

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Természetes és félszintetikus karotinoidok folyadékkromatográfiás minőségi analízise

Turcsi Erika

Témavezető és programvezető: Dr. Deli József

Intézetigazgató: Dr. Sümegei Balázs



**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

2016

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Sümegei Balázs egyetemi tanárnak, hogy munkámat a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben lehetővé tette.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Deli József egyetemi tanárnak, hogy munkámat állandó figyelemmel kísérte és mindenben segítette.

Köszönöm Dr. Nagy Veronika egyetemi adjunktusnak a munkámhoz nyújtott szakmai segítségét.

Köszönetet mondok Dr. Kurtán Tibor egyetemi docensnek a CD mérésekért, Dr. Avar Péternek a tömegspektrométerrel végzett mérésekért, illetve Gulyás Gergely egyetemi tanársegédnek az NMR-spektrumok felvételéért.

Köszönöm Götz Norbert, Götz Zsuzsanna, Lukács Roland és Rigó Judit vegyésztechnikusoknak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségét.

I. Bevezetés

A karotinoidok nem csupán esztétikai jelentőséggel bírnak, de antioxidáns hatásúak is, emiatt bizonyos betegségek megelőzésében is komoly szerepük van.

Az általunk elfogyasztott ételek és étel alapanyagok szinte mindegyike tartalmaz valamilyen karotinoidot, ezek közül a β -karotin a legfontosabb, mint A-vitamin prekursor. A retinában a lutein és a zeaxantin dúsulnak, és szerepük van az időskori makula degeneráció megelőzésében is. A többi karotinoid molekula általános antioxidáns hatással bír. Felszívódásuk a zsírokkal együtt történik, a lipoproteinekkel szállítódnak, a zsírszövetben és a májban raktározódnak. Az étrendben legnagyobb mennyiségben jelen lévő karotinoidok a β -karotin, α -karotin, likopin, β -kriptoxantin, lutein és a zeaxantin. Az élelmiszer előkészítési technológiák során ezek, a szerkezetükből fakadóan igen érzékeny vegyületek, szerkezeti változásokon eshetnek át (oxidáció, izomerizáció, bomlás). A modern analitikai módszerekkel ezek a változások követhetők.

A Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében nagy múltra tekint vissza a növényi részek karotinoid-analízise, valamint a komponensek kromatográfias elválasztása. Már az 1920-as évek végén intézetünk alapítója, Zechmeister László és csoportja oszlopkromatográfias módszert dolgozott ki a növényi extraktumok analízisére. A tudomány és technológia fejlődésével ma modern analitikai berendezések állnak rendelkezésünkre: több HPLC-készülékünk van, melyek diódasoros detektoron kívül tömegspektrométer detektorral összekapcsolva is képesek működni. 2006-ban, mikor az intézetben elkezdtem dolgozni, a növényi karotinoid-profilok HPLC-vizsgálatába kapcsolódtam be.

Mivel a karotinoidok analízise fontos mind a táplálkozástudomány, mind az egészségügy terén, *PhD.* munkámban célként tűztem ki, hogy elmélyedve a természetes karotinoidok minőségi analízisében, megtaláljam az adott feladatra leginkább alkalmas analitikai eljárást, és összehasonlítsam a karotinoidok analízisében használatos módszereket.

II. Célkitűzések

- A karotinoidok HPLC analitikájában használatos C_{18} -as és C_{30} -as állófázisokon végzett elválasztások összehasonlítása, részletesen kitérve a különböző fázisok hatékonyságára az eltérő szerkezetek esetén (szénhidrogének, poláros csoportot tartalmazók, κ végcsoportot

tartalmazók, ϵ és β végcsoportot tartalmazók, sztereoizomerek, epoxi-karotinoidok, geometriai izomerek analízise).

- A természetben előforduló karotinoidok minőségi analizisére leginkább alkalmas eljárás megtalálása, a növényi extraktumokban megtalálható nagyszámú és igen eltérő szerkezetű karotinoid molekulák esetén nemcsak a fő komponensek, de a minor vegyületek azonosítása is.

- Karotinoid 5,6-epoxidok konfigurációs izomerjeinek elválasztása, illetve a pontos konfiguráció meghatározása királis állófázist alkalmazva. A hidroxil csoport nélküli epoxid végcsoportot tartalmazó vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása.

III. Kísérleti rész

Reagensok és standardok

Folyadékkromatográfiás oldószereként (metanol, víz, aceton, *tert*-butil-metil-éter) a Scharlab Kft.-től vásárolt HPLC minőségű vegyszereket használtunk. A karotinoid minták egy része izolált vagy félszintetikus forrásból állt rendelkezésre. Az un. ritka karotinoidok izolálását kutatócsoportunk végezte korábban, szerkezetazonosításuk minden esetben MS, NMR és CD spektrumuk alapján történt. Az izolálást és szintetikus módosításokat kutatócsoportunk végezte standard módszerek szerint. Néhány speciális anyagot támogatóunktól, a CaroteNature GmbH-től kaptunk.

Félszintetikus karotinoidok előállítása

A félszintetikus karotinoid 5,6-epoxidokat a megfelelő vegyület 5,6-os helyzetű kettős kötésének perftálsavval való epoxidálásával állítottuk elő. Karotinoid 5,8-epoxidokat a megfelelő 5,6-epoxidok sósavas kezelésével állítottuk elő. Az oxokarotinoidok nátrium-bórhidrides redukciójával készültek a hidroxiszármazékokból. A karotinoidok (*Z*)-izomerjeit jódkatalizált fotoizomerizációval állítottuk elő az *össz-transz* vegyületekből. A származékképzéssel előállított karotinoidokat ha szükséges volt, klasszikus oszlopkromatográfiás módszerrel CaCO_3 oszlopon kromatografáltuk.

Mamey extrakció

A panamai piacról (Panama City, Panama) származó piros mamey gyümölcs húsát standard módszerek szerint extraháltuk.

Készülékek

Az UV/Vis spektrumokat Jasco-530 spektrofotométerrel vettük fel benzolban.

A ^1H NMR (400 MHz) és ^{13}C NMR (100 MHz) spektrumok Varian UNITY INOVA 400-WB spektrométerrel és Bruker DRX Avance II (500/125 MHz $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -re) spektrométerrel készültek.

Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (C₁₈, C₃₀)

A HPLC analízisek Dionex P680 típusú kvaterner analitikai pumpa, Dionex PDA 100 UV/Vis detektor (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA), Dionex oszloptermosztát és Chromeleon 6.8 szoftver használatával készültek. A pontos HPLC rendszer leírása a táblázatban található.

HPLC körülmények

I. Módszer	250 x 4.6 mm oszlop, LiChrospher 100 RP 18e (Merck KGaA) 5 μm endcapped	áramlás: 1.25 ml/perc eluensek: A: H ₂ O/MeOH = 12/88 v/v% B: MeOH C: Aceton/MeOH = 50/50 v/v% 22 °C $\lambda=450$ nm	0-2 perc: 100 % A, 2-10 perc: 80% A/20% B-re, 10-18 perc: 50 % A/50% B-re, 18-25 perc: 100 % B-re, 25-27 perc: 100 % B-re, 27-33 perc: 100 % C-re, 33-38 perc: 100 % C, 38-40 perc: 100 % B-re (lineáris lépésekben)
	II. Módszer	250 x 4.6 mm oszlop, YMC C ₃₀ (YMC Europe GmbH) 3 μm endcapped	áramlás: 1.00 ml/perc eluensek: A: MeOH/TBME/H ₂ O = 81/15/4 v/v% B: MeOH/TBME/H ₂ O = 6/90/4 v/v% 22 °C $\lambda=450$ nm

HPLC-MS analízis

A HPLC-MS mérések Dionex P580 NDG pumpával, 250 × 4.6 mm belső átmérőjű YMC C30, 3 μm szemcseméretű oszlopon történtek. A spektrumokat egy Finnigan AQA single quadrupole tömegspektrométer segítségével rögzítettük. A mérések APCI ionforrással, pozitív módban történtek, splitting alkalmazása nélkül. A következő beállításokat alkalmaztuk: korona feszültség 4 kV, hőmérséklet 400 °C, full scan mód, adatgyűjtés 0.2 scans/s.

Királis HPLC-DAD analízis

Az analíziseket Dionex rendszeren (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA), P680 gradiens pumpán és PDA-100 detektoron, Chromeleon 6.70 szoftver segítségével végeztük, Dionex oszloptermostát alkalmazásával.

A királis elválasztáshoz 250 x 4,6 mm belső átmérőjű, 3 μ m szemcseméretű, Chiralcel OD (Daicel, Chemical Industries, Ltd.) oszlopot használtunk.

Eluens-1: (A) MeOH/EtOH (1:1); (B) MeCN/EtOH (1:1). Lineáris gradienst alkalmaztunk 100% A eluensről 100% B-re 30 perc alatt, 1 ml/perc áramlással, 28 °C-on.

Eluens-2: *n*-hexán/EtOH (1:1) izokratikus elúcióval 0,5 ml/perc áramlással, 28 °C-on.

HPLC-CD analízis

Az analízist Jasco HPLC rendszeren végezték, a HPLC-UV és -OR kromatogramokat Jasco MID-910 UV és OR-2090Plus királis detektorral határozták meg. A HPLC-ECD görbék felvétele specifikus hullámhosszon Jasco J-810 CD spektropolariméterrel történt.

IV. Eredmények

4.1. C₁₈ és C₃₀-as állófázisok összehasonlítása

Vizsgálatainkhoz a C₁₈-as állófázis esetén az intézetünkben korábban kidolgozott, és a paprika karotinoidok vizsgálatánál jól bevált rendszert alkalmaztuk (I. Módszer).

A karotinoidok elúciós sorrendje C₁₈ oszlopon követi a polaritási sorrendet: a karotinkok, keto- és epoxikarotinoidok jóval erősebben adszorbeálódnak, mint a hidroxil-vegyületek. Ezen relatív polaritási sorrendet metanol-petroléter rendszerben való megoszlás alapján határozták meg.

A C₃₀-as állófázisra alkalmazott módszer (II. Módszer) az irodalomban fellelhető módszerek továbbfejlesztett változata. Az eluens polaritása itt is mérséklődik a gradiens program során, de az analit molekulák elúciós sorrendje ezen az állófázison nem minden esetben követi a polaritási sorrendet.

Apró különbségek a molekulaszervezetben szignifikáns különbségeket eredményeznek a retencióban mindkét állófázist tekintve.

4.1.1. Szénhidrogének elválasztása

Míg a szénhidrogének alapvonal elválasztása C₁₈-on nem megoldható, a retenciós idő különbségek C₃₀-on perces nagyságrendűek.

Az apoláros molekulák esetén a harminc szénatomos alkilánccal módosított szilika alapú fázis és a karotinok közötti intenzív kölcsönhatás igazoltnak látszik. Nagyon kis eltérés a ciklohexén gyűrű szerkezetében, mint például a kettős kötés helyzete, komoly változást okoz a retencióban: az ϵ végcsoportot tartalmazó karotinoidok hamarabb eluálódnak, mint a β végcsoportúak. A nyílt láncú molekulák, nyújtott konformációban nagyobb felületen képesek az állófázissal kölcsönhatásba lépni. A konjugált poliénlánc hossza szintén korrelál a retenciós paraméterekkel: több konjugált kettős kötés nagyobb retenciót eredményez C₃₀-as oszlopon. A konjugált π kötések nagy elektronsűrűséget eredményeznek, mely erősebb másodlagos kölcsönhatásokat eredményez az állófázis szénláncjaival.

4.1.2. Poláros karotinoidok elválasztása

A retenciós időbeli különbség az oxo- és hidroxikarotinoidoknál C₁₈-on kicsi, míg az eltérések C₃₀-on szignifikánsak. Azon molekuláknál, melyek kizárólag hidroxilcsoportot tartalmaznak, a retenciós idő a hidroxilcsoportok számának növekedésével csökken mindkét állófázison. **Az epoxicsoporttal rendelkező karotinoidoknál viszont C₃₀-on az elúciós sorrend nem követi a polaritást.** Az epoxidok, és különösen a diepoxidok C₃₀-as fázison kevesebb időt töltenek az oszlopon, mint az a polaritásuk alapján várható lenne. Feltehetően a poláros és nagy térkitöltésű epoxidgyűrű korlátozza a molekula diffúzióját az állófázis apoláros 30 szénatomos láncjai között, azaz ezek a molekulák részlegesen kiszorulnak az állófázisról. A kisebb felületen létrejövő másodlagos kölcsönhatások miatt pedig hamarabb eluálódnak, mint az egy epoxidcsoportot tartalmazó, vagy nem epoxid molekulák. Az oxokarotinoidok később eluálódnak mindkét fázison, mint a hidroxivegyületek. Megállapítható, hogy a hidrogénkötés akceptor oxocsoportot tartalmazó karotinoidok több időt töltenek az állófázison, mint a hidrogén kötésben akceptorként és donorként is részt vevő hidroxilcsoportot tartalmazók.

4.1.3. κ -karotinoidok elválasztása

A κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok öttagú gyűrűt tartalmaznak, melyen hidroxil- vagy oxocsoport lehet. C₁₈-as fázison, a poláros (oxo- és hidroxil-) csoportok számának

növekedése a retenciós idő csökkenését eredményezi κ -karotinoidok esetében is. C₃₀-on az epoxi- κ karotinoidok megint csak rövidebb időt töltenek az állófázison, mint az polaritásuk alapján várható. **Mindkét állófázis meglehetősen jó elválasztást ad a κ -karotinoidokra, azonban a C₁₈ alkalmasabbnak tűnik olyan komplex természetes extraktumok esetén, ahol kapszorubin (75) és kriptokapszin-5,6-epoxid (69) is megtalálható egymás mellett.**

4.1.4. ϵ és β végcsoportot tartalmazó karotinoidok elválasztása

Az ϵ és β végcsoportot tartalmazó molekulák a gyűrűs végcsoportban szereplő kettős kötés helyzetében térnek el egymástól. Az α - és β -karotin (**2**, **1**) vagy az α - és β -kriptoxantin (**11**, **10**) nem választhatók el alapvonalig C₁₈-as oszlopon, de C₃₀-on kiválóan elválnak. A sárgafolt pigmentek, a lutein (**14**) és a zeaxantin (**16**) teljesen együtt eluálódnak a tizennyolc szénatomos állófázison, de C₃₀-on elválnak, és a lutein (**14**) a zeaxantin (**16**) előtt eluálódik. **Ahogy azt már korábban említettük, karotinok ϵ végcsoporttal kisebb retenciós időt adnak, mint a β végcsoportúak C₃₀-on. Mind apoláros, mind poláros karotinoidoknál látható, hogy a konjugált poliénlánc hossza befolyással bír a retenciós tulajdonságokra C₃₀-as oszlopon: több konjugált π -elektron hosszabb retenciós időt eredményez.**

4.1.5. Sztereoizomerek elválasztása

Annak ellenére, hogy sem a C₁₈, sem a C₃₀-as állófázisok nem királisak, számos sztereoizomer elválasztása lehetséges használatukkal. **A ciklohexángyűrűkön lévő hidroxilcsoportok térállása jelentősen befolyásolja a C₁₈-as oszlopon való retenciót, míg C₃₀-on nincs ilyen hatása.**

Nyers növényi alapanyagok feldolgozása során a luteinben (**14**) a 3' helyzetű hidroxilcsoport epimerizálódhat és 3'-epilutein (**15**) képződhet. Ezek a diasztereomerek mind C₁₈, mind C₃₀-as oszlopokon jól elválaszthatók, habár elúciós sorrendjük fordított a kétféle állófázison. A 3,5,6-trihidroxi- β végcsoport elméletileg négyféle sztereoizomerrel rendelkezik, ezekből három fordul elő a természetben is. A végcsoport abszolút konfigurációja információt ad a képződés módjáról. Ezen izomerek elválasztása lényeges bioszintézisük megismerése szempontjából. A karpoxantin három természetes izomere (karpoxantin (**19**), 6-epikarpoxantin (**20**) és 5,6-diepikarpoxantin (**21**)) nem válik el C₃₀-as fázison, de C₁₈-on igen. A 4-hidroxi-karotinoid sztereoizomerek (pl. 4-hidroxi- β -karotin (**12**), 4,4'-dihidroxi- β -karotin (**17**)), melyek a hat szénatomos végcsoport oxocsoportjának redukciójával képződnek, nem választhatók el sem C₁₈, sem C₃₀-as állófázison, csak királis oszlopon lehetséges az analízisük. A 6-oxo- κ -

karotinoidok redukált hidroxiszármazékai csupán a hidroxilcsoport térállásában különböznek egymástól, mégis elválaszthatók mindkét állófázison. C₁₈-on 2 perces retenciós idő különbséggel eluálódnak, viszont C₃₀-on ez az idő csak 0,8 perc. Hasonló retenciós tulajdonságok figyelhetők meg más redukált κ -karotinoidoknál is.

4.1.6. Epoxikarotinoidok elválasztása

A karotinoid 5,6-epoxidok 5,8-epoxidokkal (furanoidok) együtt fordulnak elő különféle növények szíromlevelében és pollenjében, illetve gyümölcsökben és zöld levelekben is. Némelyek az abszcizinsav növényi hormon bioprekursorai, mások részt vesznek a xantofill ciklusban, melynek védő szerepe van a túlzott fénybesugárzás káros hatásaival szemben.

A természetben az epoxidgyűrű térállása *anti* a ciklohexil végcsoport hidroxilcsoportjának térállásához képest. Laboratóriumi körülmények között az epoxidálás perkarbonsavakkal *anti* és *szün* epoxidokat eredményez, melyek C₁₈-as állófázison elválaszthatók. **A *szün* izomerek retenciós ideje kisebb, mint az *anti* vegyületeké.**

A furanoidképződés növényi savak által *in vivo* katalizált, vagy enzimatis folyamat, de a növényi nyersanyagok feldolgozása során szintén nő a furanoidok mennyisége, hiszen a sejtek károsodnak és savtartalmuk felszabadul. **A legalább két hidroxilcsoportot tartalmazó 5,8-epoxidok kiválóan elválnak az 5,6-epoxidoktól C₁₈-as szilikán. Viszont az egy hidroxilcsoportot, vagy hidroxilcsoportot nem tartalmazó epoxidok nem választhatók el C₁₈-as állófázison. A C₃₀-as oszlop viszont jó elválást biztosít ezen kevéssé poláros regioizomerekre.** A C₃₀-as állófázison a kettős kötések kiterjedt konjugációja általában nagyobb retenciót okoz. Ahogy azt korábban említettük, az 5,6-epoxidok esetében az epoxidgyűrű térigénye és poláros karaktere gátolhatja a molekula diffúzióját az apoláros harminc szénatomos láncok között, és kisebb retenciót eredményez, mint ami a polaritás alapján várható volna. Itt úgy tűnik, az epoxid csoport jelentősebb befolyással bír a retencióra, mint a konjugált poliénrendszer hossza: noha az 5,8-epoxidok kevesebb konjugált kettős kötést tartalmaznak, mint az 5,6-epoxidok, a furanoidok később eluálódnak mint regioizomereik. **Az 5,8-epoxid sztereoizomerek elválasztása csak C₁₈-on valósítható meg, abban az esetben, ha mindkét hattagú gyűrű rendelkezik hidroxilcsoporttal.** Azon furanoid molekulák sztereoizomerjei, ahol egy hidroxilcsoport van a hatos gyűrűn, vagy hidroxilcsoport nélküliek, nem választhatók el ezeken az oszlopokon. Ezen anyagok elválasztása csak királis állófázison valósítható meg. A nagyon hasonló tulajdonságok ellenére az 5,6- és 3,6-epoxidok C₁₈-as oszlopon jó elválást mutatnak, C₃₀-on viszont nem válnak szét.

4.1.7. Geometriai izomerek (Z/E) elválasztása

Az élelmiszer előkészítő technológiák, különösképpen a melegítési eljárások a karotinoidok kettős kötéseinek *cisz-transz* (Z/E) izomerizációjához vezethetnek. Élelmiszer minták esetén a *cisz-transz* izomerek arányának követése a technológia során fontos lehet.

Geometriai izomerek esetén a felbontás C₁₈-as oszlopon limitált, főként apoláros karotinoknál, kizárólag poláros izomerek választhatók el, az elúció a $transz < 9Z < 13Z < 15Z$ sorrendet követi. Poláros karotinoidok esetében a *transz* izomer jól elválik a *cisz*-ektől, azonban a *cisz* komponensek elválása egymástól rosszabb. **A C₃₀-as állófázis ideálisnak látszik kevésbé poláros karotinoidok (szénhidrogének, monohidroxi-vegyületek) és *cisz-transz* izomerjeik elválasztására. A geometriai izomerek elúciós sorrendje $15Z < 13Z < össz-transz < 9Z$ ezen a szilikagélen.** C₃₀-as állófázison a karotinoid molekula hossza befolyásolni látszik a retenciós időt: a 15Z és 13Z izomerek V-alakúak, rövidebbek és „gömböszzerűbbek”, mint az *össz-transz* vagy a 9Z izomerek.

4.2. Alkalmazások

Kutatócsoportunk a legkülönbözőbb természetes forrásokból izolálja és analizálja a karotinoidokat. A dolgozatban néhány példán keresztül kerül bemutatásra a fent tárgyalt kétféle állófázis. A módszerek felhasználását néhány növény analízisén keresztül demonstráljuk.

A Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognózia Intézetével együttműködve vizsgáltuk két gyógynövény, a kanadai aranyvessző (*Solidago canadensis* L.) virágzatának és a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) virágának karotinoid összetételét. Az analízist C₁₈-as állófázison végezve a kanadai aranyvessző virágában fő komponensekként (9Z,9'Z)-luteint, azaz a neolutein C-t és (9Z)- vagy (9'Z)-luteint azonosítottunk. A teljes extraktum megoszlata után a hexános epifázisban csak β-karotin (**1**) maradt mint apoláros karotin. A metanolos hipofázisban viszont a *cisz*-vegyületeken kívül lutein 5,6- (**43**) és 5,8-epoxidot (**44/45**) találtunk. A hipofázis CaCO₃-on való oszlopkromatográfiájával a kis mennyiségben jelenlévő komponenseket (neoxantin (**56**), neokrómok (**104**, **105**), violaxantin (**47**), luteoxantin (**50**, **51**), (9Z)-anteraxantin, zeaxantin (**16**)) is sikerült azonosítani. A vérehulló fecskefű fő karotinoidja a lutein 5,6-epoxid (**43**), ezenkívül lutein 5,8-epoxidot (**44/45**), violaxantint (**47**) és a lutein-5,6-epoxid (**37**) *cisz* izomerjeit tartalmazza. Apoláros karotin gyakorlatilag nem található az extraktumban.

Magyarországon nagy hagyománya van a sütőtök fogyasztásának, illetve számos bébiétel tartalmaz sütőtököt. Munkánk során a hazánkban termesztett, illetve forgalmazott különböző

fajtájú (Nagydobosi (*Cucurbita maxima*); takarmány tök (Halloween) (*Cucurbita pepo*); az orange, vagy kanadai tök (*Cucurbita moschata*) és a japán Hokkaido tök (*Cucurbita maxima* Duchesne ssp.)) nyers- és főtt sütőtökök karotinoid összetételének vizsgálatát végeztük el, C₁₈- és C₃₀-as állófázison. Vizsgálatainkból kiderült, hogy az egyre közkedveltebb orange tök minimális mennyiségű α -kriptoxantinon (**11**) kívül csak α - (**2**) és β -karotint (**1**) tartalmaz. A másik három fajta nagyobb mennyiségű luteint (**14**), és egyéb poláros komponenseket, pl. kukurbitaxantint (**46**) is tartalmaznak. Kimutattuk azt is, hogy a hőkezelési eljárások (sütés, főzés) hatásait az izomer képződés miatt jobb a C₃₀-as fázison tanulmányozni, különösen az orange tök esetében.

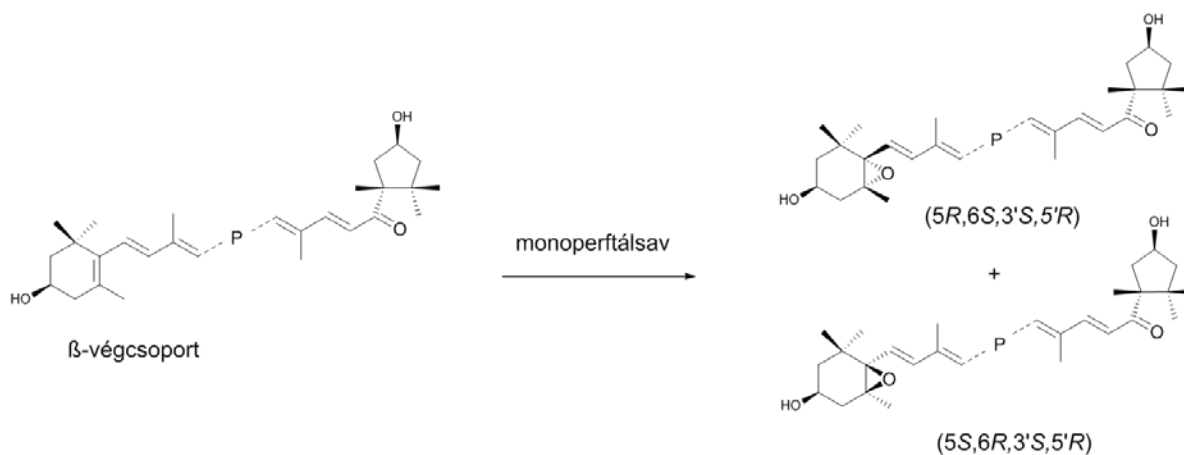
A κ -végcsoportot tartalmazó karotinodok (kapszantin (**71**), kapszorubin (**75**) stb.) legismertebb forrása a piros paprika, melyet intézetünkben mintegy 90 éve vizsgálnak. Rendkívül sokféle piros paprika karotinoid összetételét vizsgáltuk és hasonlítottuk össze az analízist C₁₈ és C₃₀-as állófázisokon. Összefoglalóan a paprika extraktumban található sok poláros komponens C₃₀-as oszlopon összetorlódik, míg a C₁₈-as rendszeren jobb felbontással válnak el.

Épp fordított a helyzet egy dél-amerikai gyümölcs a piros mamey (*Pouteria sapota*) esetén, amely egy rendkívül gazdag κ -karotin forrás. C₁₈-as állófázis használata esetén úgy tűnik a gyümölcs karotinoid összetétele nem túl komplex, míg a C₃₀-as oszlopon végzett analízis egy rendkívül bonyolult képet mutat. Bár sok komponens azonosítható a teljes extraktum analízisével (29), számos kisebb csúcs, melyek zöme kevert csúcs volt azonosíthatatlan maradt. Ezek azonosítására a teljes extraktumot klasszikus oszlopkromatográfiával CaCO₃ adszorbensen 7 frakcióra bontottuk, melyek HPLC-DAD-MS analízisét szintén elvégeztük C₃₀-as állófázison. CaCO₃ adszorbensen a karotinoidok máshogy kötődnek, mint a szilikagélen, így az egymást elfedő komponensek is elválaszthatók és azonosíthatók.

4.3. A nem hidroxilált végcsoportot tartalmazó karotinoid epoxidok analízise

A különféle növényi forrásokból izolált karotinoid epoxidok királis oszlopon való elválasztását és szerkezetazonosítását is elvégeztük. Ha az epoxid vegyületben a hidroxilcsoport az epoxid csoporttal azonos gyűrűn helyezkedik el, a két sztereoiszomer (*szün* és *anti*) C₁₈-as oszlopon elválik egymástól. A hidroxilcsoportot nem tartalmazó diasztereomer párok azonban csak királis HPLC oszlopon választhatók el.

Az azonosítás megkönnyítésére a megfelelő karotinoid monoperftálsavval történő epoxidálásával előállítottuk a félszintetikus vegyületet. Az epoxidálás során egy diasztereomer vegyületpár keletkezik, a reakciót a kapszantin példáján mutatom be:



A reakcióegyenletből látható, hogy az epoxidálás során a hat szénatomos gyűrűn elhelyezkedő epoxid-csoport térállása és az ötszénatomos, κ -végcsoporton levő hidroxil-csoport térállása szerint két diasztereomer keletkezik. Ha az epoxid és hidroxil-csoport térállása megegyezik *szün* ($5S,6R,3'S,5'R$), ellenkező esetben *anti* ($5R,6S,3'S,5'R$) vegyületről beszélünk.

A kriptokapszin-5,6-epoxidok (**69**, **119**), a kriptokapszin-5,8-epoxidok (**120-123**), a β -kriptoxantin-5',6'-epoxidok (**33**, **127**), a β -kriptoxantin 5,6,5',6'-diepoxidok (**36**, **124-126**), valamint a β -karotin 5,6-epoxidok (**128**, **129**) és a szapotexantin-5,6-epoxidok (**130**, **131**) az epoxid csoportot tartalmazó β gyűrűn nem tartalmaznak hidroxilcsoportot. Ezen vegyületeket a reakcióelegyekből izoláltuk, királis töltetű rendszeren elválasztottuk és szerkezetüket azonosítottuk.

V. Összefoglalás

Munkám során 100 különböző karotinoid kromatográfiás viselkedését tanulmányoztam C₁₈-as és C₃₀-as állófázison, két, a gyakorlatban használt eluens rendszert alkalmazva.

Az oktadecil borítású szilika állófázisok jó elválást mutatnak a karotinoidok egész polaritási tartományára. Az elúciós sorrend ezen az oszlopon követi a karotinoidok polaritási sorrendjét. A C₁₈-as állófázis lehetővé teszi az elválasztást a nagyon poláros karotinoidoktól az apoláros karotinokig. Az oszlop jobb elválasztást ad hidroxil- és ketokarotinoidokra, mint a karotinokra, és nem hatékony a karotinoid regioizomerek elválasztásában sem (pl. a zeaxantin **(16)** és lutein **(14)** párosok, vagy az anteraxantin **(37)** és lutein-5,6-epoxid **(43)** párok). A felbontás geometriai izomerekre (*Z/E*) szintén korlátozott. Poláros karotinoidok esetében a 9*Z*- és 13*Z*-izomerek még elválnak (aszimmetrikus vegyületek esetén a 9/9' illetve 13/13' párok már nem), apoláros vegyületek, különösen karotinok esetén már a *transz* vegyülettől sem különülnek el. Ezzel szemben jó módszert biztosít a poláros karotinoidok sztereoizomerjeinek (karboxantin epimerek **(19-21)**, kapszantol epimerek **(78-79)**, *szün* és *anti* epoxid párok, stb.) elválasztására. Összességében a C₁₈ fordított fázissal végzett folyadékkromatográfia tehát kiválóan alkalmas karotinoidok feltételes, retenciós időn alapuló azonosítására komplex rendszerekben.

Természetes extraktumok analízisében jól alkalmazható a C₃₀-as állófázis is. Ez az oszlop ideálisnak tűnik apoláros karotinoidok (szénhidrogének és monohidroxi-karotinoidok) és ezek *cisz-transz* izomerjeinek elválasztására. A C₃₀-as állófázis nagyon jó elválást ad azokra a molekulákra, amelyek szerkezetében igen kis eltérés mutatkozik (egy kettőskötés helyzete, geometriai izoméria). Mindezek ellenére a poláros karotinoidok sztereoizomerjei rossz felbontással eluálódnak rajta. A hidroxil- és epoxicsoportok hatása az elúciós sorrendre nem egyértelmű, így a vegyületek retenciós idejéből nehezebben következtethetünk a szerkezetre egy komplex keverék esetében.

A két kromatográfiás rendszert különböző természetes forrásból izolált extraktumok analízisében keresztül mutattam be, bizonyítva a C₃₀-as fázis apoláris, illetve a C₁₈-as fázis inkább poláris karotinoidokra való alkalmazhatóságát.

Bár mindkét állófázis alkalmas a hidroxilált 5,6-epoxi-végcsoportot tartalmazó karotinoidok *szün* és *anti* sztereoizomerjeinek megkülönböztetésére, a hidroxil-csoportot nem tartalmazó epoxidokat egyik sem képes elválasztani. Ennek a problémának a megoldására királis állófázisokat alkalmaztunk. A mamey gyümölcsben előforduló ilyen típusú karotinoidok

azonosításának elősegítésére számos szemisztetikus diasztereomer párt (kriptokapszin-5,6-epoxid, β -karotin-5,6-epoxid, β -kriptoxantin-5',6'-epoxid, β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxidok) állítottunk elő, és az általam kidolgozott elválasztási módszert HPLC-CD technikára alkalmazva, meghatároztuk a komponensek szerkezetét.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Horváth, G., Molnár, P., Farkas, Á., Szabó, L.G., **Turcsi, E.**, Deli J.: Separation and identification of carotenoids in flowers of *Chelidonium majus* L. and inflorescences of *Solidago canadensis* L.
Chromatographia 71, S103-S108 (2010) *if=1,075*
2. Gulyás-Fekete, G., Murillo, E., Kurtán, T., Papp, T., Illyés, T.Z., Drahos, L., Visy, J., Agócs, A., **Turcsi, E.**, Deli, J.: Cryptocapsinepoxide-type carotenoids from red mamey, *Pouteria sapota*
Journal of Natural Products 76 (4), 607-614 (2013) *if=3,947*
3. **Turcsi, E.**, Murillo, E., Kurtán, T., Szappanos, Á., Illyés, T.Z., Gulyás-Fekete, G., Agócs, A., Avar, P., Deli, J.: Isolation of β -cryptoxanthin-epoxides, precursors of cryptocapsin and 3'-deoxycapsanthin, from red mamey (*Pouteria sapota*)
Journal of Agricultural and Food Chemistry 63 (26), 6059-6065 (2015) *if=2,912*
4. **Turcsi, E.**, Nagy, V., Deli, J.: Study on the elution order of carotenoids on endcapped C₁₈ and C₃₀ reverse silica stationary phases. A review of the database
Journal of Food Composition and Analysis 47, 101-112 (2016) *if=1,985*

Egyéb, az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

Folyóiratban megjelent közlemények

1. Nagy, V., Agócs, A., **Turcsi, E.**, Molnár, P., Szabó, Z., Deli, J.: Latoxanthin a minor carotenoid isolated from yellow paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme flavum*)
Tetrahedron Letters 48, 9012-9014 (2007) *if=2,615*
2. Nagy, V., Agócs, A., **Turcsi, E.**, Deli, J.: Isolation and purification of carotenoid epoxides on modified silica gels
Phytochemical Analysis 20 (2), 143-148 (2009) *if=1,524*
3. Huang, F.C., Horváth, G., Molnár, P., **Turcsi, E.**, Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H., Schwab, W.: Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*
Phytochemistry 70 (4), 457-464 (2009) *if=2,322*
4. Nagy, V., Agócs, A., **Turcsi, E.**, Deli J.: Experiments on the synthesis of carotenoid glycosides
Tetrahedron Letters 51, 2020-2022 (2010) *if=2,538*
6. Somogyi, B., Felföldi, T., Solymosi, K., Makk, J., Homonnay, G. Z., Horváth, Gy., **Turcsi, E.**, Böddi, B., Márialigeti, K., Vörös, L.: *Chloroparva pannonica* gen. et sp nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) – a new picoplanktonic green alga from a turbid, shallow soda pan
Phycologia 50 (1), 1-10 (2011) *if= 1,218*

7. Brandi, F., Bar, E., Mourgues, F., Horváth, Gy., **Turcsi, E.**, Giuliano, G., Liverani, A., Tartarini, S., Lewinsohn, E., Rosati, C.: Regulation of carotenoid metabolism and volatile compound content in 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant during fruit ripening *BMC Plant Biology* 11, pp. 24 (2011) *if= 3,774*

8. Molnár, P., Horváth, Gy., **Turcsi, E.**, Deli, J., Kavase, M., Satoh, K., Tanaka, T., Tani, S., Sakagami, H., Gyémánt, N., Molnár, J.: Carotenoid composition and *in vitro* pharmacological activity of Rose hips *Acta Biochimica Polonica* 59 (1), 129-132 (2012) *if=1,234*

Folyóiratban megjelent absztrakt

1. Horváth G., **Turcsi E.**, Molnár P., Szabó L.G., Deli J.: Carotenoid content of the flower of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) *Planta Medica* 73, 911 (2007) *if=1,746*

2. Horváth G., **Turcsi E.**, Molnár P., Szabó L.G., Deli J.: Isolation and identification of Carotenoids in the fruit of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) *Planta Medica* 73, 912 (2007) *if=1,746*

3. **Turcsi, E.**, Horváth, G., Molnár, P., Szabó, L.G., Deli, J.: Carotenoid analysis of flowers and inflorescences of some medical plants *Carotenoid Science* 12 (June), 136 (2008)

4. **Turcsi, E.**, Marton, K., Oláh, P., Deli, J.: Investigation of the carotenoid composition of different kinds of fresh and cooked pumpkins (*Cucurbita maxima*) *Carotenoid Science* 12(June), 135 (2008)

5. Horváth. Gy., Molnár, P., Szabó, L. Gy., **Turcsi, E.**, Deli, J.: A kanadai aranyvessző (*Solidago canadensis* L.), a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.), és a közönséges gyújtóványfű (*Linaria vulgaris* Mill.) gyógynövények karotinoid analízise *Gyógyszerészet* 52, november. Suppl. 17. (2008)

6. Molnár, P., Horváth, Gy., **Turcsi, E.**, Szabó, I., Deli, J.: Néhány gyógynövény virágzatának és termésének karotinoid-analízise *Gyógyszerészet* 53, Suppl. I. S50-51. (2009)

7. Molnár, P., Horváth, Gy., **Turcsi, E.**, Deli, J., Kavase, M., Satoh, K., Tanaka, T., Tani, S., Sakagami, H., Gyémánt, N., Molnár, J.: Carotenoid composition and *in vitro* pharmacological activity of Rose hips *Acta Biologica Cracoviensia* 53 (Suppl. 1) 27 (2011) *if=0,565*

8. Horváth, Gy., Molnár, P., Takács, T., **Turcsi, E.**, Deli, J.: Investigation of carotenoid composition in flowers of *Chelidonium majus* L. with CLC and HPLC techniques *Acta Biologica Cracoviensia* 53 (Suppl. 1) 57 (2011) *if=0,565*

9. Zelena, K., Lehnert, N., Krings, U., Horváth, Gy., Molnár, P., **Turcsi, E.**, Deli, J., Berger, R.G.: Degrading of carotenoids by the DyP peroxidase Msp2 from *Marasmius scorodoni* *Acta Biologica Cracoviensia* 53 (Suppl. 1) 60 (2011) *if=0,565*

10. Deli, J., **Turcsi, E.**, Szabó, I., Mosquera, Y., Murillo E.: Carotenoid composition of mamey fruit (*Pouteria sapota*)
Acta Biologica Cracoviensia 53 (Suppl. 1) 55 (2011) if=0,565

11. Papp, N., Horváth, Gy., Bencsik, T., **Turcsi, E.**, Deli, J., Molnár, P.: *Euphorbia* taxonok karotinoid-analízise
Gyógyszerészet 55 (Suppl.) P-25, p. S32. (2011)

12. Andres, V., Horváth, Gy., Deli, J., **Turcsi, E.**, Molnár, P.: Az orvosi somkóró (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.) virágzatának karotinoid-analízise
Gyógyszerészet Suppl. I., P-47, p. S80 2014/4

Konferencia proceeding

1. **Turcsi, E.**, Szabó, I., Murillo, E., Mosquera, Y., Deli, J.: Carotenoid composition of mamey fruit (*Pouteria sapota*)
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010. Proceedings pp. 289-292.

2. **Turcsi, E.**, Deli, J.: Comparative study on the separation of structural and geometrical isomers of carotenoids on C₁₈ and C₃₀ stationary phases
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010. Proceedings pp. 293-296.

3. Marton, K., **Turcsi, E.**, Deli, J.: Carotenoid composition of different kinds of fresh and cooked pumpkins (*Cucurbita maxima*)
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010. Proceedings pp. 247-249.

4. Horváth, Gy., **Turcsi, E.**, Brandi, F., Liverani, A., Rosati, C., Deli, J., Molnár, P.: Analysis of carotenoid composition in yellow- and white-fleshed peach varieties during fruit development
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010. Proceedings pp.262-264.