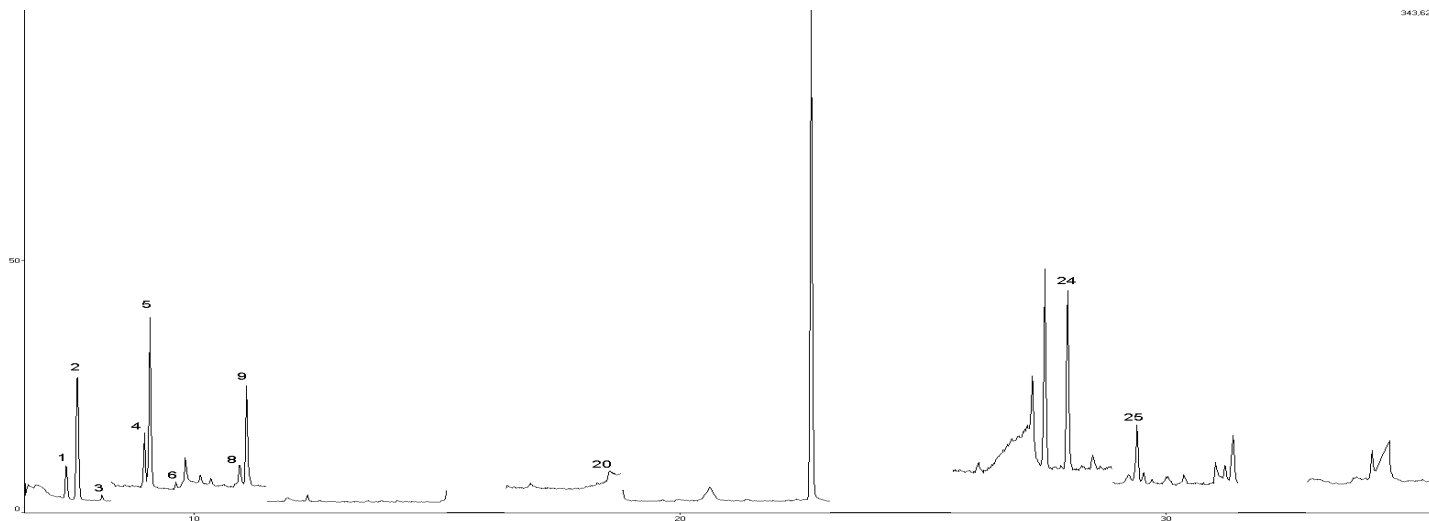
- high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A* 1216, 2263-2269.
- Vasta, V., D'Alessandro, A. G., Priolo, A., Petrotos, K., Martemucci, G. (2012) Volatile compound profile of ewe's milk and meat of their suckling lambs in relation to pasture vs. indoor feeding system. *Small Ruminant Research* 105, 16-21.
- Vazquez-Landeverde, P. A., Velazquez, G., Torres, J. A., Qian, M. C. (2005) Quantitative determination of thermally derived off-flavor compounds in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 88, 3764-3772.
- Ventanas, S., Ruiz, J. (2006) On-site analysis of volatile nitrosamines in food model systems by solid-phase microextraction coupled to a direct extraction device. *Talanta* 70, 1017-1023.
- Verzera, A., Concurso, C., Romeo, V., Tripodi, G., Ziino, M. (2010) Solid-phase microextraction coupled to fast gas-chromatography for the determination of migrants from polystyrene-packaging materials into yoghurt. *Food Analytical Methods* 3, 80-84.
- Viallon, C., Verdier-Metz, I., Denoyer, C., Pradel, P., Coulon, J.-B., Berdagué, J.-L. (1999) Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses. *Journal of Dairy Research* 66, 319-326.
- Viallon, C., Martin, B., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Garel, J.-P., Coulon, J.-B., Berdagué, J.-L. (2000) Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait* 80, 635-641.
- Vichi S., Romero A., Tous J., Tamames E.L., Buxaderas S. (2008) Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance. *Journal of Chromatography A* 1211, 1-7.

- Vidal, J. L. M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Frenich, A. G. (2009) Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A* 1216, 6767-6788.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19, 1130-1138.
- Vítová, E., Mokáňová, R., Babák, L., Zemanová, J., Sklenářová, K. (2011) The changes of flavour and aroma active compounds content during production of Edam cheese. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 59, 255-262.
- Wang, J.-X., Jiang, D.-Q., Gu, Z.-Y., Yan, X.-P. (2006) Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* 1137, 8-14.
- Wang J., Zhi Li Y., Chen R.R., Bao J.Y., Ming Yang G. (2007) Comparison of volatiles of banana powder dehydrated by vacuum belt drying, freeze-drying and air-drying. *Food Chemistry* 104, 1516-1521.
- Wang Y., McCaffrey J., Norwood D.L. (2008a) Recent advances in headspace gas chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 31, 1823-1851.
- Wang L.F., Lee J.Y., Chung J.O., Baik J.H., So S., Park S.K. (2008b) Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME-GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds. *Food Chemistry* 109, 196-206.

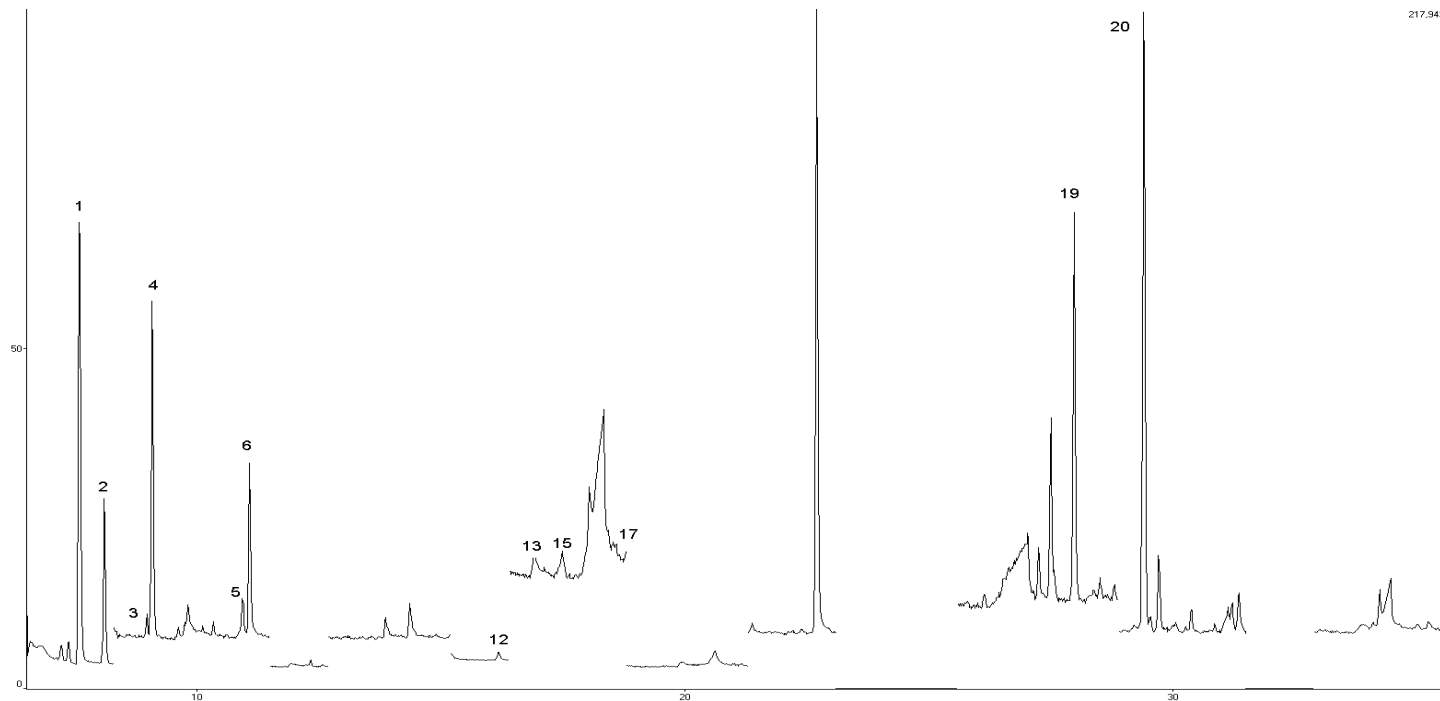
- Wang, B., Xu, S., Sun, D.-W. (2010) Application of the electronic nose to the identification of different milk flavorings. *Food Research International* 43, 255-262.
- Wilkes, J. G., Conte, E. D., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J. B., Miller, D. W. (2000) Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A* 880, 3-33.
- Wilson, C. L., Solar, J.M., Ghaouth, A. E. and Wisniewski, M. E. (1999) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81, 204-210.
- Wolf, I. V., Perotti, M. C., Bernal, S. M., Zalazar, C. A. (2010) Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International* 43, 1204-1211.
- Wright B.J., Zevchak S.E., Wright J.M., Drake M.A. (2009) The impact of agglomeration and storage on flavor and flavor stability of whey protein concentrate 80% and whey protein isolate. *Journal of Food Science* 74, 17-29.
- Xiao, Z. B., Zhu, J. C., Feng, T., Tian, H. X., Yu, H. Y., Niu, Y. W., et al. (2010) Comparison of volatile components in Chinese traditional pickled peppers using HS-SPME-GC-MS, GC-O and multivariate analysis. *Natural Product Research* 24, 1939-1953.
- Xu Y., Fan W., Qian M.C. (2007) Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3051-3057.

- Yu A.N., Sun B.G., Tian D.T., Qu W.Y. (2008) Analysis of volatile compounds in traditional smoke-cured bacon (CSCB) with different fiber coatings using SPME. *Food Chemistry* 110, 233-238.
- Zhang, Z., Pawliszyn, J. (1993a) Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* 65, 1843-1852.
- Zhang, Z., Pawliszyn, J. (1993b) Analysis of organic compounds in environmental samples by headspace solid phase microextraction. *Journal of High Resolution Chromatography* 16, 689-692.
- Zhang, Z., Yang, M. J., Pawliszyn, J. (1994) Solid Phase Microextraction: A New Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Journal of Analytical Chemistry* 66, 844-853.
- Zhang Z., Poerschmann J., Pawliszyn J. (1996) Direct solid phase microextraction of complex aqueous samples with hollow fiber membrane protection. *Analytical Communications* 33, 219-221.
- Zhang, S., Yang, R., Zhao, W., Hua, X., Zhang, W., Zhang, Z. (2011) Influence of pulsed electric field treatments on the volatile compounds of milk in comparison with pasteurized processing. *Journal of Food Science* 76, 127-132.
- Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D., Verzera, A. (2005) Characterization of „Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal* 15, 585-59.

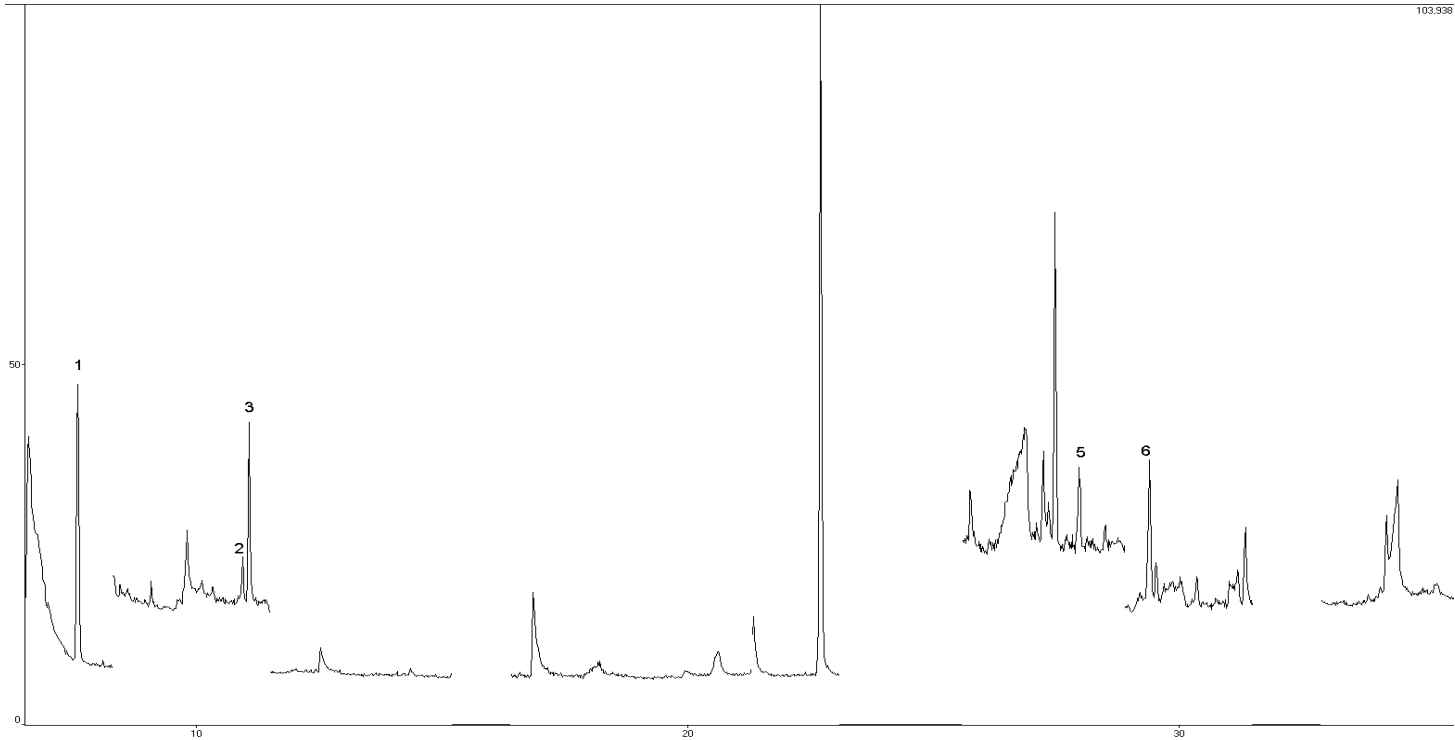
10. Mellékletek



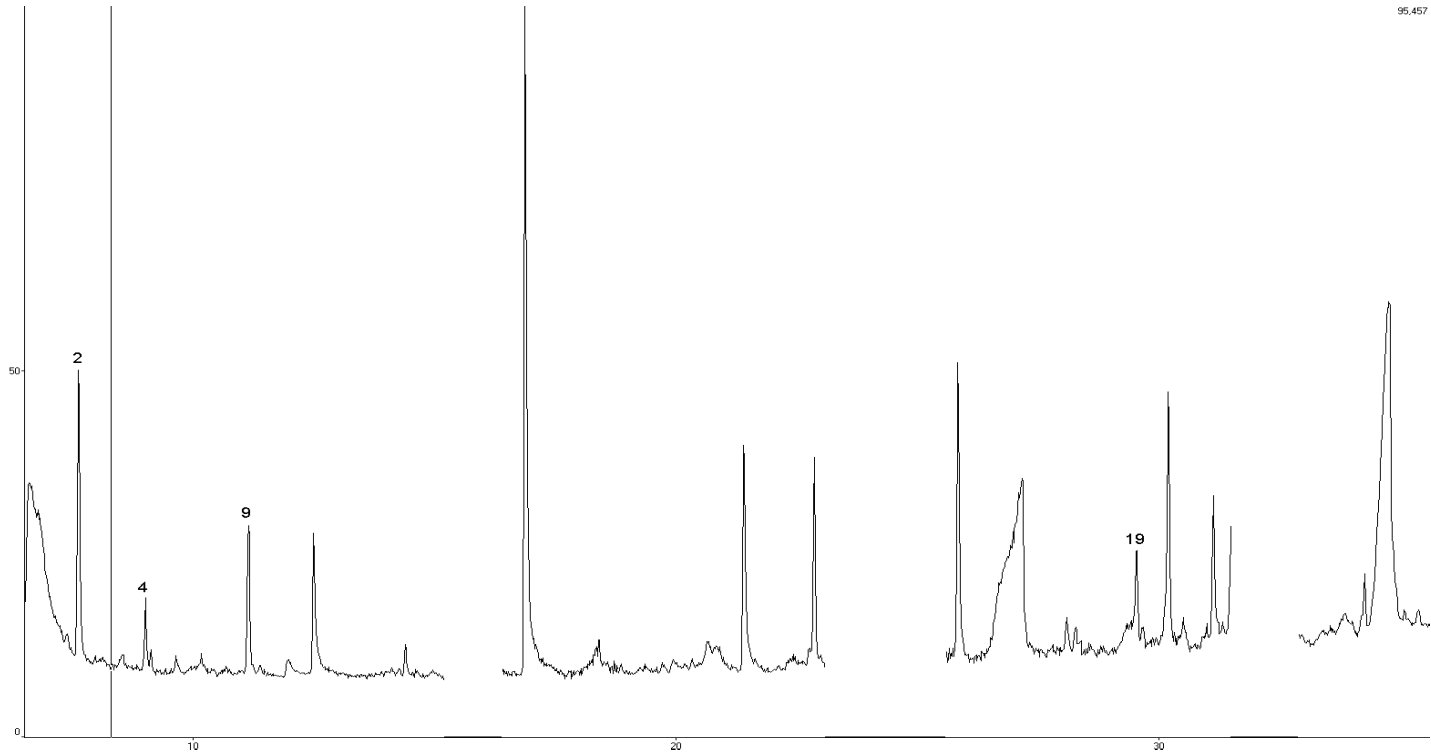
1. melléklet Cickafarkas takarmánnyal etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejből kinyert tejszír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$). (1: α -tujén, 2: α -pinén, 3: kamfén, 4: szabinén, 5: β -pinén, 6: mircén, 8: *para*-cimol, 9: limonén, 20: metil-kavikol, 24: kariofillén E, 25: α -humulén).



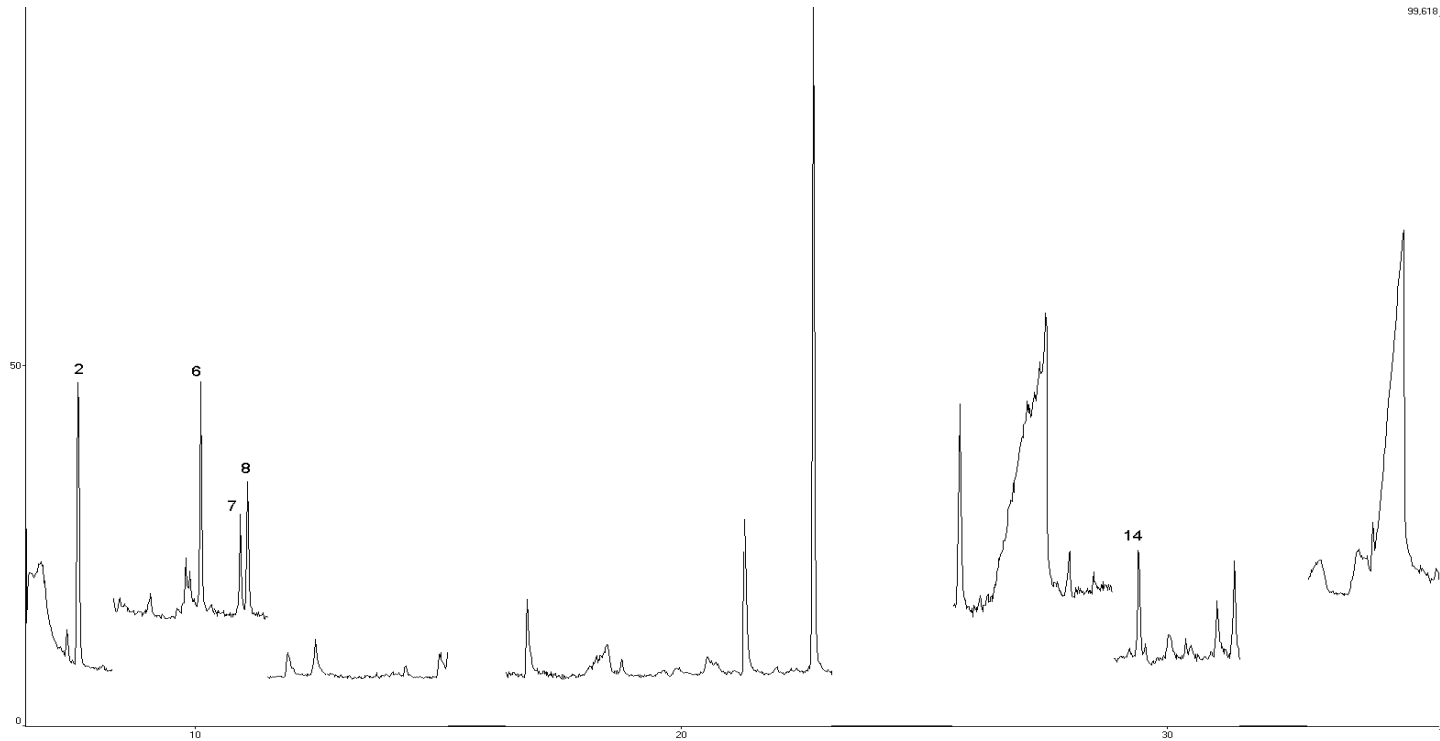
2. melléklet Izsópos, zsályás és szagos mügés takarmánnyal etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejből kinyert tejszír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$). (1: α -pinén, 2: kamfén, 3: szabinén, 4: β -pinén, 5: *para*-cimol, 6: limonén, 12: kámfor, 17: metil-kavikol, 19: kariofillén E, 20: α -humulén).



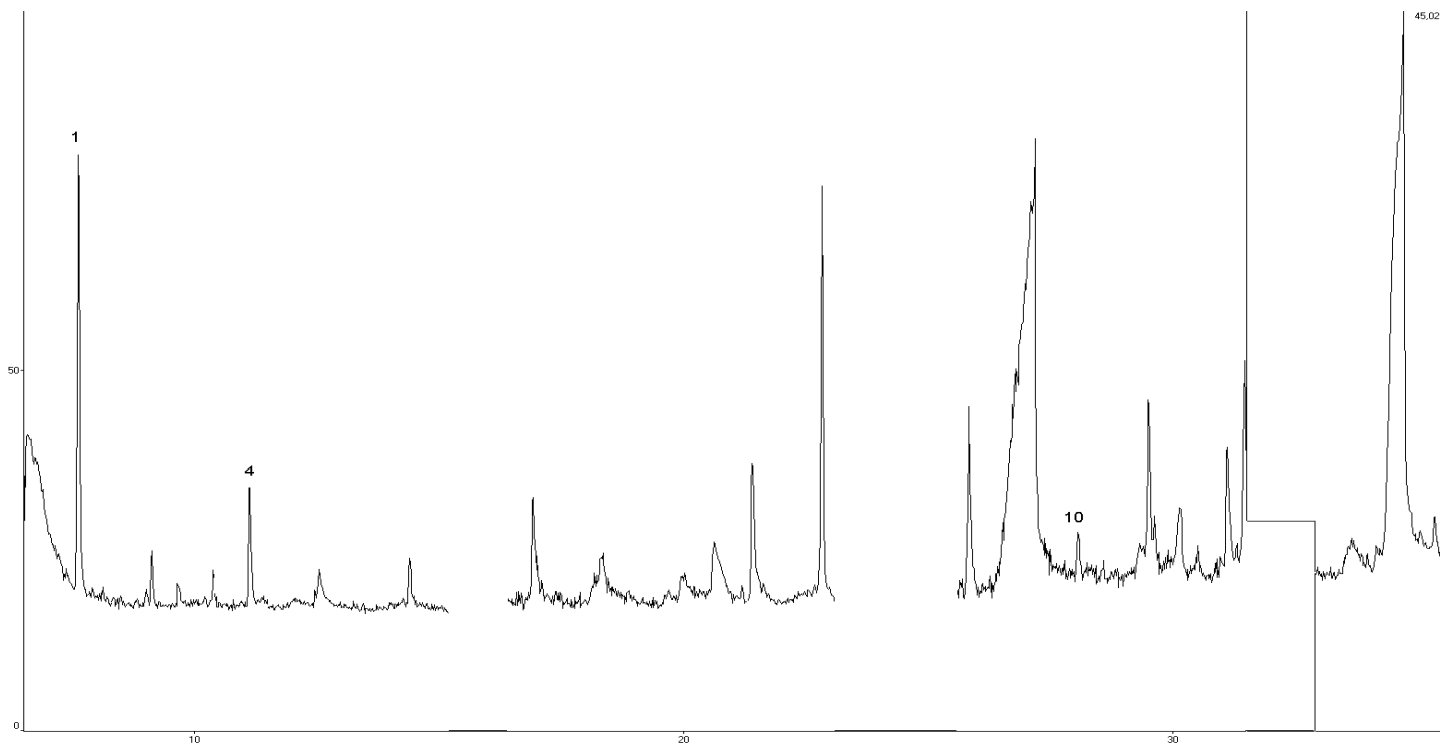
3. melléklet Kamillás takarmánnyal etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejéből kinyert tejszír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$). (1: α -pinén, 2: *para*-cimol, 3: limonén, 5: kariofillén E, 6: α -humulén).



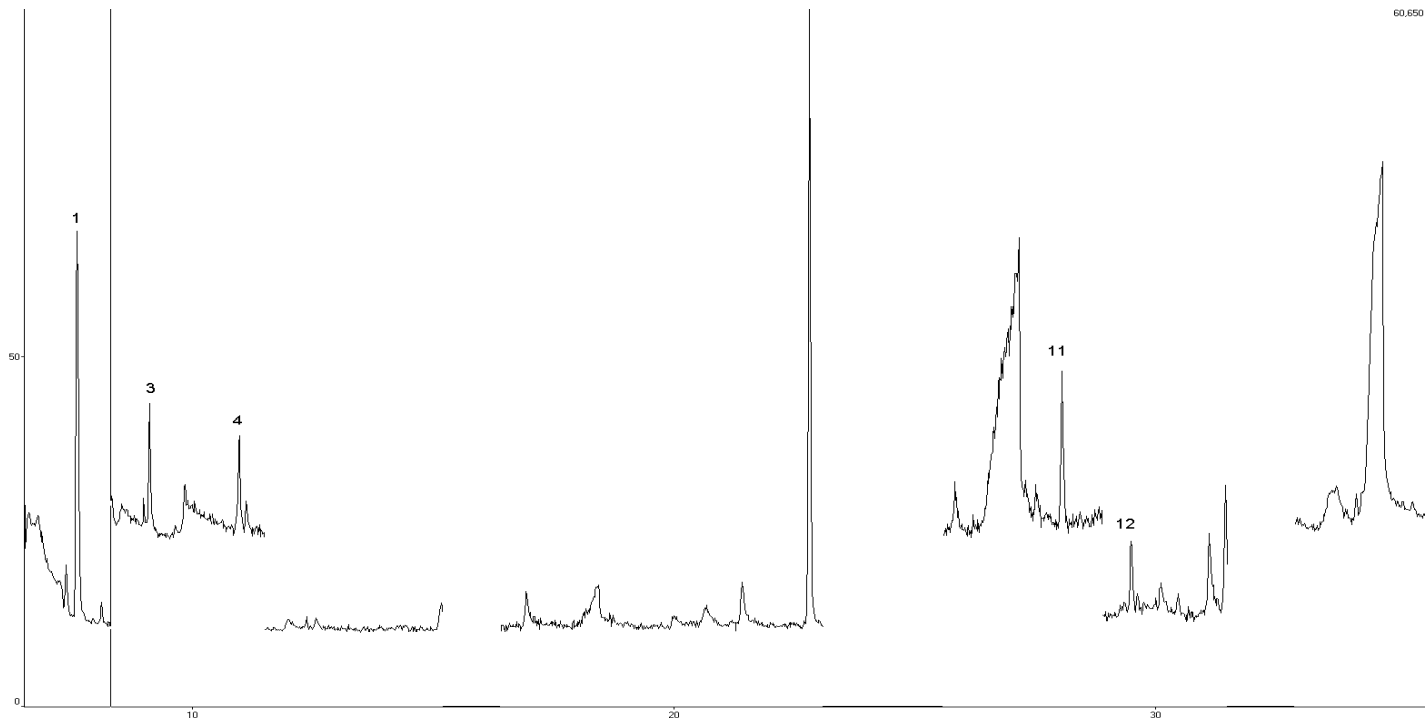
4. melléklet Kecskerutás takarmánnyal etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejéből kinyert tejsír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$). (2: α -pinén, 4: szabinén, 9: limonén, 19: α -humulén).



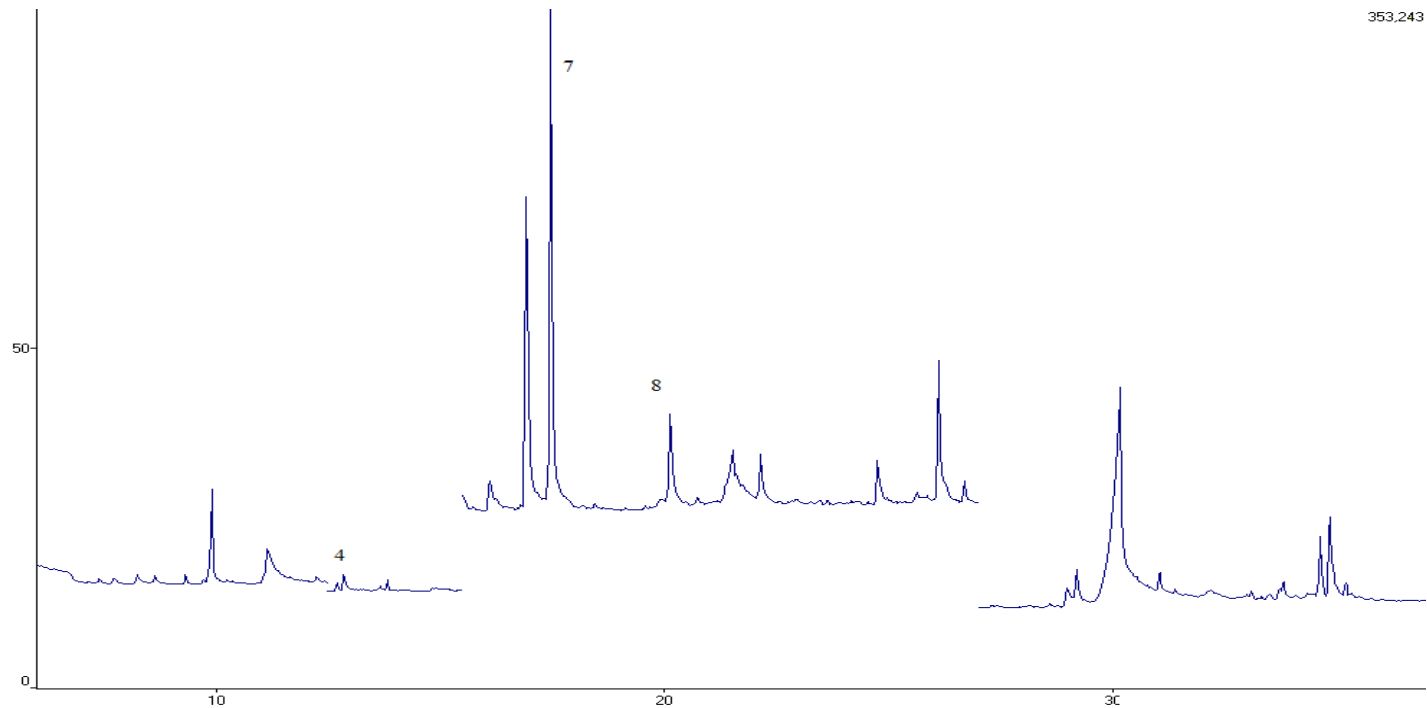
5. melléklet Kapros takarmánnyal etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejéből kinyert tejsír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$) (2: α -pinén, 6: α -fellandrén, 7: *para*-cimol, 8: limonén, 14: α -humulén).



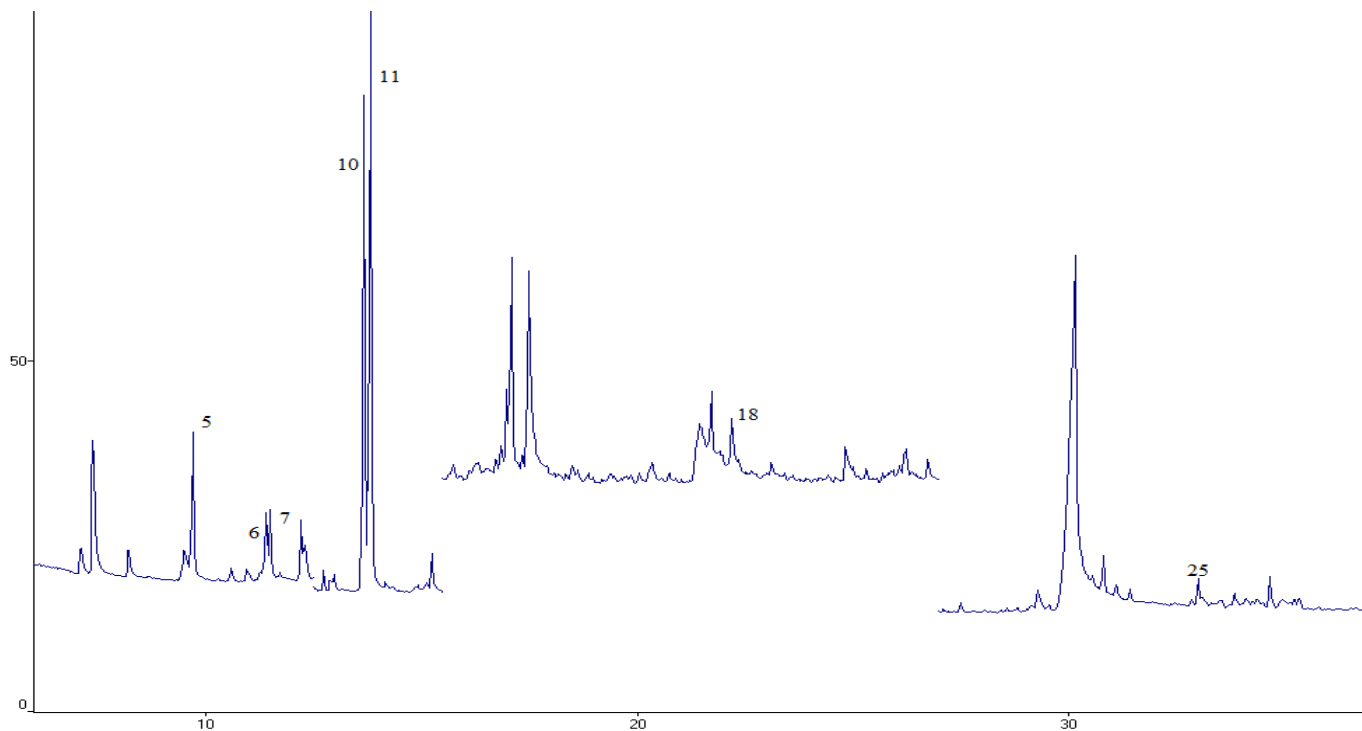
6. melléklet Lándzsás útifüves takarmánnyal etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejéből kinyert tejsír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$). (1: α -pinén, 4: limonén, 10: α -humulén).



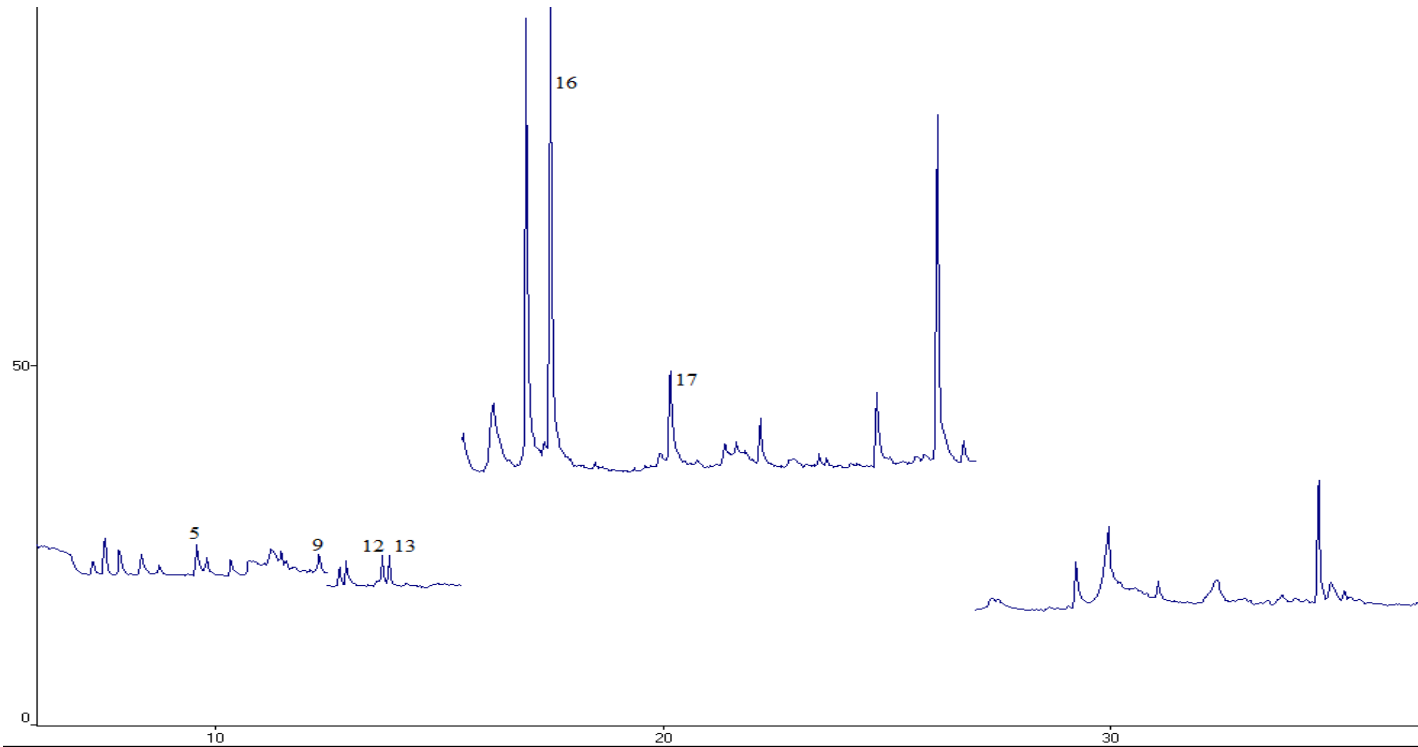
7. melléklet Kakukkfűves szénával etetett szarvasmarha (4135) esti (E) fejésű tejéből kinyert tejsír HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119+133$) (1: α -pinén, 3: β -pinén, 4: *para*-cimol, 11: kariofillén E, 12: α -humulén).



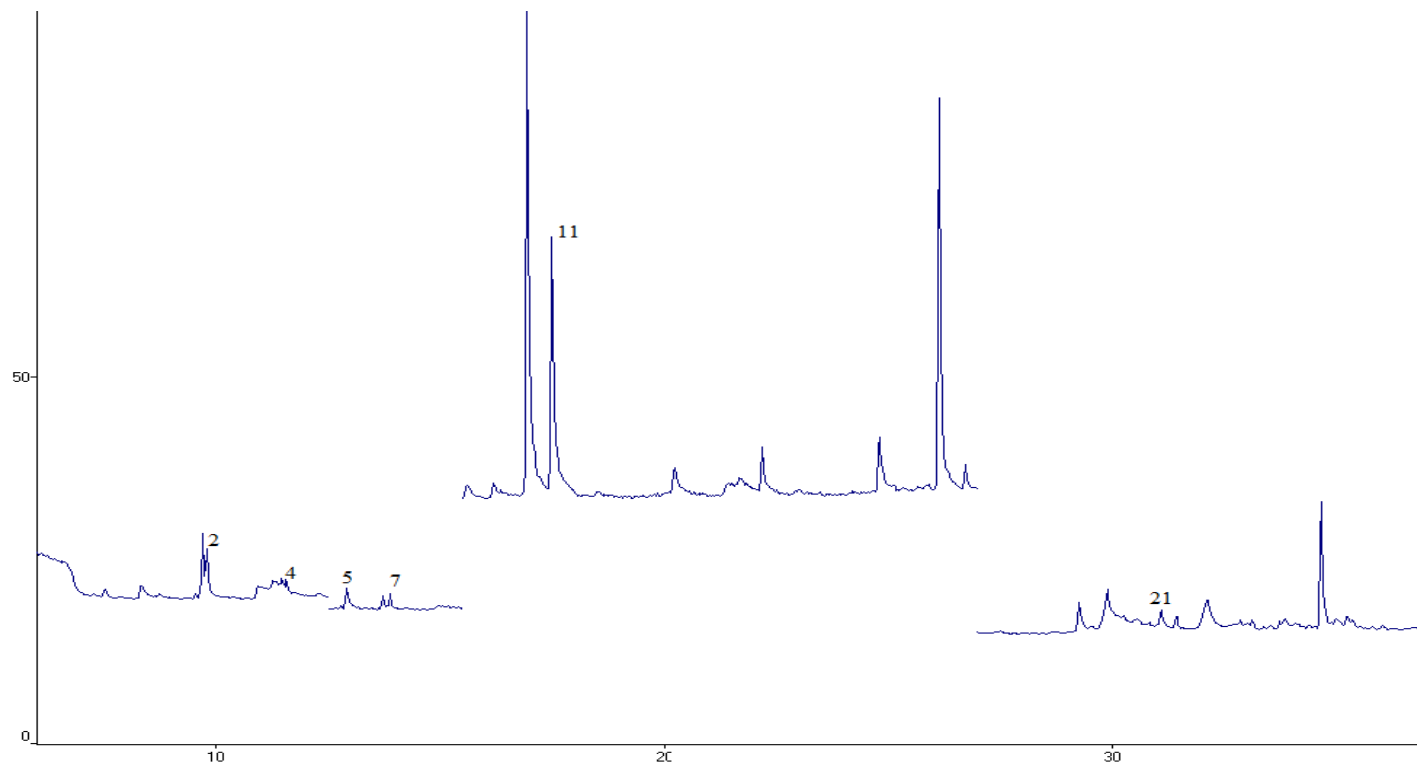
8. melléklet Cickafarkkal etetett kecske tejének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=68+69+71+81+93+95+119+148$) (4: linalool, 7: α -tujon, 8: kámfor).



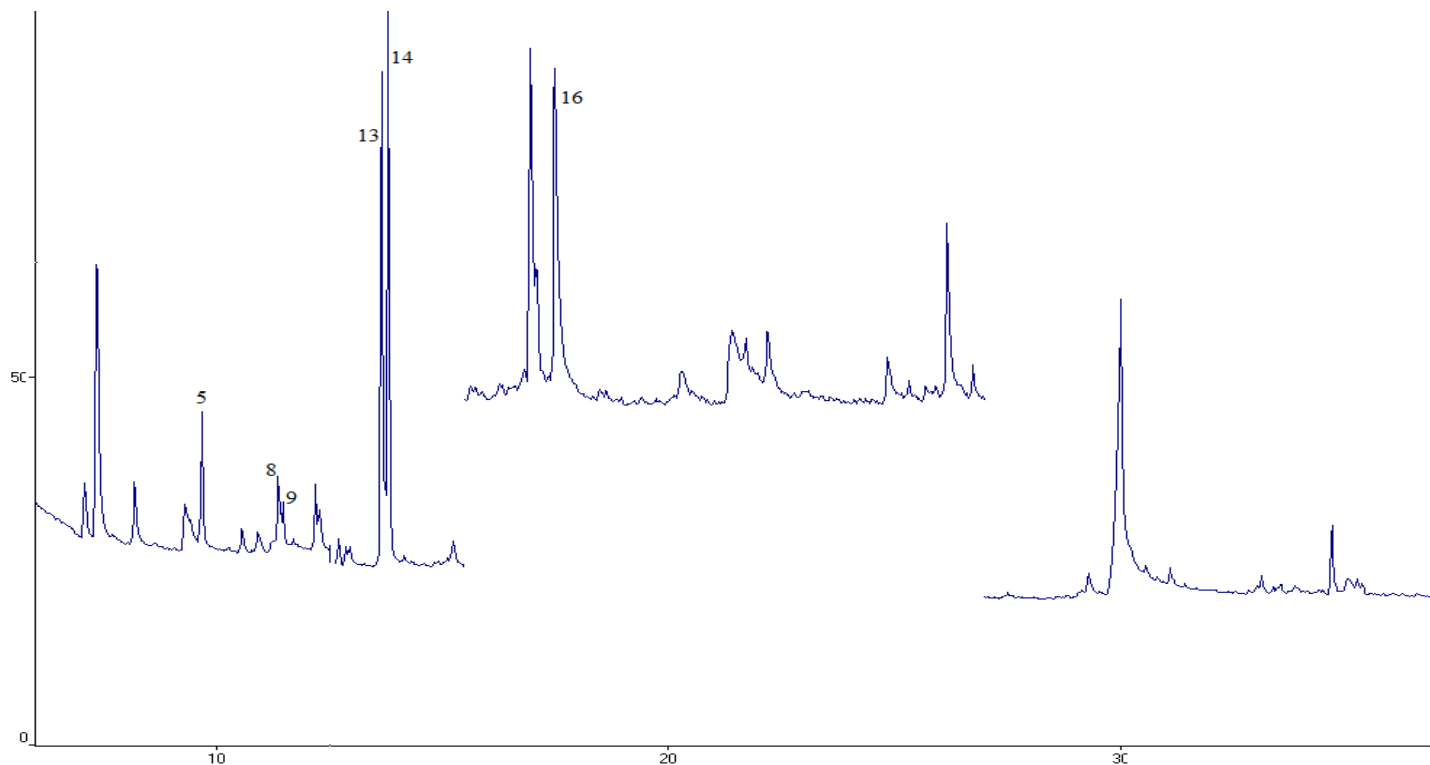
9. melléklet Kamillával etetett kecske tejének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja
($m/z=68+69+71+81+93+95+119+148$) (5: α -pinén, 6: szabinén, 7: β -pinén, 10: p -cimol, 11: limonén,
18: α -tujon, 25: α -humulén).



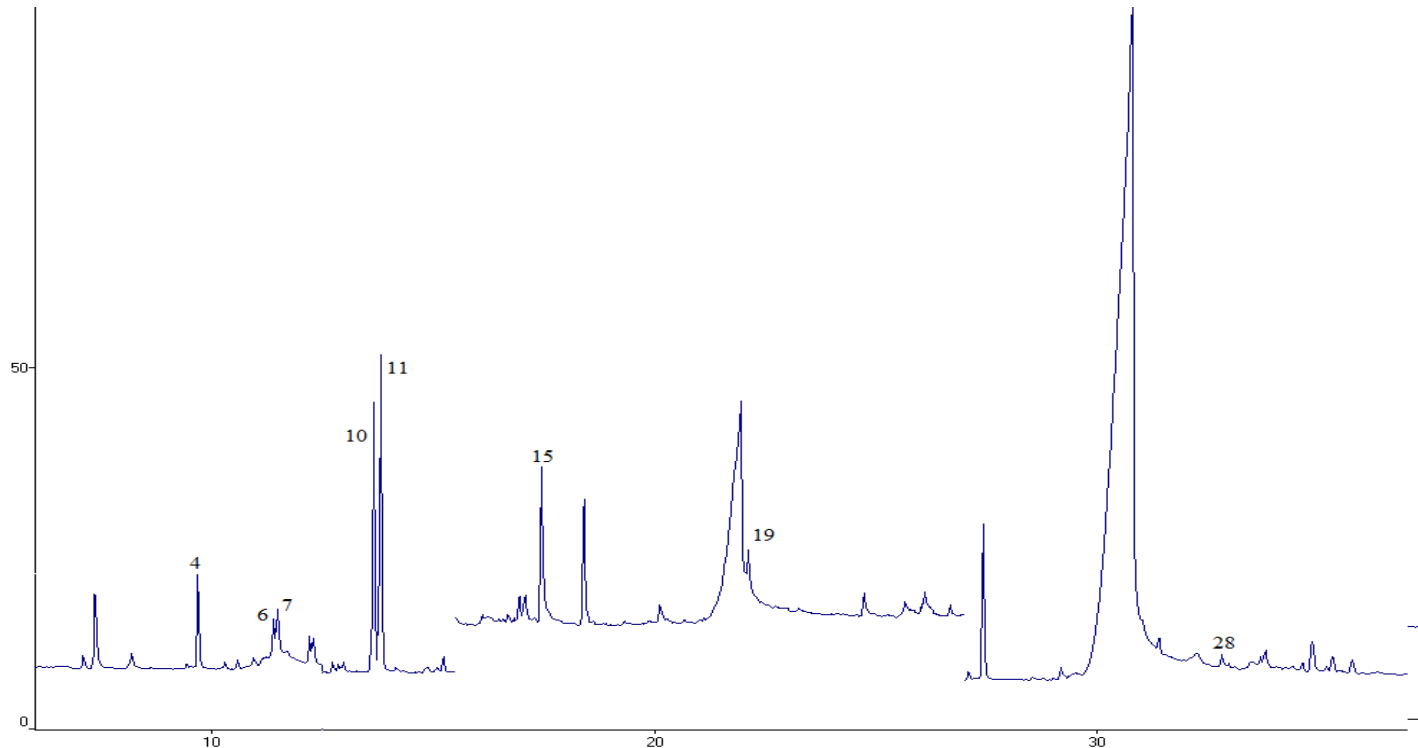
10. melléklet Szagosmügevel etetett kecske tejének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja (m/z=68+69+71+81+93+95+119+148) (5: α -pinén, 9: β -pinén, 12: *p*-cimol, 13: limonén, 16: α -tujon, 17: kámfor).



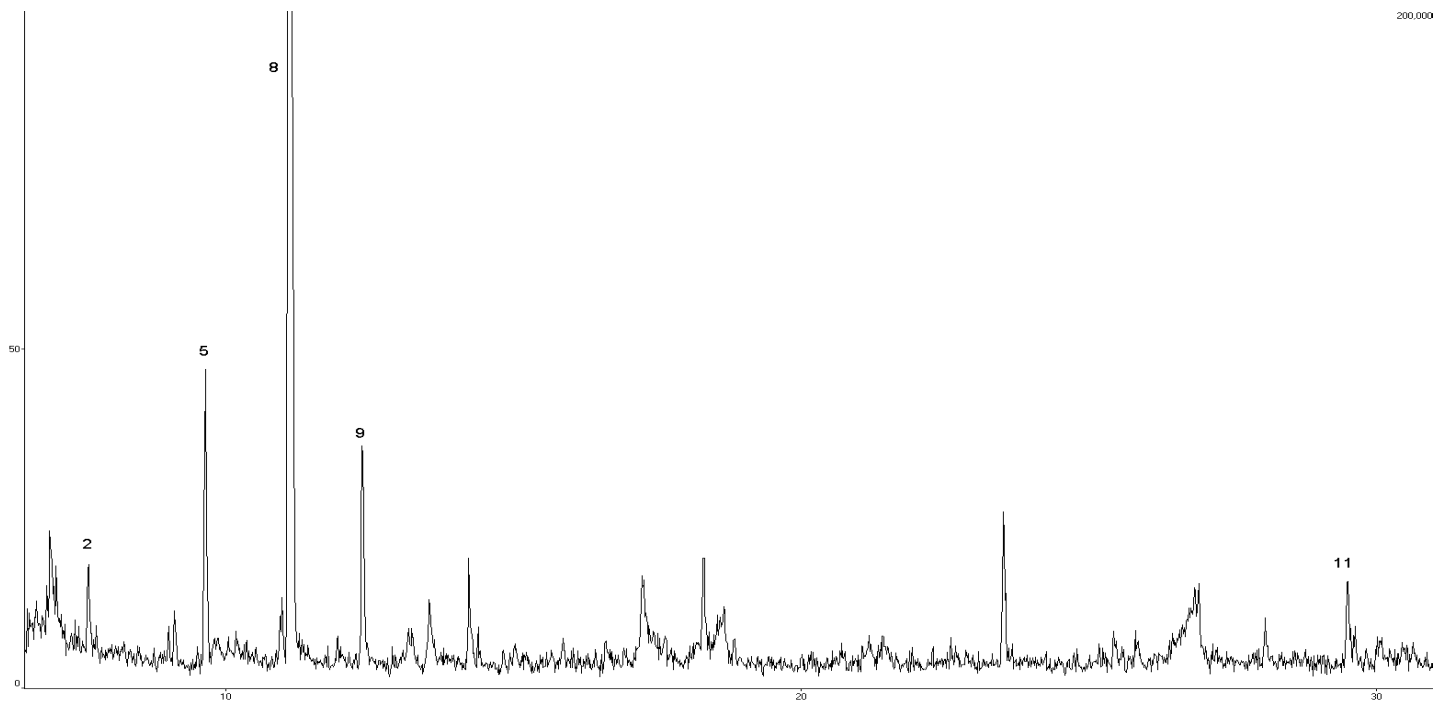
11. melléklet Tárkonyal etetett kecske tejének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=68+69+71+81+93+95+119+148$) (2: α -pinén, 4: β -pinén, 5: p -cimol, 7: limonén, 11: α -tujon, 21: kariofillén E).



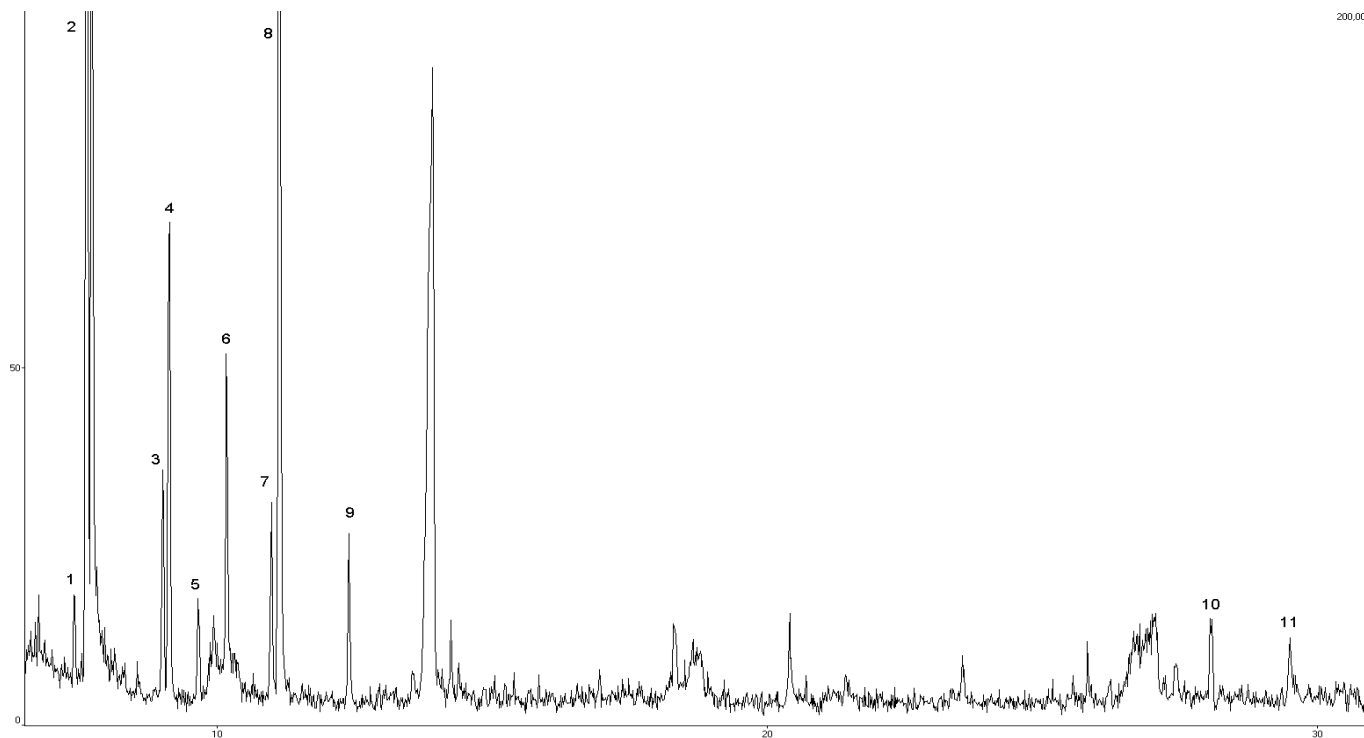
12. melléklet Útifűvel etetett kecske tejének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja
($m/z=68+69+71+81+93+95+119+148$) (5: α -pinén, 8: szabinén, 9: β -pinén, 13: p -cimol, 14: limonén,
16: α -tujon).



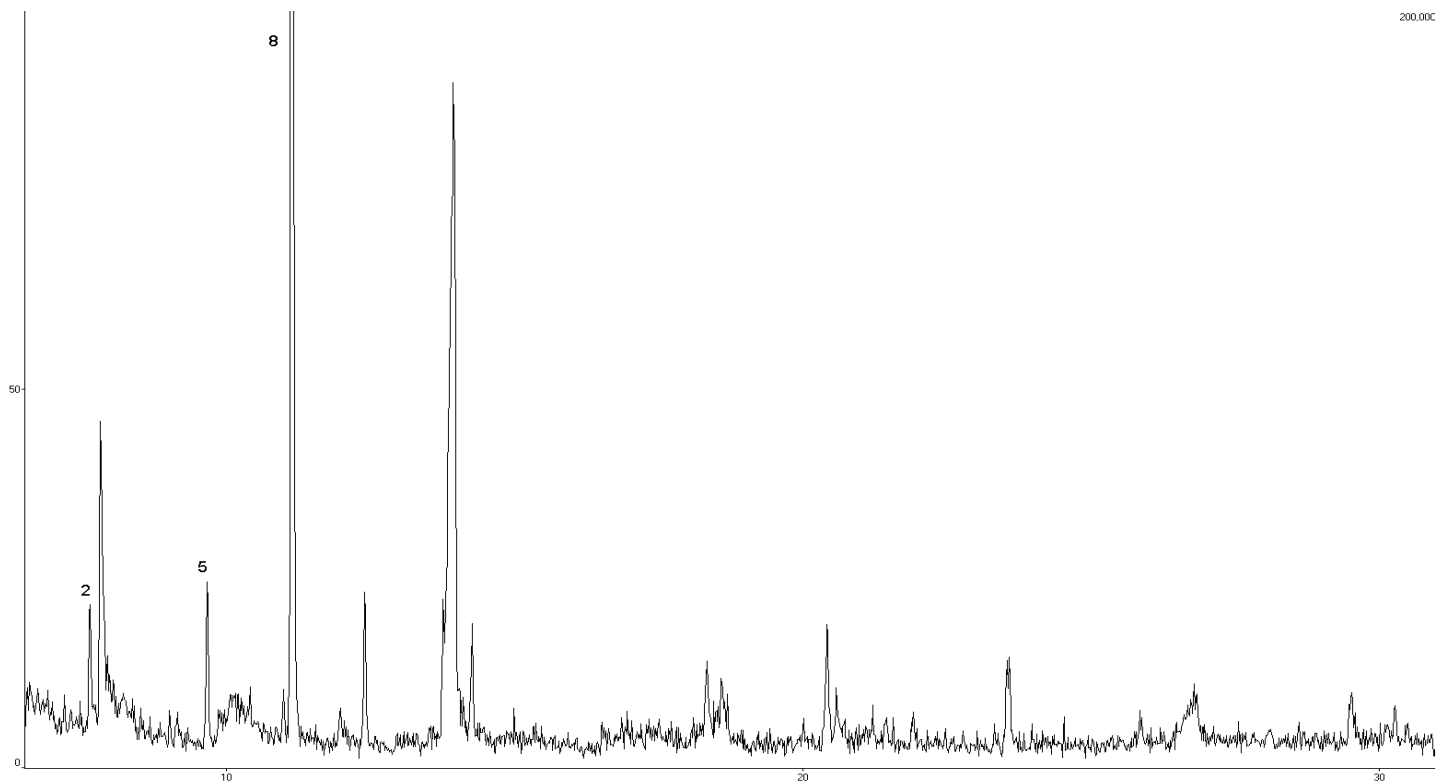
13. melléklet Zsályával etetett kecske tejének HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja
($m/z=68+69+71+81+93+95+119+148$) (4: α -pinén, 6: szabinén, 7: β -pinén, 10: *p*-cimol, 11: limonén,
15: α -tujon, 19: metilkavikol, 28: α -humulén).



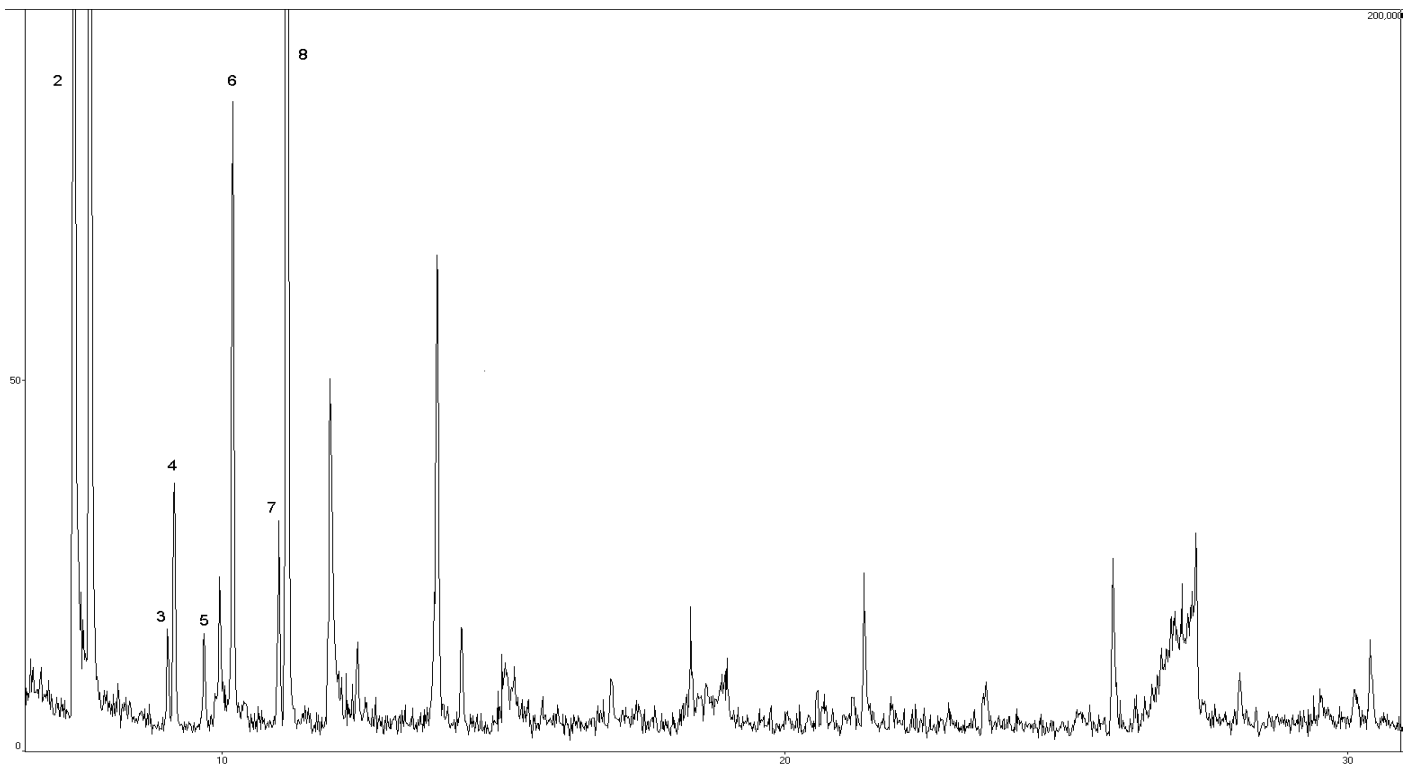
14. Melléklet Natúr trappista sajt HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119$). (2: β -pinén, 5: mircén, 8: limonén, 9: γ -terpinén, 11: α -humulén).



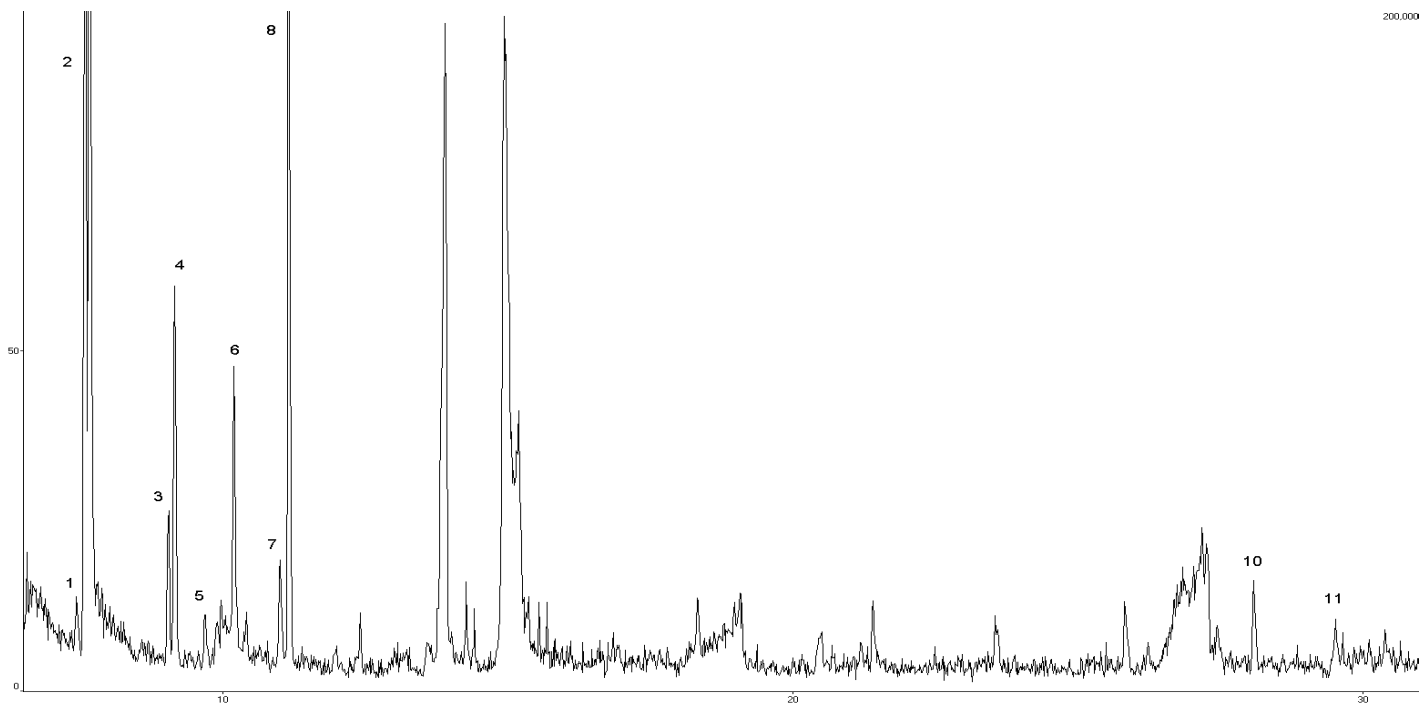
15. melléklet Gyógynövényes trappista sajt HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119$). (1: α -tujén, 2: β -pinén, 3: szabinén, 4: β -pinén, 5: mircén, 6: α -fellandrén, 7: *para*-cimol, 8: limonén, 9: γ -terpinén, 10: kariofillén E, 11: α -humulén).



16. melléklet Natúr gomolya sajt HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119$). (2: β -pinén, 5: mircén, 8: limonén).



17. melléklet Gyógynövényes gomolya sajt HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119$). (2: β -pinén, 3: szabinén, 4: β -pinén, 5: mircén, 6: α -fellandrén, 7: *para*-cimol, 8: limonén).



18. melléklet Gyógynövényes rézüstben készült sajt HS-SPME-GC-MS ionkromatogramja ($m/z=93+119$). (1: α -tujén, 2: β -pinén, 5: mircén, 6: α -fellandrén, 7: *para*-cimol, 8: limonén, 10: kariofillén E, 11: α -humulén).