



A kép illusztráció / The picture is illustration

Nagy Éva^{1,2}, Prokisch József², Daróczy Lajos³, Harangi János¹

Érkezett/Received: 2014. március/March – Elfogadva/Accepted: 2014. augusztus/August

A borsmenta hatóanyagai mézben

1. Összefoglalás

Célkitűzésünk az volt, hogy a méhészek által készített borsmentakivonatot tartalmazó mézkészítményekről bebizonyítsuk, hogy azokban megtalálhatók a gyógynövény hatóanyagai. Ennek megvalósításához olyan módszert dolgoztunk ki, amelyben a borsmenta (*Mentha x piperita*) levelek felhasználásával készült szirup és a méz illó komponenseit, azok összetételét elemeztük SPME mintavételezéssel és GC, valamint GC-MS módszerrel. A kromatográfiai elemzésekkel és az azt követő kiértékelések során sikerült bebizonyítanunk, hogy a gyógynövények illó komponenseinek nagy része a szirup révén bekerült a mézbe. Mivel az adott gyógynövényre jellemző komponensek az abból elkészített mézkészítményben is kimutathatóak, jogosan feltételezhetjük, hogy más nem illó, viszont gyógyhatásért felelős anyagok is bekerültek a mézekbe.

2. Bevezetés

A modern technikák gyors fejlődése miatt egy időre háttérbe szorult a természetes gyógyszerhatóanyagok alkalmazása. Napjainkban viszont ismét megnőtt a kereslet irántuk, egyre többen próbálják meg segítségükkel visszanyerni, illetve fenntartani egészségüket. A modern, nemrég felfedezett „csodaszerek” továbbra sem tudják visszaszorítani az olyan, már jól bevált, a hagyományos orvoslásban évezredek óta alkalmazott gyógyhatású készítményeket, mint a méz és a különböző gyógynövények.

Nagyon sok mézelő gyógynövényt ismerünk, azonban sok olyan egészségre jótékony hatással bíró gyógynövény is van, amelyekből nem lehet mézet készíteni, viszont a hatásuk miatt előszeretettel fogyasztjuk azokat. A gyógynövényekről és azok alkalmazásáról számos kézikönyv fellelhető, amelyek tudományos részletességgel ismertetik az egyes növények alkalmazási módját és annak hatását [1],[2],[3].

Egy berettyóújfalui méhészetben felmerült az az ötlet, hogy gyógynövénykivonatot adunk be a méhcsaládok egészségének feljavitására. Ezzel a várt mellett még más hatást is elértek, hiszen egyrészt a méhek egészségesebbek és erősebbek lettek, másrészt pedig a bevetett gyógynövényre jellemző ízű és színű terméket kaptak, ami alapján jogosan feltételezheték, hogy a késztermék tartalmazza a gyógynövény

komponenseit is. Ezzel a módszerrel természetes úton tudták kombinálni a méz és a gyógynövény jótékony hatását [4],[5],[6].

Az egyik ilyen bevetésre kerülő gyógynövény a borsmenta volt, amely a legnépszerűbb és legsokoldalúbban alkalmazott gyógy-és élelmiszernövények közé tartozik. Mind az élelmiszeriparban, mind a gyógyászatban a levelét használják fel, amelynek az illóolajtartalma 1-3 %, legfőbb hatóanyagai a mentol (és annak származékai), különböző flavonoidok, és rozmaringsav-származékok. Hatásmechanizmusát preklinikai és humánklinikai vizsgálatok során egyaránt felderítették. Nagyszerűen alkalmazható epe- és bélpanaszok enyhítésére, mivel relaxálja a bélrendszert simaizmainak. Ezen túl megfázásos tüneteket kezelnek vele. Bőrgyógyászatban helyi érzéstelenítőként is használják, mivel jó hűsítő, érzéstelenítő [3].

A bevetéshez megfelelő receptek alapján elkészített borsmenta levél kivonattal dúsított cukorszirupot alkalmaztak a méhészek [5]. Fontos leszögezni, hogy az így előállított termék mézként nem forgalmazható, hanem „TÖBBMINTMÉZ” fantázianévvel találkozhatunk ezzel a mézédessé gyógyhatású készítménnyel.

Vizsgálataink célja az volt, hogy bebizonyítsuk: a gyógynövények illó komponensei valóban kimutathatóak a kész mézben, így közvetve az is bizonyítható, hogy a gyógynövény hatóanyagért felelős kompo-

¹ FOODLAB Kft.

² Debreceni Egyetem, Mezőgazdasági-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet

³ Y-FOOD Élelmiszeripari, Kereskedelmi és Szolgáltató Kft.

¹ FOODLAB Ltd.

² University of Debrecen, Faculty of Agriculture, Food Science and Environmental Management, Institut of Veterinary Sciences, Biotechnology and Natural Protection, Department of Livestock

³ Y-Food, Food Industrial, Trade and Service Ltd.

nensei is behordásra kerültek. A vizsgálatok két feladatot céloztak: egyrészt az illó komponensek azonosítását, amelyet gázkromatográf-tömegspektrometriás mérésrel végeztünk, másrészt a kromatográfiás ujjlenyomat készítését, amelyhez gázkromatográfiás elemzést alkalmaztunk [7]. A mézmintában és annak gőzterében jelen lévő illékony és fél-illékony szerves vegyületek jelentősen hozzájárulnak a méz ízéhez, meghatározzák, hogy mely növényről származnak, és milyen kezelési módnak vetették alá azokat. Az aromaanyagok segítségével meghatározhatjuk, hogy a gyógynövény, a belőle készült szirup és az abból készült méz milyen hasonlóságot mutatnak.

Az illó komponensek meghatározása történhet gőztér (head space, HS) elemzéssel, vagy szilárd-fázisú mikroextrakciós (solid phase micro extraction, SPME) módszerrel. Ez utóbbi eljárás alkalmas arra is, hogy az illó komponensek összetétele alapján a méz eredete is megadható legyen [8]. A nem illékony komponenseket szilárd fázisú extrakciót követően folyadékkromatográfiás módszerrel lehet elemezni [9]. Jelen vizsgálatok csak az illó komponensek elemzését célozták.

3. Anyag és módszer

3.1. Mintaelőkészítés

Az SPME mintaelőkészítés kézi eszközzel történt.

- Az alkalmazott SPME szál: 85 µm poliakrilát szál.
- Extrakciós idő: 1 óra
- Extrakciós hőmérséklet: 50°C
- Deszorpciós hőmérséklet: 200°C (a gázkromatográf injektorában)
- Deszorpciós idő: 30 másodperc

Az SPME mintavételezéshez a méz és szirup mintákat jól zárható, szeptummal ellátott edényekbe mérjük be, amelyekből a szeptumon keresztül végeztük az extrakciót.

A gázkromatográfiás elemzések Hewlett-Packard gyártmányú 5890 Series II típusú készüléken történtek. A gázkromatográf split-splitless injektorral és lángionizációs detektorral volt felszerelve. Az elemzési körülmények a következők voltak:

- Kolonna: HP-5 állófázisú kapilláris oszlop, 25 m x 0,25 mm x 0,25µm
- Vivőgáz: nitrogén (1 mL/perc, 40°C), állandó nyomás
- Elemzési hőmérséklet: 40°C 2 percig, ezt követően 5°C/perc felfűtés 200°C-ig
- Teljes elemzési idő: 44 perc
- Injektor hőmérséklet: 200°C
- Injektor liner: töltet nélküli szilanizált liner
- FID hőmérséklet: 300°C

A gázkromatográf vezérlését, az adatgyűjtést és az eredmények kiértékelését Agilent Chemstation rev.10 programmal végeztük.

A GC-MS elemzések Hewlett-Packard gyártmányú 5890 Series II típusú gázkromatográf – 5971A típusú

tömegspektrométeren történtek. A gázkromatográf split-splitless injektorral és lángionizációs detektorral volt felszerelve. A gázkromatográfiás elemzési körülmények az előbbiekkal azonosak, kivéve:

- Vivőgáz: hélium (1 mL/perc, 40°C), állandó injektor nyomás

A tömegspektrométer paraméterei:

- Transzfer line hőmérséklet: 280°C
- Ionizáció: 70eV
- Tömegtartomány: 10-500 AMU

A gázkromatográf-tömegspektrométer vezérlését, az adatgyűjtést és az eredmények kiértékelését Hewlett-Packard GC-MS Chemstation rev.3 programmal végeztük. A komponensek azonosítását a tömegspektrumok felhasználásával NIST és Wiley adatbázisok segítségével végeztük. Az azonosításhoz a retenciós indexeket is felhasználtuk, az indexeket kézikönyvekben megtalálható adatok alapján azonosítottuk [10], [11].

4. Eredmények

A GC-MS elemzések során az egyes minták komponenseinek azonosítását végeztük, meghatároztuk azokat a komponenseket, amelyek a borsmentára jellemzők. A TIC (total ion chromatogram) eredmények felhasználásával az azonosított normál láncú zsírsavak etilésztereinek ismert retenciós indexei alapján minden komponens retenciós indexét kiszámoltuk. Az index adatok segítségével a kézikönyvekben lévő adatokkal összevetve az azonosításokat meg lehetett erősíteni, illetve bizonytalan esetekben az azonosítás megtörténhetett (**1. táblázat**).

1. táblázat: A borsmenta szirup és méz néhány specifikus komponense
Table 1: Some specific components of peppermint honey and syrup

Komponens Component	CAS	Index
1,8-Cineole	470-82-6	1030
Phenylethyl alcohol	60-12-8	1111
Neomenthol	491-01-0	1178
L-Menthol	89-78-1	1188
α-Neo-iso-menthol	491-02-1	1198
Isomenthol	490-99-3	1202
α-Terpineol	10482-56-1	1206
Piperiton	89-91-6	1268
Thymol	89-83-8	1306
Eugenol	97-53-0	1369
β-Damascenone	23726-93-4	1397
Viridiflorol	552-02-3	1603

A kapott tömegspektrumok segítségével az általánosan ismert mentol származékok mellett néhány olyan komponenst is kimutattunk, amelyekkel ritkán találkozunk gyógynövényekben. Ilyen vegyület például a viridiflorol, amelynek tömegspektruma az **1. ábrán** látható.

The active ingredients of peppermint in honey

Éva Nagy^{1,2}, József Prokisch², Lajos Daróczy³, János Harangi¹

Keywords: peppermint, honey, herbs, honey keeper, SPME extraction, volatile components;

1. Summary

Apiarists let prepare by bees honey products containing medicinal drugs. Our aim was to prove that the active ingredients originated from the herbs are also present in the honey products. To fulfill that task we developed a method analyzing the volatile components of the syrup and honey prepared using the leaves of peppermint (*Mentha x piperita*). That method involves a sample preparation by SPME followed by GC and GC-MS analysis. The analyses and the data evaluations proved that the volatile components of the herb containing syrups were transferred to honeys by bees. As the characteristic components of certain herbs could be identified also in the honey product it is obvious that the components responsible for the medicinal effects (if they are not identical with the volatile components) are also transferred to honey.

2. Introduction

The use of the natural medicine ingredients was suppressed for a while because the development of the modern techniques. However, nowadays the demand increases; more and more people try to recover and keep their health with the help of those natural medicines. The novel recently discovered panaceas still cannot overshadow those medicinal drugs which are used for thousands of years by the traditional medicine like different honeys and herbals.

There are lots of medicinal plants as nectar source but there are several other useful herbals which cannot serve as nectar source. There are lots of handbooks known about medicinal plants and their use which contains detailed scientific description of the different plants and their effect [1], [2], [3].

Apiarists at Berettyóújfalu have got an idea to feed the bees with extracts of medicinal plants to improve their health. They reached more benefit as they planned because the bees became healthier and stronger and they produced a honey with similar taste and colour to the herbal was feed. Therefore it is obvious that the components responsible for the medicinal effects are also transferred to honey. With this procedure they could combine the beneficial effects of honey and herbs on natural way [4],[5],[6].

One of the used herbals was peppermint which is a very famous and versatile medicinal and food plant. The leaves are used in food industry and medicine as well. The leaves contains 1-3 % essential oils, the main components are menthol (and its derivatives), different flavonoids, and rosemary acid derivatives. The mechanism of its effect is confirmed by preclinical and human clinical studies, as well. Since it relaxes the smooth muscle of intestinal tract it is very suitable to relieve bile and intestinal problems. Besides, it is useful for catarrhal symptoms. In dermatology it is used as local analgesic because it has anaesthetic and refrigerant effect [3].

To feeding the bees the beekeepers prepared syrup enriched with the extract of peppermint according to appropriate recipes [5]. Therefore it is important that the trade of this product as honey is not allowed but those honey products are labelled as "MORETHANHONEY" (in Hungarian: „TÖBBMINTMÉZ”).

The aim of our studies was to prove that the volatile components originated from the herbs are also present

in the honey products thus it is indirectly demonstrable that the active ingredients are also present. There were two tasks in our research: on one hand to identify the volatile components with gas chromatography-mass spectrometry and on the other hand to create a chromatographic fingerprint with gas chromatography [7]. The volatile and semivolatile organic compounds present in honey and in its headspace are responsible for the taste of the honey they show the origin and the kind of the treatment. By means of the analysis of volatile component compositions we can determine the similarity of the herbs, the syrup was made from herbs, and the final produced honey.

The analysis of the volatile components is possible by headspace or by solid phase microextraction (SPME) methods. The last one is also suitable to define the botanical origin of the honey based on the volatile components composition [8]. The analysis of the non volatile components can be made by solid phase extraction followed by liquid chromatographic analysis [9]. The aim of the present study was the analysis only of the volatile components.

3. Materials and methods

3.1. Sample preparation:

The SPME sample preparation was made with manual tool. The honey and syrupy samples were placed into lockup sample vials equipped with septa. The extraction was made through the septum.

- SPME fibre: 85 µm poliacrylate
- Extraction time: 1 hour
- Extraction temperature: 50°C
- Desorption time: 30 sec
- Desorption temperature: 200°C (in the GC injection port)

The GC analyses were performed on a Hewlett-Packard made 5890 Series II instrument equipped with split-splitless injector and FID.

- Column: HP-5 capillary column x 0,25 mm x 0,25µm
- Carrier gas: nitrogen (1 mL/min, constant pressure)
- Temperature program: 40°C 2 min followed by 5°C/min up to 200°C
- Analysis time: 44 min
- Injector temperature: 200°C
- Injector liner: liner without packing
- FID temperature: 300°C

Agilent Chemstation rev.10 was used for system control, data acquisition, and data evaluation.

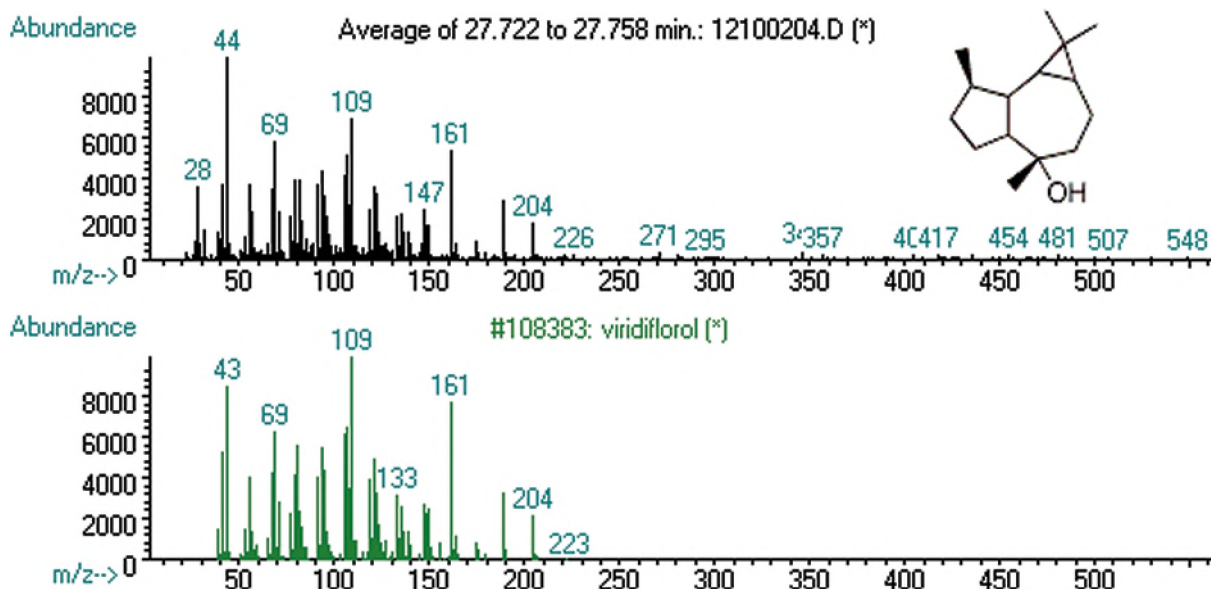
The GC-MS measurements were made on a 5890 Series II – 5971 mass spectrometer system. The gas chromatograph has split-splitless injector and FID detector. The GC parameters were the same as above but:

- Carrier gas: helium (1 mL/min, constant pressure)

Mass spectrometric parameters:

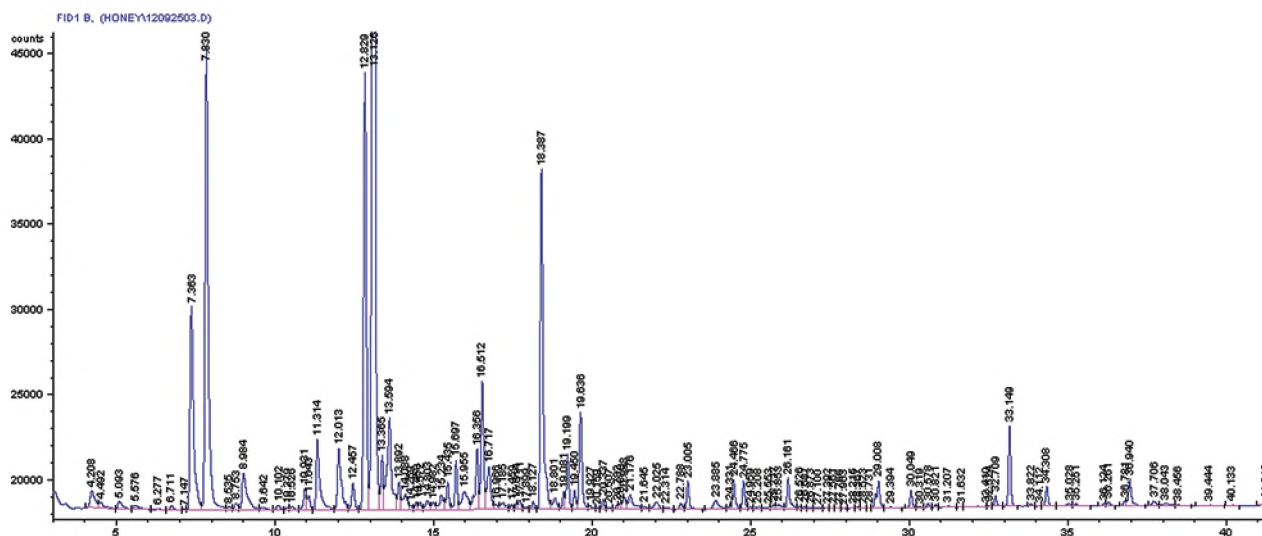
- Transfer line temperature: 280°C
- Ionization: 70eV (for library searchable spectra)
- Mass range: 10-500 AMU

Hewlett-Packard GC-MS Chemstation rev.3 was used for system control, data acquisition, and data evaluation. The components were identified using Wiley and NIST databases and using retention indices from different manuals [10], [11].



1. ábra: A viridiflorol azonosítása a tömegspektruma alapján
 Figure 1: The determination of the viridiflorol with its mass spectra

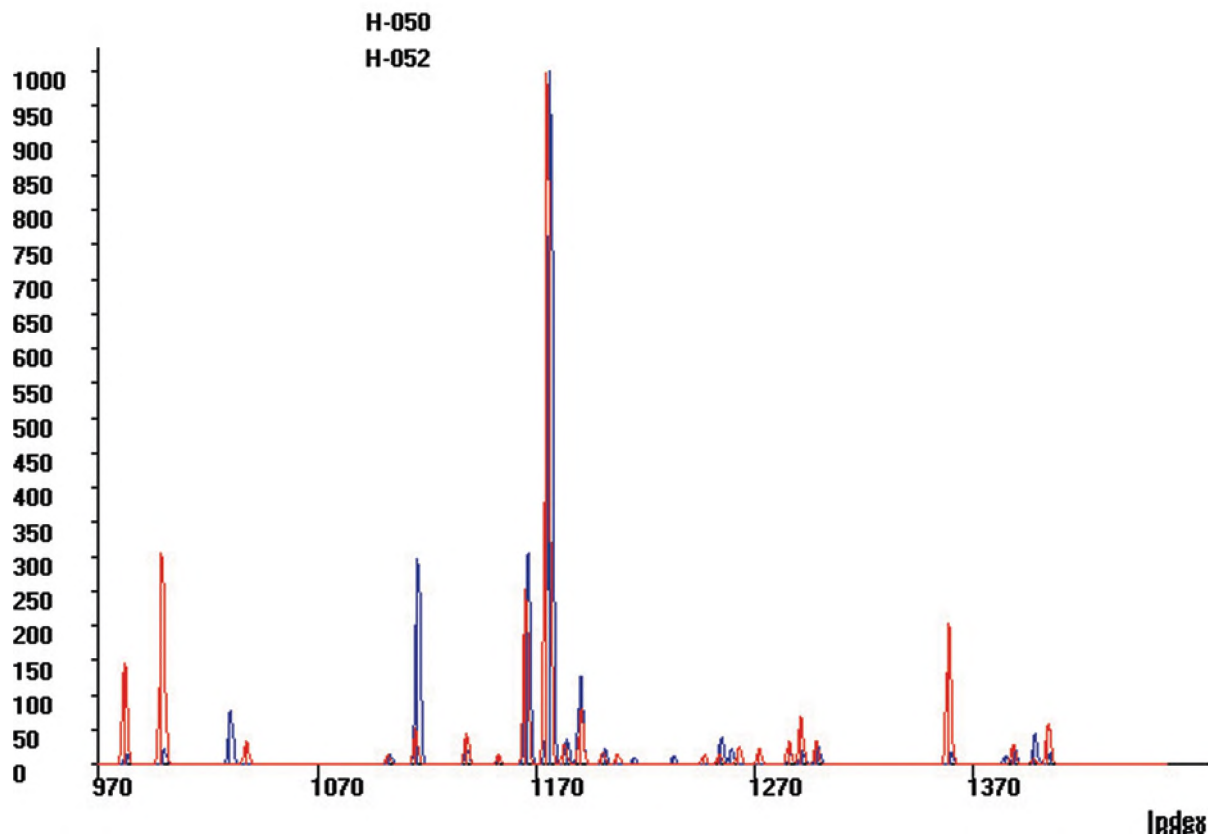
A 2. ábrán látható gázkromatogramok kiértékelését, az indexek meghatározását a PICI programmal végeztük [7], retenciós index referenciaként a mintákban jelen lévő telített láncú zsírsav etilésztereket használtuk.



2. ábra: A borsmenta méz illó komponenseinek kromatogramja (SPME-GC-FID)
 Figure 2: The chromatogram of volatile components in peppermint honey (SPME-GC-FID)

A PICI program a gázkromatográfiai elemzések eredményét felhasználva állítja elő a kromatográfiai ujjlenyomatot, amelyet adatbázisban tárolunk. Ezeket összehasonlítva határozza meg a szoftver a kromatogramok hasonlóságát. A borsmenta esetében a

méz és a szirup illó komponensei azonosak, a komponensek mennyiségi arányaiban található eltérések a méhek által végzett méz érlelési folyamattal értelmezhetők (3. ábra).



3. ábra: Borsmenta tartalmú szirup és méz illó komponenseinek összehasonlítása
Figure 3: The comparison of the volatile components in peppermint syrup and honey

5. Következtetések

A bemutatott mérési eredmények alátámasztják azt a feltételezést, hogy a méhek a gyógynövény tartalmú sziruppal történő etetéskor a gyógynövények komponenseit behordják, a keletkező méz (amely természetesen tartalmazza a behordott nektár eredetű mézet is) kimutathatóan tartalmazza a gyógynövények illó komponenseit. Ez közvetve bizonyítja, hogy a gyógynövény valamennyi komponense belekerül a mézbe, vagyis a gyógyhatásért felelős komponensek (akár illók, akár nem) a méz alkotóivá válnak. Az így előállított méztermék jól fogyasztható gyógyhatású készítmény, amely az eredeti gyógynövényből nyerhető készítményhez (tea, extrakció stb.) hasonlóan tartalmazza a gyógyhatásért felelős komponenseket.

6. Irodalom

- [1] Ody P. The complete medicinal herbal (1993): A practical guide to the healing properties of herbs, with more than 250 remedies for common ailments. DK ADULT
- [2] Schönfelder I, Schönfelder P. (2005): Gyógynövényhatározó. Kaposvár: Holló és társa Kft.
- [3] Csupor D, Szendrei K. (2012): Gyógynövénytar-útmutató a korszerű gyógynövény alkalmazáshoz. 2. kiadás ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.
- [4] Molan P. (1999): Why honey is effective as a medicine. I. its use in modern medicine. Bee World 80 (2) p. 80-92.

[5] Sáfian J (2012): Méhek etetése gyógynövény tartalmú takarmánnyal. (személyes közlés)

[6] Szalay L, Halmágyi L. (1998): Gyógyító mézek és mézelő gyógynövények. Budapest: Magyar Méhészek Egyesülete

[7] Harangi J. (2008): Chromatographic Index - Intensity Fingerprint: Identification of Multicomponent Samples. Chromatographia. 68 (0) p. 77-83

[8] Cuevas-Glory LF, Pino JA, Santiago, LS, Sauri-Duch E. (2007): A review of Volatile Analytical Methods for Determining the Botanical Origin of Honey. Food Chem. 03 (3) p. 1032-43

[9] Dimitrova B, Gevrenova R, Anklam E. (2007): Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin By Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. Phytochem Anal. 18 (1) p. 24-32

[10] Cserhádi T. (2010): Chromatography of Aroma Compounds and Fragrances. 1st Edition Ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag

[11] Tarján G, Takács JM. (2012): Essential Oils, Manual for Gas-liquid Chromatography Analysis. Budapest

„A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg”.

4. Results

During the GC-MS analysis we identified the components of the different samples and determined the specific compounds of the peppermint. We calculated the retention indices of the components using the known retention indices of identified straight-chain saturated fatty acid ethyl esters from the TIC (total ion chromatogram). The identification was confirmed by the comparison of the data from the handbooks of indices data (**Table 1**).

With the help of the measured mass spectra we identified some components besides the well-known menthol derivatives which occur rarely in medicinal plants (e.g. viridiflorol, **Figure 1**).

For the evaluation of the GC chromatograms (**Figure 2**) and the determination of the indices were used the PICI software [7]; we used the saturated fatty acids of the samples as retention index references.

The PICI software uses the results of the gas chromatographic analysis to create the chromatographic fingerprints which are stored in a database. The software compares them and determines the similarity of the chromatograms. In the case of peppermint, the volatile components are the same in honey and syrup samples; there are only quantity differences because of the ageing process made by bees (**Figure 3**).

5. Conclusions

The presented results of the measurements confirm the assumption, that the components of the herb containing syrups were transferred to the honeys by the bees. The volatile components of the herbs are present in the prepared honey (which contains the honey made from the natural nectar sources, as well). It proves indirectly that all of the components of plants are transferred to the honey, therefore the active ingredients (volatile or non volatile) become components of honey. The honey products made in this way are useful medicines and contain the compounds which are responsible for the medicinal effect like other products (e.g. tee) made from the original herbs.

LC-MS/MS módszerek alkalmazása az élelmiszeranalitikában (részlet)

dr. Tölgyesi Ádám, NÉBIH

Az élelmiszer minták összetételüket tekintve a legkomplexebb mátrixok közé tartoznak így a mai modern élelmiszeranalitikai meghatározások megkövetelik a legpontosabb, legszelektívebb és legérzékenyebb technikák alkalmazását. A mátrixoktól a reziduumok elválasztása sok esetben kapcsolt technikák (LC-MS/MS QQQ) alkalmazását igényli, amelyek lehetővé teszik a célmolekulák ultranyomnyi kimutatását még a legösszetettebb mintákban is. Ilyen célokra 2007 novemberétől van lehetőségem használni az Agilent legelső hármaskvadropol rendszerű LC-MS/MS készülékét, a 6410A jelzésű modellt. A laboratórium 2010. áprilisi NAT auditálása során 16 ilyen módszer került akkreditálásra a készüléken, és ez a módszerszám még négygel bővült.

Amfenikolok meghatározása állati eredetű élelmiszerekből

Az amfenikolok csoportjába tartoznak engedélyezett szerek, mint tiamfenikol (TAP) és flórfenikol (FAP), mégis a legismertebb amfenikol a klóramfenikol (CAP), ami tiltott (MRPL 0,3 µg/kg). Laboratóriumainkban a CAP szűrő mérése (screening) enzimjelzésű kompetitív immunanalitikai módszerrel folyik (ELISA). A screening méréssel pozitívként értékelt

minták megerősítő (konfirmációs) mérésére LC-MS/MS módszert fejlesztettünk, mellyel 2010-ben nemzetközi körvizsgálatban (szervező: ANSES EU-RL, Fougères, Franciaország) vettünk részt. Pisztráng mintákból kellett a CAP-ot kimutatni ismét µg/kg-os szint alatt. Az általunk mért értékek 0,15 és 0,21 µg/kg-nak adódtak, melyekre számolt Z értékek -0,28 és -0,37 voltak. A pisztráng minták tényleges CAP koncentrációi 0,15 és 0,23 µg/kg voltak.

Összefoglalás

A bemutatásra került módszerek szemléletesen mutatják, hogy az LC-MS/MS technika milyen széles körben alkalmazható különböző hatóanyagok (szteroidok, antibiotikumok, mikotoxinok) meghatározására akár a legösszetettebb mátrixokból (testi fluidumok, szövetek, tej, stb.) is. A pontos analízis kulcsa egy jó előkészítés és egy jó műszer. Az Agilent készülék több tízezer kromatogram felvétele után is megbízhatóan használható a szermaradékok nyomnyi kimutatására.



The logo for 'Kromat' features the word 'kromat' in a lowercase, sans-serif font. The letter 'o' is replaced by a stylized circular graphic consisting of two concentric blue circles, with the 'r' and 'm' partially overlapping the inner circle.