

# Biológiailag aktív kapszicidin kimutatása és meghatározása paprikában agardiffúziós módszerrel

G Á L I L O N A E M M A

Budapest Főváros Vegyészeti és Élelmiszervizsgáló Intézete

Érkezett: 1968. július 18.

A kapszicidin a paprika növénynek (*Capsicum annum* L.) 1963-ban izolált alkotórésze, három szteroid-szaponin keverékéből álló fitoncíd, amely a termés érett magjainak aleuronszemcséiben és a növény gyökerében fordul elő. E szervekből nyert vizes kivonatok meghatározott körülmények között antibiotikus hatásúak [1, 2, 3, 4, 5, 6].

A hatóanyag kimutatása és félkvantitatív meghatározása a növényi anyagban a szaponinok valamelyik jellegzetes sajátságán, a felületaktivitáson, vagy a hemolizáló hatáson alapulhat. Mindkettő nagymértékben függ a pH-tól és a kísérőanyagoktól, utóbbi a felhasznált vér minőségétől és tárolási idejétől is és így világszerte felmerült az igény új, egyszerűbb vizsgálati módszerek bevezetésére [7].

Már a régebbi irodalom is beszámol a szaponinok élesztőgátló hatásáról [8]. Ezt a hatást az agardiffúzió körülményei között kipróbáltuk és különösen a *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub> tesztörzs alkalmazása mellett jól észlelhető gátlási zónákat kaptunk [4, 9].

Kísérleti tapasztalataink szerint az élesztőgátló antibiotikus hatás észlelése és intenzitásának mérése agardiffúzió útján lényegesen egyszerűbb vizsgálati eljárás, mint a hemolizispróba. Nagy előnye, hogy a pH-tól és a kísérőanyagoktól nagymértékben független, a tesztörzs könnyen beszerezhető és időnkénti áttöltéssel évekig eltartható. Csak félsterilitást igényel és ezért kémiai laboratóriumokban is használható. Jól beilleszthető a munkanapba is: délután beállítva másnap reggelre már tájékoztató értékeket szolgáltat.

Vizsgálati eredményeink alapján a kapszicidin kimutatására és félkvantitatív meghatározására az agardiffúzió módszerét alkalmaztuk, tesztörzsül pedig a *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub> élesztőtörzset választottuk. Húsléalapú standard tápagarlemeket oltottunk be felületileg a tesztmikróbával (pH 7,2), 28 °C-on inkubáltunk és a gátlási zónák átmérőjét 24 óra után olvastuk le.

A kapszicidin hemolizáló hatásának vizsgálatával párhuzamosan végzett agardiffúziós kísérleteink során a hemolizáló és fitoncíd hatás között egyezés volt megfigyelhető: Minden hemolizáló hatású kapszicidinkivonat élesztőgátló hatással is rendelkezett, inaktív nyersanyag pedig mindkét próbánál hatástalannak bizonyult. Így az agardiffúziós próba a *hemolizispróba helyettesítésére* szolgálhatott. — Más szaponinokkal ilyen párhuzamos vizsgálatokat nem végeztünk, úgyhogy azoknál a helyettesíthetőség kérdése külön tanulmányozásra szorul.

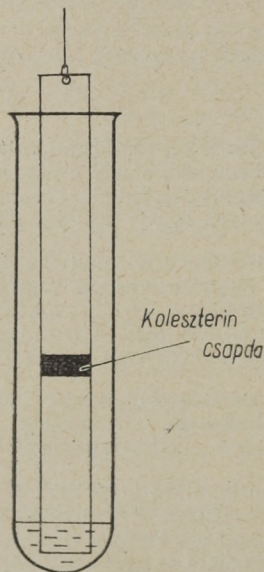
## A kapszicidin kimutatása

1. *Hemolizispróba koleszterin inaktiválással egybekötve.* (Hagyományos módszer szaponinok kimutatására.)

A hemolízispróbát a biztonságos kimutatás érdekében specifikus szaponinreakcióval kell kiegészíteni, minthogy a növényi anyagokban a szaponinokon kívül más hemolizáló hatású vegyületek is előfordulhatnak: A hemolizáló hatást a szaponinnak koleszterinnel való reagáltatásával megszüntetik, majd a képződött inaktív komplexvegyület – pl. xilolos – elbontásával a biológiai hatást újra visszaállítják. (A komplex forró xilolban azért bontható, mert ennek forráspontja elég magas ahhoz, hogy hőokozta disszociáció következék be.)

A leírt eljárásnak egyszerű kivitelezési módja a következő (10):

Szűrőpapiresíkon „koleszterincspadát” létesítünk, vagyis a csíkot egy keresztben húzott vonal mentén 1%-os alkoholos koleszterinoldattal itatjuk át. Az oldószer elpárolgása után az impregnált csík egyik végét a szaponintartalmú vizes kivonatba merítjük és az oldatot az impregnált vonalon túra szivatjuk fel. (1. ábra) Ezután a nedves papiroscsíkot folyóvízben alaposan kimossuk, az impregnált részt kivágjuk, megszáritjuk, egy darabját vérszelatinra helyezve megállapítjuk, hogy nem hemolizát; egy másik darabját néhány ml xilollal pár percig forraljuk, lehűlés után a xilolt leöntjük, majd a papírszelét két éterrel jól kimossuk. Az éter elpárolgása után a papír vérszelatinra helyezésével megállapítható, hogy a biológiai aktivitás, a hemolizáló hatás helyreállt.



1. ábra  
(koleszterin-csapda)

## 2. Agardiffúziós próba

### a) koleszterines inaktiválással egybekötve

Az 1. alatt leírt módszer minden további nélkül alkalmazható agardiffúziós változatban is oly módon, hogy az előkezelt szűrőpapírdarabokat vérszelatin helyett az élesztőtörzzsel oltott táp-agarra helyezzük és az antibiotikus hatás alakulását kísérjük figyelemmel.

Tapasztalatunk szerint a kapszicidinnál a koleszterines inaktiválással egybekötött próbák (hemolízis és agardiffúzió egyaránt) nem minden esetben sikerülnek, hanem csupán akkor, ha az aktív anyag oldott állapotban van jelen a vizes kivonatban. Az érett paprikamagvak vizes kivonataiban, a tejszerű aleuron-szuszenziókban azonban a kapszicidin nagyrésze az aleuron-szemcsékbe zárva, oldhatatlan állapotban fordul elő, nem képes a koleszterinhez kötődni, a vizes kimosásnál lemosódik a papírról és így a próba csődöt mond.

Újabbán egyszerű módosítással mégis sikerült a paprikamag-kivonatban foglalt hatóanyag komplexalkotását a koleszterinnel megvalósítani: Koleszterinnel impregnált szűrőpapírkorongokra (átmérőjük pl. 9 mm) mikropipettával, vagy kapillárisal ráviszjuk a vizsgálandó kivonatot, majd – még nedvesen – ráhelyezzük az oltott tápagarlemezre. A kapszicidin az aleuron-szemcsék hártáján át lassan kidiffundál, reagál a koleszterinnel, s így létrejön az inaktív, gátlási zónát nem adó komplex.

## b) Hőkezeléses inaktíválási próba

A kapszicidin kimutatására felhasználható stabilizációs folyamata is, vagyis a hatóanyag érzékenységének sajátos változása az állásidő függvényében: A paprikából hideg vízzel készült kivonatok azonnali hőkezelés (vagy pH változás) esetében inaktíválódnak, majd az érzékenység a külső behatásokkal szemben fokozatosan csökken és 1–2 órás állás után a hidegvizes kivonat ugyanazon behatásokra már nem inaktíválódik, hanem aktív marad (4).

2. ábra

A kapszicidin kimutatása (ad 2b)

Középen: Paprikamagörlemény, kezeletlen.

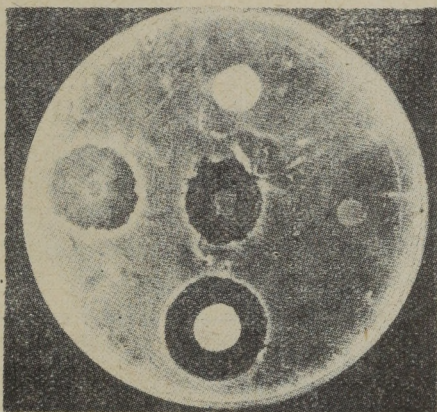
A) Szűrőpapírkorong és magörlemény gátlási zóna nélkül: Hidegvizes kivonat szűrlete és szűrési maradéka azonnali hőkezelés után.

B) Szűrőpapírkorong és magörlemény gátlási zónával: Hidegvizes kivonat szűrlete és szűrési maradéka 2 órai állás után hőkezelve.

Standardagar húsléalapon, pH 7,2

Teszt törzs:

*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub>



A próba kivitelezése: Előkísérletek (pl. oltott tápagarlemezre való egyszerű ráhelyezés és inkubálás) során aktívnak bizonyult, felaprított növényi anyaghoz kémcsőben 10–20-szoros mennyiségű hideg vizet adunk és 1 percig kézzel erősen rázzuk. A folyadékot gyorsan átöntjük vattaszűrőn, majd kettéosztjuk a szuszpenziót: Egyik részét a kémcsőnek (4–5 percre) forrásban levő vízfürdőbe állításával azonnal inaktíváljuk (A), másik részét szobahőmérsékleten való pl. 2 órás állás után hőkezeljük ugyanúgy (B). Ezután mindkét részt oltott tápagarlemezre visszük fel – lehet szűrőpapírkorongra szivattással is – és inkubálunk. Ha A) inaktív és B) aktív, ez kapszicidin jelenlétére utal. A szűrési maradék is hasonlóan viselkedik, mint a szűrlet. (2. ábra)

### A kapszicidin meghatározása

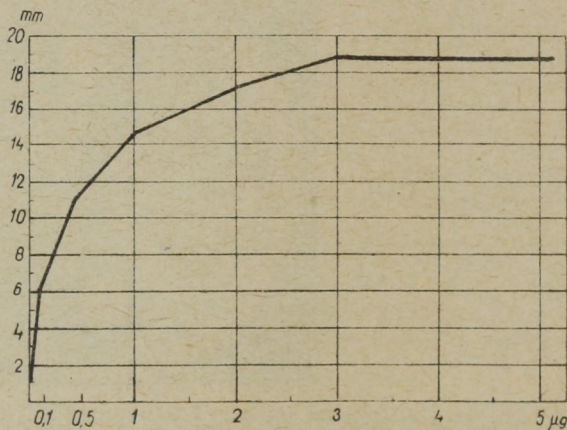
Ismert, a növényi antibiotikumok mennyiségének becslésére régóta és széles körben elterjedt agardiffúziós módszer szerint (11) valamely hatóanyag – a gátlási zónák átmérője alapján felvett kalibrációs görbe segítségével – félkvantitatívan meghatározható.

Élesztőgátló hatása alapján a módszer kapszicidinra alkalmazható volt. A kalibrációs görbét tisztított – koleszteriden át előállított (2) – kapszicidin-készítménnyel vettük fel. A fitoncidot egy *Kawasaki* és *Miyahara*-tól szteroidszaponinok oldására ajánlott oldószerben, metanol kloroform 1:1 arányú keverékben (12) oldottuk, minthogy ez könnyen párolog és így a hatóanyag az oldat felszívására használt szűrőpapírkorongokon könnyen koncentrálható.

A szűrőpapírkorongok (Schleicher & Schüll 2043 b) átmérője nem volt egyforma: 9 mm szokványos átmérővel csak azok rendelkeztek, amelyekeken a felvitt kapszicidin mennyisége elég nagy volt ahhoz, hogy legalább 11 mm-es gátlási zónát adjon, vagyis a 3. ábra szerint legalább 0,5  $\mu\text{g}$ . Az átlagban 6–10 mm-es gátlási zónát adó, 0,1–0,5  $\mu\text{g}$  közötti mennyiségekhez 5 mm átmérőjű szűrő-

papírkorongokat használtunk, 0,1  $\mu\text{g}$  alatt pedig százszoros mennyiséget vittünk fel 1  $\text{cm}^2$  méretű — négyzetmilliméteres grafitceruzahálózattal ellátott szűrőpapírra és ezt az oldószer elpárolgása után szétváltuk az előre bejelölt négyzetmilliméterekre. Az oldószer elpárolgása után a hatóanyagot tartalmazó szűrőpapírkorongokat a  $T_{22}$  élesztőtörzssel frissen beoltott és megszáritott, az MSZ 3644 előírása szerint házilag készült húsléalapú univerzál tápagarra helyeztük, majd 28  $^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. A gátlási zónák átmérőjét 24 óra után olvastuk le.

A kalibrációs görbét a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra  
A kapszicidin kalibrációs görbéje. A gátlási zóna átmérője (mm) a felvitt kapszicidin mennyiségének ( $\mu\text{g}$ ) függvényében  
Húsléalapú standardagar, pH 7,2  
Tesztörzs: *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*  $T_{22}$

Amint az ábrából látható, 1  $\mu\text{g}$ -tól kezdve a görbe csak igen csekély emelkedő tendenciát mutat és 3  $\mu\text{g}$ -tól kezdve már gyakorlatilag párhuzamos az abszcisszával. A maximális felvitt mennyiségnek (30  $\mu\text{g}$ ) megfelelő gátlási zóna átmérője is csak 22 mm volt. Ebből következik, hogy a kapszicidin tájékoztató meghatározására kis koncentrációkkal kell dolgozni.

Ha az 1  $\mu\text{g}$  alatti tartományból egy gátlási zónaátmérőt önkényesen vonatkozási alapul fogadunk el, akkor mód van arra, hogy egy kapszicidintartalmú kivonatból hígítási sorozatot készítve kiválasszuk azt a tagot, amely ilyen átmérőjű gátlási zónát ad. Ismerve a felvitt térfogatot és a zónának megfelelő tiszta kapszicidin mennyiségét, az aktív kapszicidintartalom kiszámítható.

Ilyen vonatkozási alapnak — tapasztalataink szerint — legalkalmasabb a 6 mm-es zónaátmérő, illetve az ennek megfelelő 0,1  $\mu\text{g}$  kapszicidin. A tényleges mérésnél a még jól kezelhető 5 mm átmérőjű szűrőpapírkorongra 2  $\text{mm}^3$  vizeskivonatot veszünk fel. A korongot nedvesen helyezzük a frissen oltott tápagarra, majd 28  $^{\circ}\text{C}$ -on inkubálunk és 24 óra múlva olvassuk le a gátlási zónákat.

A mindenkori meghatározás előtt ajánlatos saját kalibrációs görbe felvétele, tekintettel arra, hogy a kapszicidin nem egységes vegyület, hanem több szteroidszaponinból álló keverék és így összetétele nem feltétlenül állandó, különböző tényezők (éghajlati, talajviszonyok stb.) befolyásolhatják.

- [1] *Gál I.*: Élesztőellenes hatóanyag (capsicidin) kivonása a fűszerpaprikából. Előadás a IV. Élelmiszeripari Tudományos Ülésszakon Bpest, 1963. V. 30.  
 [2] *Gál I.*: Z. U. L. 724, 333 (1964)  
 [3] *Gál I. E.*: *Experientia* 21, 383 (1965)  
 [4] *Gál I.*: Néhány hazai növény fitoncidjainak vizsgálata különös tekintettel élelmiszeripari felhasználásukra. Kandidátusi értekezés. Budapest, 1965.  
 [5] *Gál I. E.*: Z. U. L. 132, 82, (1966)  
 [6] *Gál I. E.*: *ÉVIKE*. 12, 229 (1966)  
 [7] *Paech, K.* und *M. V. Tracey*: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* Bd. III. Springer Verlag, Berlin – Göttingen – Heidelberg 1955 (68. oldal).  
 [8] *Kofler, L.*: *Die Saponine*. Springer Verlag Wien, 1927.  
 [9] *Gál I. E.*: *Pharmazie*, 22, 120 (1967).  
 [10] *Bauer, H.* und *H. Moll*: *Die organische Analyse* 4. Aufl. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1960 (501. oldal).  
 [11] *Köhler, H.*: *Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung*. Akademie-Verlag, Berlin, 1956.  
 [12] *Kawasaki, T.* and *K. Miyahara*: *Chem. pharmac. Bull.* (Tokyo) 11/12, 1546 (1963)

## ОБНАРУЖЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО КАПСИЦИДИНА В ПЕРЦЕ МЕТОДОМ АГАРНОЙ ДИФФУЗИИ

*И. Э. Гал,*

Автор разработала методы обнаружения стероидсапониновой смеси капсицидина в некоторых частях (семена, корень) растения стручкового перца, (*Capsicum annuum* L.) при помощи метода агарной диффузии, на основании антибиотического влияния вещества на дрожжи. Тестовой штамм: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub>.

Метод агарной диффузии является гораздо простым, чем метод использованный в настоящее время наиболее часто гемолизная проба. Так как автор показал параллельность между гемолизирующими и ингибирующими дрожжами антибиотическими действиями в случае капсицидина, поэтому последнее является пригодным для замещения первого.

Для обнаружения капсицидина в стручковом перце путем агарной диффузии разработали два метода:

— Один из них основывается на инактивации холестерина и на реактивации скисолом, то есть метод является агарно — диффузионным вариантом традиционного опыта гемолиза стероидных сапанинов.

— Другой метод использует специфический стабилизационный процесс агента, то есть использует изменение чувствительности агента под влиянием некоторых наружных воздействий (напр. термической обработки) в зависимости от времени выдержки холодных водянистых экстрактов. Этот последний является специфическим опытом инактивации применения термической обработки.

Для полуколичественного обнаружения капсицидина автор адаптировала широко распространенный метод агарной диффузии, употребляемой для оценки количества антибиотиков растительного происхождения. Калибрационная кривая была построена на основании ингибирующего действия, оказанного на дрожжи (тестовой штамми: *S cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub>).

## NACHWEIS UND BESTIMMUNG VON BIOLOGISCH AKTIVEM SAPSICIDIN IN PAPRIKA MIT DER AGARDIFFUSIONSMETHODE

*I. E. Gál*

Verfasserin arbeitete zwei Agardiffusionsverfahren zum Nachweis des Capsicidins, eines in einzelnen Teilen (Samen, Wurzel) der Paprikapflanze enthaltenen Steroidsaponin-Gemisches aus, auf Grund seiner die Hefen hemmenden

antibiotischen Aktivität. Teststamm: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub>.

Die Agardiffusionsmethode ist viel einfacher, als die zurzeit zum Nachweis von Saponinen zumeist angewendete Hämolyseprobe und da die Verfasserin zwischen der Hämolysefähigkeit und der hefehemmenden antibiotischen Aktivität des Capsicidins eine gewisse Parallelität feststellte, auch an Stelle der Hämolyseprobe anwendbar.

Von den zwei auf der Agardiffusion beruhenden Nachweisverfahren des im Paprika enthaltenen Capsicidins:

- ist die eine lediglich eine Variante der traditionellen Hämolyseprobe, als Agardiffusionsprobe durchgeführt und beruht auf der Inaktivierung mit Cholesterin und der Reaktivierung durch Xylol.
- Die andere ist eine spezifische Inaktivierungsprobe durch Hitze, sie beruht auf dem eigentümlichen Stabilisationsprozess des Wirkstoffes das heisst auf der Änderung seiner Empfindlichkeit gegen gewisse

äussere Einflüsse (z. B. bei Hitzebehandlung), als Funktion der Stehzeit seiner kaltwässerigen Extrakte.

Zur halbquantitativen *Bestimmung* des Capsicidins wurde die – für eine derartige Prüfung der pflanzlichen Antibiotika weitverbreitete – Agardiffusionsmethode adaptiert und die Kalibrationskurve auf Grund der hefehemmenden Aktivität (Teststamm ebenfalls *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* T<sub>22</sub>) aufgenommen.

## DÉCÈLEMENT ET DOSAGE DE LA CAPSICIDINE BIOLOGIQUEMENT ACTIVE DANS LA PAPRIKA PAR UNE MÉTHODE DE DIFFUSION DANS DE LA GÉLOSE

I. E. Gál

L'auteur a élaboré des méthodes pour le décèlement de la capsicidine, mélange de saponines stéroïdes, qui se trouve dans certaines parties (graines, racines) de la plante paprika (*Capsicum annuum* L.). Les méthodes sont basées sur l'effet antibiotique du composé actif envers les levures, séparé par diffusion dans de la gélose. Race-test: *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T 22.

La méthode à diffusion dans de la gélose est beaucoup plus simple que le test à hémolyse d'emploi courant, et comme l'auteur a observé que dans le cas de la capsicidine il y a parallélisme entre les effets hémolytique et antibiotique envers la levure elle peut être substituée à la première.

Il a élaboré pour le *décèlement* de la capsicidine dans la paprike par diffusion dans de la gélose deux méthodes. L'une est basée sur l'inactivation par la cholestérine et la réactivation par le xylol, ce qui est une variation à diffusion dans de la gélose du test à hémolyse des saponines stéroïdes.

L'autre utilise un procédé de stabilisation spécifique du corps actif, c'est-à-dire la variation de sa sensibilité sous l'effet de certaines influences extérieures (p. ex. la chaleur) en fonction du temps de la stabilité des extraits à l'eau froide. C'est un test d'inactivation calorique spécifique.

Pour le *dosage sémi-quantitatif* de la capsicidine l'auteur a adopté la méthode à diffusion dans de la gélose répandue pour l'estimation des antibiotiques végétales. Il a construit la courbe de calibration en partant de l'effet d'inhibition exercé sur une levure (race *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T 22.).