

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**PAPRIKAKAROTINOIDOK VIZSGÁLATA:
ANALÍZIS, IZOLÁLÁS, SZERKEZETAZONOSÍTÁS**

Deli József

Készült
a Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Karának
Orvosi Kémiai Intézetében

Pécs, 2001

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**PAPRIKAKAROTINOIDOK VIZSGÁLATA:
ANALÍZIS, IZOLÁLÁS, SZERKEZETAZONOSÍTÁS**

Deli József

Készült
a Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Karának
Orvosi Kémiai Intézetében

Pécs, 2001

TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1
II.	CÉLKITŰZÉS	3
III.	ELŐZMÉNYEK	4
IV.	EREDMÉNYEK	16
1.	A karotinoid-összetétel vizsgálata paprikában	16
2.	Izolálás, szerkezet- és konfigurációmeghatározás	24
2.1.	β -Kriptoxantin-epoxidok előállítása	26
2.2.	3,6-Epoxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok	30
2.3.	3,5,6-Trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok	36
2.4.	γ -Végcsoporthoz tartozó karotinoidok izolálása	56
2.5.	Kapszanton izolálása	60
3.	Egyéb növényi források vizsgálata 3,6-epoxi- β - és 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálására	62
3.1.	Tigris liliom (<i>Lilium tigrinum</i>)	62
3.2.	Vadgesztenye (<i>Aesculus</i>) virág porzójának vizsgálata	64
3.3.	<i>Asparagus officinalis</i> bogyójának vizsgálata	66
3.4.	<i>Asparagus falcatus</i> bogyójának vizsgálata	66
4.	A paprikakarotinoidok bioszintézise	69
V.	KITEKINTÉS	75
VI.	ALKALMAZOTT MÓDSZEREK, KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK	85
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS	87
VIII.	IRODALOMJEGYZÉK	90
IX.	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	95
VII.	AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ, DE ABBAN NEM SZEREPLŐ KÖZLEMÉNYEK	98
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	100

Függelék: Képlet gyűjtemény

Melléklet: 1*-26* közlemények különlenyomatai

„The carotenoids are the most interesting class of compounds with which I have worked, and they have given me a great deal of pleasure”

/Paul Karrer/

I. BEVEZETÉS

Intézetünkben - a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Kémiai Intézetében - közel 80 éves múltat tekint vissza a karotinoidok kutatása. Az 1923-ban Pécsre települt Erzsébet Tudományegyetem Orvosi Karán megalakult Kémia Intézet első professzora Zechmeister László a természetes anyagok kémiájával, köztük az akkor még gyerekcipőben járó karotinoidkémiával kezdett el foglalkozni. Munkatársával, Cholnoky Lászlóval együtt számos szerkezeti és elválasztási problémát oldottak meg, amelyek nemzetközi hírűvé tették a munkacsoportot. Már az 1920-as évek közepén elkezdtek vizsgálni a paprika színező anyagait is. Ez a terület a műszeres módszerek és az elválasztástechnika fejlődésével időről-időre újból előtérbe került. Zechmeister László emigrálása után Cholnoky László, majd az Ő halála után Szabolcs József vezetésével folytatódottak a kutatások.

1986-ban kerültem az akkori POTE Kémiai Intézet Prof. Szabolcs József vezette karotinoidkémiailag munkacsoportjába. Ekkor kezdtem el a karotinoidok, elsősorban a paprikakarotinoidok vizsgálatát, akkor még Szabolcs professzor irányításával. Mivel Ph.D. fokozatomat az 1984-ben a heterociklusos vegyületek szintéziséből írt műszaki doktori címem átminősítése alapján kaptam, így ennek az értekezésnek az alapjául az elmúlt 15 évben elvégzett kutatómunka szolgál.

A karotinoidkémiáról, mint a természetes anyagok kémiájáról, a kémia több klasszikus ágából tevődik össze. Az új szerkezetű karotinoidok izolálásához szükség van a klasszikus és modern elválasztástechnika alkalmazására, a szerkezetek meghatározásához a modern szerkezetvizsgáló módszerek és a hagyományos kémiai módszerek együttes használatára, a szerkezetigazolásukhoz pedig igen gyakran kell szerves kémiai módszerekhez nyúlni.

Ma 600-nál több természetben előforduló karotinoidot ismerünk, szinte minden növény, növényi szerv karotinoidanalízisét elvégezték már. Így a növényekben fő

komponensként előforduló karotinoidokat csak véletlenszerűen lehet találni. Számos, igen kis mennyiségben előforduló ismeretlen szerkezetű karotinoid lehetséges azonban, amelyek szerkezetének pontos megismerése segíthet tisztázni a karotinoidok bioszintézisének még hiányzó láncszemeit. Ezeknek a minor komponenseknek az izolálása - különösen egy sokkomponensű rendszerből - és szerkezetük pontos meghatározása csak az előbb említett módszerek együttes alkalmazásával lehetséges. Így, bár értekezésem alapvetően szerves kémiai jellegű, számos analitikai munkát is tartalmaz, amelyek elvégzése nélkül az új karotinoidok izolálása nem lett volna lehetséges.

Az értekezés nem a munkák időrendi sorrendjét követi, hanem egy célszerűen megválasztott tematikát. Az előzmények ismertetése után a negyedik fejezet első része az analitikai munkák eredményeit foglalja össze, a második és harmadik része pedig az izolált, illetve félszintetikus módszerrel előállított vegyületek szerkezetének és konfigurációjának meghatározását tartalmazza. Ezt a karotinoidok bioszintézisének rövid összefoglalása követi. A kitekintés című fejezetben röviden felvázolom a karotinoidkémia egy új irányzatában elért eredményeinket.

A hivatkozott irodalmat arab számmal [1-111], a dolgozat alapjául szolgáló saját közleményeket csillaggal jelölt arab számmal [1*-27*] jelölöm. Az értekezés tárgykörébe tartozó egyéb dolgozatokat kettős kereszttel jelölt arab számmal külön csoportosítottam [1#-19#].

Az értekezésben említett, mások által izolált vegyületeket vastagított arab számmal, míg az általunk izolált karotinoidokat, amelyeknek szerkezet- és konfigurációmeghatározását elvégeztük, vastagított római számmal jelölöm (**I-XL**). Ha már ismert szerkezet újbóli azonosítását végeztük el, akkor ezt mindkét szám megadásával tudatom: pl. cucurbitaxantin A (**4=VIII**).

A karotinoidok közti könnyebb eligazodást segíti az értekezés végén elhelyezett képlet gyűjtemény, mely a szövegben említett, de számmal nem jelölt vegyületek képleteit tartalmazza abc-sorrendben.

Terjedelmi okok miatt a kísérleti rész csak az általánosan használt eljárások és mérési módszerek leírását tartalmazza, a konkrét körülmények és a vegyületek spektroszkópiai adatai a mellékletként külön kötetbe egybegyűjtött különlenyomatokban találhatók.

II. CÉLKITŰZÉS

Intézetünkben, az 1980-as évek elején kidolgozott HPLC módszer segítségével sikerült a piros paprika extraktumából új szerkezetű, 3,6-epoxi- β -, illetve 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidokat izolálni, és szerkezetüket meghatározni. 1986-ban korszerűsíteni tudtuk a HPLC rendszerünket, amely az elválasztás hatékonyságát nagymértékben megnövelte. Ez alapján tűztük ki célul, hogy újra elvégezzük a különböző paprikafajták karotinoid analízisét azzal a céllal, hogy további, eddig a paprikában még ki nem mutatott, vagy egyáltalán nem ismert szerkezetű *minor* komponenseket izoláljunk, meghatározzuk szerkezetüket és konfigurációjukat. Az érési folyamat során bekövetkező összetétel változásból, a különböző színű paprikák karotinoid összetételéből a karotinoidok bioszintézisének még nem ismert lépéseire, az új szerkezetű karotinoidok képződésének mechanizmusára szeretnénk volna következtetéseket levonni.

Ahogy az minden kutatómunka során bekövetkezik, a menetközben felmerülő újabb kérdések, problémák új irányokat is adtak a munkának. Az izolált vegyületek konfigurációjának egyértelmű meghatározásához számos szemisztetikus vegyület (karotinoid-5,6-epoxidok, 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok) előállítását és konfigurációjának meghatározását is célul kellett kitűznünk, illetve elvégeznünk.

Mivel különböző növényi forrásokból származó, azonos konstitúciójú, de eltérő konfigurációjú 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok izolálásáról lehetett az irodalomban adatokat találni, így a bioszintézis utak és a konfigurációk azonosságának vagy különbözőségének megállapítására célul tűztük ki olyan egyéb növények vizsgálatát is, amelyek irodalmi adatok szerint κ -végcsoportú karotinoidokat tartalmaznak fő, vagy mellék komponensként. Terveinkben szerepelt természetesen az ezekben a növényekben esetlegesen előforduló új szerkezetű karotinoidok izolálása, szerkezetének és konfigurációjának meghatározása is. Végül, de nem utolsósorban, a *minor* komponensek pontos szerkezetének és konfigurációjának ismeretében javaslatot kívántunk tenni keletkezésük mechanizmusára is.

III. ELŐZMÉNYEK

„Míg a levélzöld, valamint számos virág- és gyümölcsfesték vegyi szerkezete, legalább nagy vonásokban, tisztázódott, addig a paprika (*capsicum annuum* L.) érésekor szemünk előtt kifejlődő festék felderítése még hátra van, bár e 400 év óta használt gyógy- és fűszernövény közismert jellegét a szép 'capsicum-vörös' adja meg. A festőanyag színerős, a növényben külső hatásoknak jól ellenáll, maga a drog pedig könnyen beszerezhető. Különös oknak kell tehát fennforognia, mely a probléma megoldását eddig késleltette.

Szinte önkéntelen rámutat erre az okra a paprika egyik első vizsgálója, Braconnot, több mint százéves értekezésében. Braconnot elsősorban a növény élesízű anyagának leválasztására törekedett, de a lehetőség szerint felsorolja a paprika egyéb alkotórészeit is. Összeállításában szerepel egy 'matière cireuse unie à un principe colorant rouge'. Jelképe lehetne ez a sor a 'capsicum vörös' százados történetének, mert a festékleválasztás legfőbb akadályára céloz.”

E sorokkal kezdi Zechmeister László és Cholnoky László a „Vizsgálatok a paprika festékéről” című 11 részes sorozatának első részét 1927-ben [1].

A piros paprika régóta ismert, színezékével, a viaszszerű paprikavörössel már a XIX. században is foglalkoztak [2,3]. Kristályos előállítása mégis sokáig késett, mivel a kísérő zsíroktól és viaszoktól nehezen volt elkülöníthető. 1927-ben sikerült csak Zechmeister Lászlónak és Cholnoky Lászlónak a „paprikavörös” főfestékét kristályosítani, melyet kapszantinnek neveztek el [1,4]. Ez a kapszantin készítmény azonban nem volt egységes. Zechmeister és Cholnoky később - elsőként alkalmazva a Tswett-féle oszlopkromatográfiát - még egy piros mellékfestéket, a kapszorubint talált [5,6]. Megállapították, hogy a teljesen érett és megszárított, a kereskedelembe is beszerezhető paprika termésfala (paprikabőr) a két különleges vörös festéken kívül még különböző sárga festékeket is tartalmaz, amelyek közül a β -karotint, kriptoxantint és zeaxantint sikerült kristályosan elkülöníteni, a többi pigmentet ellenben csekély mennyiségük miatt nem lehetett kristályosítani és azonosítani [7-15].

Az 1945-48-as években Karrer és munkatársai [16] felderítették a karotinoid-5,6-epoxidok szerkezetét. Munkásságuk nyomán olyan módszer fejlődött ki, amely lehetővé tette a karotinoidok valószínű azonosítását az egyes festékek kristályosítása nélkül, és ezzel

megnyílt az út olyan festékek azonosítására is, amelyeknek kristályos állapotban való elkülönítése és vizsgálata - éppen csekély mennyiségük miatt - nagy nehézségekbe ütközött, vagy teljesen kilátástalan volt. Karrer és munkatársai az általuk kidolgozott módszerrel számos növény különféle szerveinek karotinoidjait vizsgálták meg. Vizsgálataik alapján néhány régebbi irodalmi adatot helyesbíteni kellett, de újabb karotinoidokat nem találtak [17]. Ilyen előzmények után időszerűvé vált a paprika festékeinek újabb vizsgálata is, azzal a céllal, hogy legalább azonosítsák azokat a karotinoidokat amelyeknek kristályosítása addig nem sikerült.

Az 1950-es években Cholnoky és munkatársai a kereskedelemben kapható paprika-terméssel helyett áttértek a frissen szedett termés vizsgálatára, mert attól tartottak, hogy a szokásos ipari feldolgozáskor az érzékeny karotinoidok változásokat szenvedhetnek, nekik pedig éppen az volt az egyik céljuk, hogy az élő növényi szerv karotinoidjait ismerjék meg.

A paprikának számos fajtája ismeretes, amelyek főleg termésük formájában és színében különböznek egymástól. Cholnoky a piros paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) és a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme flavum*) érett és éretlen termésének karotinoidjait vizsgálta [18-21].

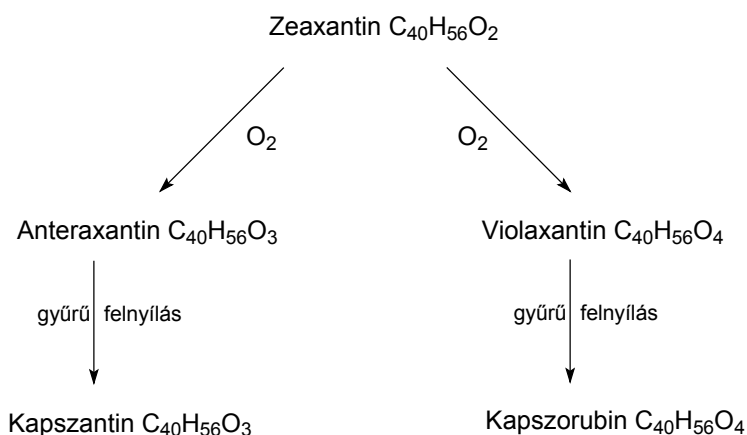
Az először vizsgált piros paradicsompaprika termésének fejlődésében két élesen elhatárolt szakaszt lehet megkülönböztetni: a termés az első szakaszban klorofill tartalma miatt zöld színű, a másodikban viszont a klorofill eltűnésével párhuzamosan megvörösödik. Az éretlen, zöld termés karotinoidjai közül Cholnoky és munkatársai a következőket azonosították: β -karotin, β -karotin-monoepoxid (nyomok), mutatokróm, neo- β -karotin B és U, violaxantin, xantofill (lutein), fóliaxantin (neoxantin), fóliakróm (a fóliaxantin furanoid származéka) és anteraxantin (nyomok). Ezeken kívül a zöld termés valószínűleg tartalmazott még kriptoxantint, valamint a xantofill és a violaxantin *cisz*-izomerjeit. Az érett termés festékei a következők voltak: β -karotin, aurokróm, mutatokróm, kriptoxantin, kriptokapszin, neo- β -karotin B és U, kapszorubin, kapszantin, violaxantin, anteraxantin, xantofill-epoxid, zeaxantin, és ezek közül egyeseknek a *cisz*-izomerjei. A paprika leveleinek karotinoidjai minőségileg megegyeztek az éretlen zöld termésével, tartalmaztak azonban α -karotint is. Festéktartalmuk viszont 65-ször akkora volt, mint a zöld terméseké. Ezen adatok birtokában Cholnoky és munkatársai arra következtettek, hogy a levelekben és a klorofill tartalmú termésekben az egyes pigmenteknek azonosnak kell lennie. A termések érésénél a klorofill eltűnésével párhuzamosan a festékképződésben

minőségi változás következik be, amelyet a festékek mennyiségének ugrásszerű megnövekedése követ.

Ezt követően Cholnoky és munkatársai a sárga paradicsompaprika festékeiről számoltak be. Ennek a kultúrfajtának éretlen termései zöldek, de a klorofill eltűnésekor, tehát teljes beérés után sem vörösödnek meg, hanem narancssárgák maradnak. Az éretlen, zöld termésben a következő karotinoidokat azonosították: β -karotin, xantofill, violaxantin, és ezeknek néhány *cisz*-izomerje, β -karotin-monoepoxid, β -kriptoxantin és anteraxantin nyomai, fóliaxantin és fóliakróm. Az érett sárga termések festékei: α - és β -karotin, α - és β -kriptoxantin, valamint ezeknek *cisz*-izomerjei, xantofill, violaxantin, anteraxantin és a két előbbi *cisz*-izomerjei, fóliaxantin, fóliakróm, és nyomokban β -karotin-monoepoxid. A levelek karotinoidjai minőségileg megegyeztek az éretlen termésével, de tartalmaztak α -karotint is, festéktartalmuk pedig 50-szer nagyobb volt, mint a zöld termésé.

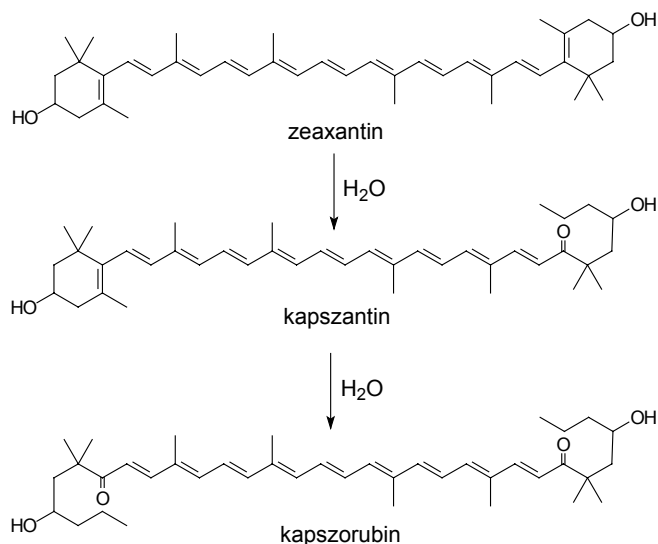
A kísérleti adatokból Cholnoky a karotinoidok oxigén transzfer szerepére következtetett [22], ezek a megfontolások azonban nem voltak bizonyíthatóak. Cholnoky és munkatársai érdeme, hogy sárga paradicsompaprikából izolálták először kristályosan az α -kriptoxantint, melynek szerkezetét később igazolták [23,24]. A piros paradicsompaprikában még egy piros festéket találtak, a kriptokapszint [25]. Cholnoky másik feltevése a kapszantin és a kapszorubin bioszintézisére vonatkozott (1. ábra). Eszerint a zeaxantin epoxidálásával anteraxantin, illetve violaxantin keletkezik, és ezekből képződik gyűrűfelnyílással a kapszantin, illetve a kapszorubin [18,19].

E munkák kapcsán javasolta Cholnoky a kapszantin addig elfogadott szerkezetének revízióját.



1. ábra. A kapszantin és a kapszorubin képződése zeaxantinból Cholnoky szerint [18]

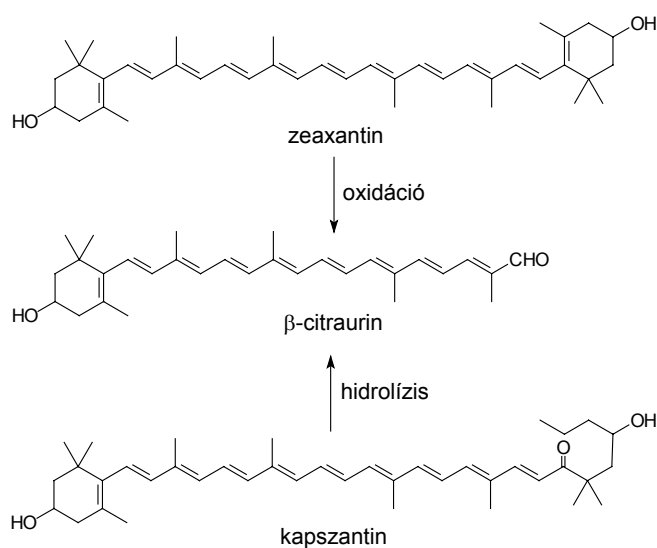
Zechmeister és Chohnoky első kapszantin összegképlete ($C_{34}H_{48}O_3$) ugyan még helytelen volt [10], de csakhamar helyesbítették és felismerték, hogy a kapszantin is 40 szénatomos karotinoid ($C_{40}H_{58}O_3$) [6]. A szerzetkutató megkezdésekor Zechmeister és Chohnoky abból a feltételezésből indult ki, hogy a piros paprikában együttesen előforduló karotinoidok, azaz a kapszantin, kapszorubin, zeaxantin, β -kriptoxantin és β -karotin egymáshoz hasonló, rokon vegyületek. Így előtérbe került a kapszantin és kapszorubin lehetséges szerkezeti képleteinek mérlegelésekor a béta-alapstruktúra. A kapszantin nagy „színereje” folytán feltételezték, hogy a mikrohidrogénezéssel kimutatott tíz telítetlen kötés egymással konjugációban van [8,12,26]. A kapszantin 10 kettős kötésének konjugációja azonban egyedül még nem magyarázná meg élénkpiros színét, hisz a β -karotinban 11 kettős kötés van konjugációban, és színe mégiscsak sárga. Ésszerűnek látszott tehát a kromoforba még egy karbonilcsoportot is belevonni, bár ilyet semmiféle oxoreagensekkel sem sikerült kimutatni. Mivel a kapszantinnak sem sav, sem enol, sem aldehid jellege nincs [12], a kapszantin harmadik oxigénjének ketonos elhelyezése közvetlen igazolás nélkül is elfogadhatónak látszott. Feltételezték, hogy a karbonilcsoport árnyékoltsága miatt nem reagál az oxoreagensekkel. Zechmeister és Chohnoky úgy gondolták, hogy a piros paprikában a kapszantin és a kapszorubin a zeaxantinból vízáddícióval egybekötött gyűrűfelnyílással jön létre (2. ábra).



2. ábra. A kapszantin és a kapszorubin képződése Zechmeister és Chohnoky szerint [12]

A fenti képletet erősítette meg 1937-ben Zechmeister és Cholnoky [14], amikor a kapszantin lúgos kezeléssel kiváltott retro-aldolkondenzációja során β -citaurint nyert (3. ábra), melyet egy évvel korábban Zechmeister és Tuzson [27] narancshéjból már izolált.

A β -citaurin keletkezése kapszantinból azt jelentette, hogy a kapszantin szerkezete a C(1) – C(9') atomok között azonos a zeaxantinével. Karrer [28] ugyanis a zeaxantin oxidációjával β -citaurint kapott (3. ábra), így közvetlen bizonyítékot adott arra, hogy a kapszantin a C(9') atomig azonos a zeaxantinnal.

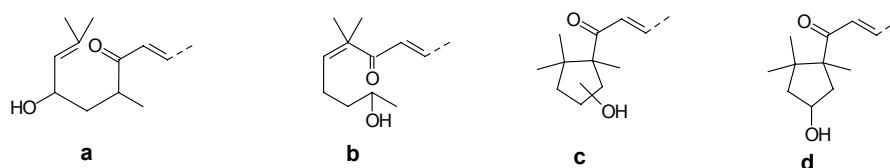


3. ábra. A β -Citaurin előállítása zeaxantinból és kapszantinból [14,28]

A felállított szerkezeti képletek jól magyarázták a kapszantin és kapszorubin ismert tulajdonságait. A közel két évtizedes nyugalmat azonban élénk érdeklődés váltotta fel, amikor 1955-ben Cholnoky és munkatársai [18,19] a piros paradicsompaprika festékeinek növényfiziológiai szerepével foglalkozva utalást tettek arra, hogy a kapszantin és kapszorubin szerkezetét helyesbíteni kívánják. Ilyen előzmények után a már nyugvópontra jutott piros paprikafestékek szerkezeti kérdése ismét a felszínre került, és Karrer iskoláján kívül hamarosan Weedon munkacsoportja is bekapcsolódott a kutatásokba.

Cholnoky [29,30] nagyszámú kísérleti anyagon bizonyította - főleg a kapszantin és kapszorubin észtereit égetve - hogy a kapszantin helyes összegképlete két, a kapszorubin pedig négy hidrogénatommal szegényebb a régi összegképleteknél. A kapszantin új összegképlete tehát $C_{40}H_{56}O_3$, a kapszorubin pedig $C_{40}H_{56}O_4$. A régi tapasztalati képletekhez viszonyítva, az új összegképletek hidrogén hiánya vagy újabb telítetlenség, vagy újabb gyűrű mellett szólt. Gyűrűk feltételezése a festékek biogenezeise szempontjából

valószínűtlennek tűnt. A régi szerkezeti képleteket Cholnoky tehát úgy próbálta módosítani, hogy a kapszantin molekulájában egy, a kapszorubinban pedig két új etilénkötést feltételezett. A feladat tehát ezek után az új kettős kötések elhelyezése volt. Mivel a kapszantin szerkezetének C(1)-től a C(9') atomig a zeaxantin szerkezetével meg kell egyeznie, az új kettős kötés csak a karbonilcsoport utáni molekularészben lehet. Tekintettel a kapszantin és kapszorubin bizonyított kromofor rendszerére, az új kettős kötés csak izolált helyzetben helyezkedhet el. Cholnoky a hidroxilcsoportok helyét az új szerkezeteknél is megtartotta, hiszen éppen az előző években feltételezte a kapszantinból anteraxantinból, a kapszorubinnak pedig violaxantinból való keletkezését. Különböző megfontolások után az izopropilidénés szerkezetet (4. ábra, **a**) választotta [29,30]

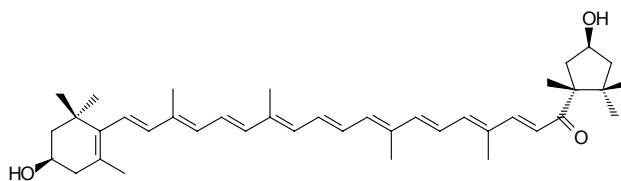


4. ábra. Különböző kapszantin végcsoportok

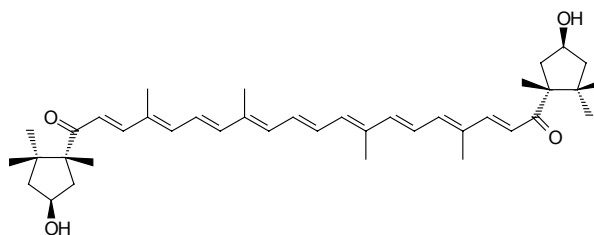
1956-ban Karrer [31] is módosította az eredeti Zechmeister-Cholnoky féle kapszantin képletet. A Cholnoky által javasolt izopropilidénés szerkezettel ellentétben a karbonilcsoportot a C(1)-hez kapcsolta, és a hidroxilcsoportot a C(5)-re helyezte át (**b**) feltételezve, hogy a kapszantin a β -kriptoxantinból keletkezik a bioszintézis során. Ez Cholnokynak a karotinoidok fiziológiai szerepére vonatkozó elméletével éles ellentétben állt. A Karrer-féle szerkezeti képletekkel a kapszantin, illetve a kapszorubin sok ismert tulajdonságát sem lehetett összehangba hozni. Mivel Karrer eredményei annyira hihetetlennek tűntek, Cholnoky és Szabolcs [32] megismételték a kísérleteket, Karrer eredményeit azonban nem tudták reprodukálni. Ekkor jelent meg Karrer és Entschel újabb közleménye [33], melyben elvetik az előző szerkezeti képlet módosításukat, és beszámolnak arról, hogy a kapszantinból Oppenauer-oxidációval előállított kapszanton IR-spektrumában megtalálták a ciklopentanongyűrű karakterisztikus frekvenciáját ($\nu=1740\text{cm}^{-1}$). Alig valamivel később Weedon és munkatársai [34] NMR-spektroszkópiával hasonló eredményre jutottak, és megadták a ciklopentángyűrűn kívül a három metil-csoport 1,1,5-helyzetét is (**c**). A hidroxilcsoport helyzete a ciklopentángyűrűn azonban továbbra is bizonytalan maradt.

A hidroxilcsoport helyzetét és a trimetil-ciklopentángyűrűs szerkezetet Cholnokynak és Szabolcsnak sikerült kémiai úton igazolnia [35]. A kapszantin-diacetátot

először ózonizálták, majd krómsavval oxidálták. Az oxidátumot preparatív papírkromatográfiával feldolgozva, kristályos kámforonsavat, 1,1,2-trimetil-glutársavat, trimetil-borostyánkőssavat, 1,1-dimetil-borostyánkőssavat és dimetil-malonsavat izoláltak. A savak megjelenése bizonyította mind a ciklopentán gyűrűs végcsoportot, mind a rajta lévő szubsztituensek helyzetét. A kámforonsav izolálása nemcsak a szerkezetfelderítés szempontjából volt fontos, hanem a (-)-kámforonsav lett a karotinoidok abszolút konfigurációvizsgálatában az első vonatkoztatási alap is. Karrer és Faigle [36,37] ugyanis lényegében ezt a lebontást ismételte meg nagyobb mennyiségű kapszantinból kiindulva, és kristályos állapotban olyan mennyiségű kámforonsavat tudtak izolálni, melyből megállapíthatták a fajlagos forgatóképességét is. Így a (-)-kámforonsav - melynek abszolút konfigurációja már ismert volt - egyértelműen bizonyította a kapszantin 5'-szénatomjának *R*-konfigurációját. A ciklopentángyűrűhöz kapcsolódó karbonilcsoport és a 3'-helyzetben lévő hidroxilcsoport *transz* helyzetéből pedig következett a 3'-szénatom *S*-konfigurációja. Ezzel tehát tisztázódott a kapszantin végcsoportjának (κ), és ezzel a kapszantinnak és kapszorubinnak a szerkezete; eddig ilyen végcsoport nem volt ismeretes.



Kapszantin (1)

(3*R*,3'*S*,5'*R*)-3,3'-dihidroxi- β,κ -karotin-6'-on

Kapszorubin (2)

(3*S*,5*R*,3'*S*,5'*R*)-3,3'-dihidroxi- κ,κ -karotin-6,6'-dion

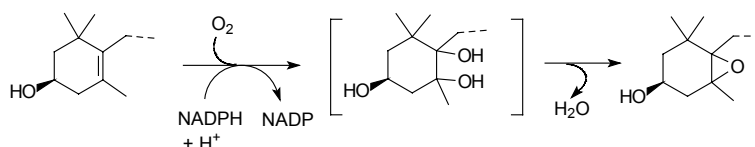
A szerkezetre további bizonyítékot szolgáltatott az 1974-ben a kapszantin-*bisz*(*p*-bróm-benzoát)-ról publikált röntgen krisztallográfiai adatok [38]. A kapszantin és kapszorubin szerkezetbizonyító szintézisét végül az angol kutatócsoport és a Hoffmann-La Roche kutatócsoportja együtt végezte el 1983-ban [39,40].

Miután 1960-ban, több mint harminc évvel a felfedezése után tisztázódott a kapszantin, a kapszorubin és a kriptokapszin κ -végcsoportjának szerkezete, előbb Curl, majd Davies és munkatársai is elvégezték a különböző paprikafajták karotinoid analízisét.

Curl ellenáramú megoszlatást alkalmazva vizsgálta a zöld és piros paprika karotinoid-összetételét [41,42]. Piros paprikában közel 40 komponenst talált, ezek közül azonban csak a már ismert komponensek (kapszantin, kapszorubin, neoxantin, violaxantin, luteoxantin, anteraxantin, mutatoxantin, zeaxantin, kriptokapszin, kriptoxantin, α - és β -karotin) egzakt azonosítása történt meg [42]. Számos további komponens szerkezetét kémiai reakcióik, illetve a polaritási sorban elfoglalt helyük alapján próbálta meg Curl megadni. Ezekre a szerkezetekre, illetve nevekre sok esetben még az 1990-es években is hivatkoztak az irodalomban, anélkül, hogy kristályos állapotban izolálták és szerkezetüket modern spektroszkópai módszerekkel meghatározták volna [43,44].

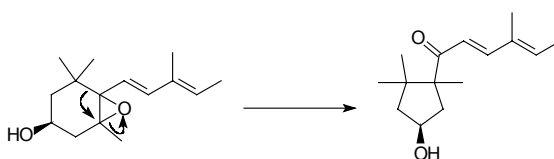
1970-ben Davies és munkatársai [45] vékonyréteg kromatográfiát alkalmazva vizsgálták a fehér, sárga, narancssárga és piros színűre érő paprikák karotinoid-összetételét, és - Cholnoky sémáját alapul véve - felvázolták a lehetséges karotinoid bioszintézist a paprikában (8. ábra).

Davies és munkatársai ebben a közleményben írják le – alapul véve Yamamotonak a xantofill ciklusra vonatkozó cikkét [46] – az anteraxantin és violaxantin zeaxantinból molekuláris oxigén felhasználásával való képződését is (5. ábra).



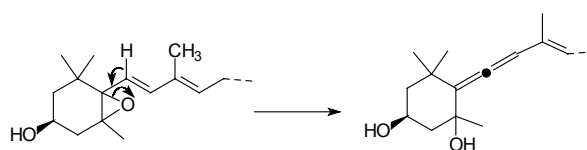
5. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport képződése Davis szerint [45]

A karotinoid-5,6-epoxidok tovább alakulására pedig két lehetséges utat adtak meg. Piros paprikában a pinakolin átrendeződést, amely a κ -végcsoport kialakulását eredményezi (6. ábra).



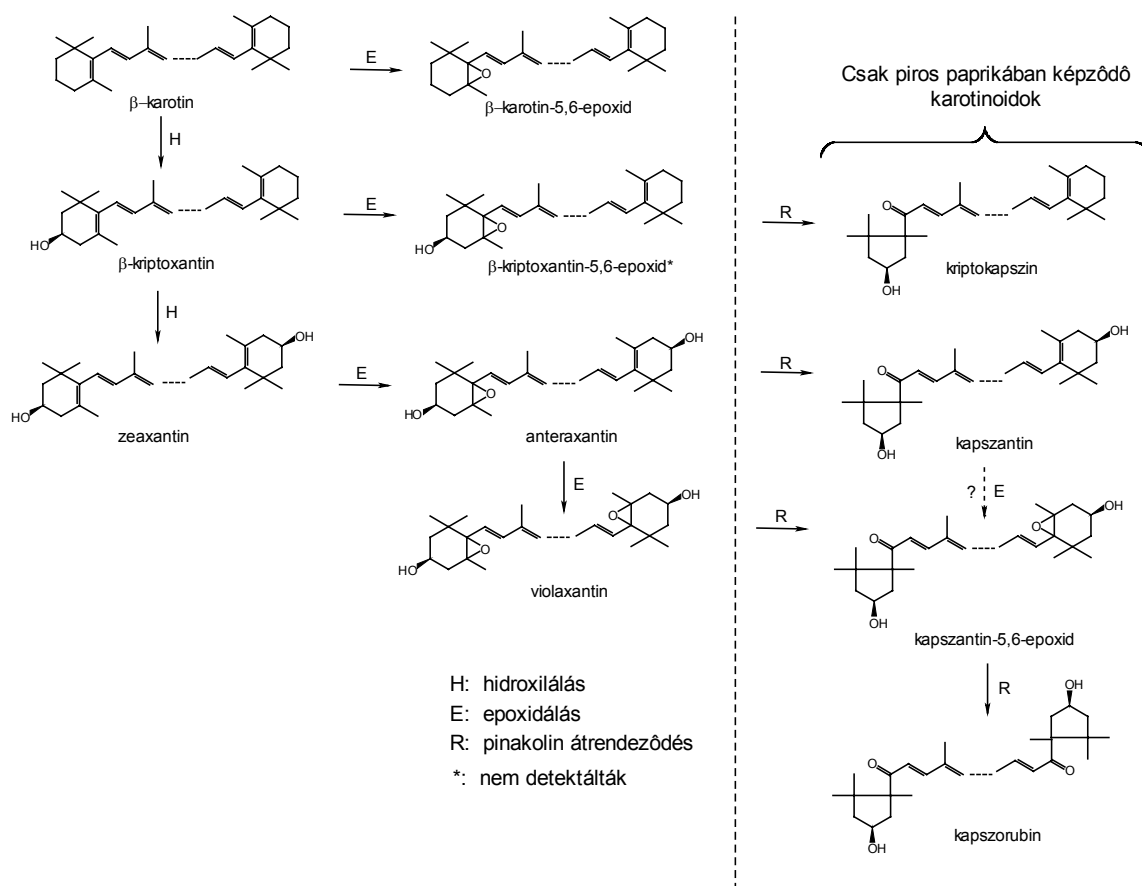
6. ábra. A κ -végcsoport kialakulása [45]

Az átrendeződést katalizáló enzim csak a piros paprikában van jelen, a sárga paprikából hiányzik. A másik lehetséges átalakulás a 3,5-dihidroxi-allén végcsoport kialakulása, melynek során a violaxantinból neoxantin képződik (7. ábra).



7. ábra. Az allén-végcsoport kialakulása [45]

A neoxantin szerkezetét éppen egy évvel korábban sikerült Cholnoky és Weedon munkacsoportjának közösen tisztázni [47].



8. ábra. Feltételezett bioszintézis utak a sárga és piros paprikában Davies szerint [45]

A séma alapján a sárga, vagy narancssárga színű paprikákban (amelyek sohasem pirosodnak meg) a karotinoidok bioszintézise befejeződik a karotinoid-5,6-epoxidok (antheraxanthin, violaxanthin) képződésével, a piros paprikában a karotinoid-5,6-epoxidok ún. pinakolin átrendeződéssel átalakulnak a megfelelő keto-karotinoiddá: antheraxanthinból

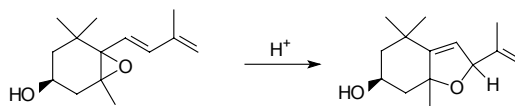
kapszantin, violaxantinból kapszantin-5,6-epoxidon keresztül kapszorubin, míg β -kriptoxantin-5,6-epoxidból kriptokapszin keletkezik.

Az 1970-es években többen is vizsgálták a különböző paprikafajták karotinoid-összetételét [48-52], jelentősebb eredményt azonban nem értek el. Meg kell említeni Bilal Camara nevét, aki a hetvenes években kezdte el a paprikakarotinoidok vizsgálatát. Előbb csak különböző fajták karotinoid analízisét végezte el [50], később pedig a paprikakarotinoidok bioszintézisét vizsgálta, és szisztematikusan felderítette a bioszintézisben résztvevő enzimek szerkezetét, és működési mechanizmusát. Izotóppal jelzett anteraxantint és violaxantint használva Camara mutatta ki először, hogy a kapszantin és a kapszorubin ezekből a vegyületekből keletkezik [51,52].

Az 1970-es évek közepétől, a nagynyomású folyadékkromatográfia gyors ütemű fejlődésével e módszer is egyre nagyobb szerepet kapott a karotinoidanalízisben. Az elválasztástechnika, a műszeres analitikai módszerek (HPLC) és ezek detektálási módjainak fejlődése lehetővé tette az előzőekben nem kimutatható, kis mennyiségben jelenlévő komponensek kimutatását, elválasztását is. A modern szerkezetvizsgáló módszerek elterjedése lehetővé tette e kis mennyiségben jelenlévő komponensek szerkezetének meghatározását is.

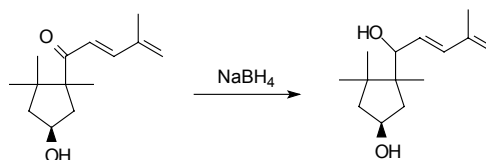
Intézetünkben Baranyai és munkatársai a piros paprika karotinoidjainak analízisét dolgozták ki HPLC módszerrel [53]. Házilagos készítésű, állandó térfogatú szívó oldali gradiens keverővel adott oldószer gradienst tudtak elérni, ezzel lehetővé vált, hogy a széles polaritás tartományt felölelő karotinoidokat egy kromatogramból külön-külön mérjék, az igen poláros kapszorubintól az apoláros szénhidrogén β -karotinig. Az egyes csúcsok azonosítását különböző hullámhosszokon végzett mérésekkel, standard anyagokkal és specifikus származékképzési reakciókkal ('savazás', redukció) végezték el [54].

A karotinoid-5,6-epoxidok sav hatására karotinoid-5,8-epoxidokká rendeződnek át, polaritásuk csökken, és mivel a konjugált kettős kötés rendszerből egy kettős kötés kiesik, így spektrumuk alacsonyabb hullámhossz irányába tolódik el (9. ábra). Egy kettős kötés kiesése a konjugált rendszerből kb. 20 nm eltolódást jelent.



9. ábra. 5,6-Epoxidok átrendeződése 5,8-epoxidokká

Hasonlóan, a konjugált ketocsoport redukciója is (10. ábra) az UV/VIS spektrum 20 nm-es hipszokróm eltolódását idézi elő, miközben polárosabb hidroxi-termékek keletkeznek.



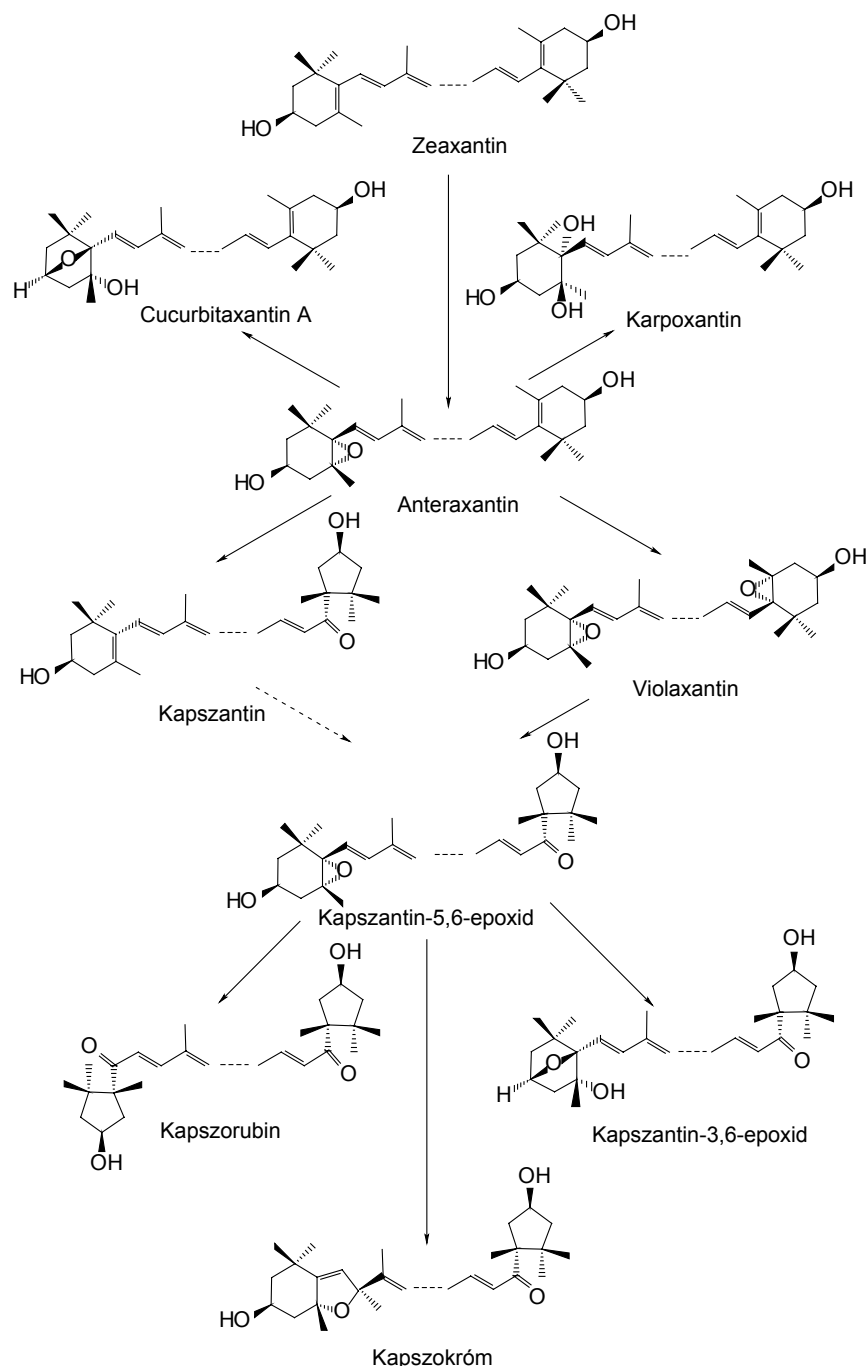
10. ábra. A κ -végcsoport redukciója

Mindkét módszer kitűnő lehetőséget biztosít a jellemző végcsoportot tartalmazó karotinoidok sokkomponensű elegyből való kimutatására.

E módszerek segítségével elvégezve a piros paradicsompaprika karotinoid-analízisét, 15 csúcsot határoztak meg, melyekből ötöt nem tudtak azonosítani. Ezt az öt komponenst hosszadalmas preparatív kromatográfiás módszerrel izolálták és elvégezték a szerkezetazonosítást [55]. Így piros paprikából először sikerült kristályosan izolálni a kapszantin-5,6-epoxidot, az egyik kapszokróm epimert és a karpoxantint ((3*S*,5*S*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro- β , β -karotin-3,5,6,3'-tetrol). A további két festék az eddig csak kevésbé ismert szerkezetű biciklo-3,6-epoxi-5-hidroxi végcsoporttal rendelkező karotinoidnak bizonyult: cucurbitaxantin A ((3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro- β , β -karotin-5,3'-diol) és kapszantin-3,6-epoxid ((3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-5,3'-dihidroxi- β , κ -karotin-6'-on). Az újonnan izolált karotinoidokat elhelyezték a Chohnoky-Davies-féle bioszintézis sémába (11. ábra), feltételezve, hogy mind a 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoport, mind a 3,6-epoxi- β -végcsoport a 3-hidroxi-5,6-epoxi- β -végcsoportból keletkezik. Így a karpoxantin és a cucurbitaxantin A anteraxantinból, a kapszantin-3,6-epoxid pedig kapszantin-5,6-epoxidból képződik.

A cucurbitaxantin A és ennek 5',6'-epoxidja, a cucurbitaxantin B ((3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-3,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahydro- β , β -karotin-5,3'-diol), sütőtökből való izolálásáról a pécsi csoporttal gyakorlatilag azonos időben számoltak be Matsuno és munkatársai [56] (e vegyületek nevüket a növényről kapták). A karpoxantin jelenlétét más

növényekben Eugster és munkatársai már korábban leírták, azonban a 3,5,6-trihidroxivégcsoportra a 3*S*,5*R*,6*R*- konfigurációt javasolták [57].



11. ábra. Piros paprikakarotinoidok bioszintézise [55]

Ilyen előzmények után tűztük ki 1986-ban munkánk céljául a különböző paprikafajták újbóli karotinoid analízisét, egyrészt hogy további adatokat nyerjünk a paprikakarotinoidok bioszintézisének megértéséhez, másrészt, hogy további, kis mennyiségben előforduló karotinoidokat izoláljunk, és elvégezzük szerkezetük és konfigurációjuk meghatározását.

IV. EREDMÉNYEK

1. Karotinoid-összetétel vizsgálata paprikában

A természetben előforduló ismert szerkezetű karotinoidok azonosítása, vagy az ismeretlen karotinoidok szerkezetének felderítése a fizikai és kémiai módszerek széles skálájának alkalmazását igényli. Különbséget kell tennünk, azonban egy bonyolult extrakciós elegyben lévő, ismert szerkezetű karotinoidok azonosítása („*identification*”) és egy eddig még nem ismert szerkezet, beleértve a szterokémiát is, meghatározása („*structure elucidation*”) között.

Az ismert szerkezetű karotinoidok azonosításának („*identification*”) minimális kritériumait a „*Carotenoids*” c. kézikönyv szerkesztői, George Britton, Synnøve Liaaen-Jensen és Hanspeter Pfander, 1995-ben a következőkben fogalmazták meg [58]:

- i) Az UV-látható absorpciós spektrum ($\lambda_{\max}$ és finom szerkezet) legalább két különböző oldószerben meg kell, hogy egyezzen azzal, ami a kromofór rendszerből következik.
- ii) A kromatográfiás tulajdonságoknak két különböző rendszeren – elsősorban vékonyréteg (R_f) és HPLC (t_R) – meg kell egyeznie az autentikus mintáéval, melyet összekromatografálással is kell bizonyítani.
- iii) A kapott tömegspektrumoknak legalább a molekulatömeget meg kell erősítenie.

Ha az előbb említett kritériumok nem valósulnak meg teljesen, azaz nem áll rendelkezésre pl. autentikus minta, a „like” szócskát kell a feltételesen azonosított karotinoid nevéhez illeszteni, pl. „zeaxanthin-like”. Az autentikus minták modern spektroszkópiai módszerekkel történő jellemzését is el kell végezni.

Munkánk során a bonyolult extrakciós elegyek egyes komponenseinek azonosítására a következő eljárásokat, illetve ezek kombinációját alkalmaztuk:

- a) Az extraktumot, esetenként az oszlopkromatográfiával nyert frakciókat, a rendelkezésünkre álló autentikus (MS, CD, NMR spektroszkópiával jellemzett) mintákkal az alkalmazott két HPLC rendszeren összekromatografáltuk.
- b) Az ismert szerkezetű komponenseket oszlopkromatográfiával elválasztottuk, UV/VIS spektroszkópiával és származékképzési reakcióval azonosítottuk, autentikus mintával összekromatografáltuk.

- c) A teljes extraktum „savazását” (9. ábra), illetve redukcióját (10. ábra) elvégeztük az 5,6-epoxi- és a ketokarotinoidok feltételes azonosítására [54].
- d) UV/VIS detektor alkalmazásánál különböző hullámhosszon végzett detektálással [54], diódasoros detektor használatánál a csúcsok spektruma alapján feltételesen azonosítottuk a furanoidokat, ketokarotinoidokat, illetve *cisz*-izomereket.
- e) A feltételesen azonosított furanoidokat a megfelelő 5,6-epoxidok „savazásával”, a *cisz*-izomereket a *transz*-vegyületek izomerizációjával előállítottuk, oszlopkromatográfiával szétválasztottuk és összekromatografálással igazoltuk jelenlétüket. Számos furanoid és *cisz*-karotinoid autentikus mintaként is rendelkezésünkre állt.
- f) Azokat a karotinoidokat, amelyeket az előbb említett módszerekkel nem tudtuk azonosítani, preparatív oszlopkromatográfiás módszerrel kristályos állapotban izoláltuk, és a 2. fejezetben leírt spektroszkópai módszerekkel meghatároztuk szerkezetüket (*structure elucidation*).

Az értekezésben leírt vizsgálatainkat 1986-ben kezdtük. Hosszadalmas munka során választottuk ki az elválasztáshoz leginkább megfelelő HPLC tölteteket, amelyek az abban az időben az intézetünkben gyártott Chromsil C₁₈ (Labor MIM) töltet családba tartoztak. Ugyancsak hosszú időt igényelt egy olyan gradiens program kifejlesztése, amellyel a karotinoidok teljes polaritás tartományát sikerült átfogni. Az utánszilanzált töltettel nem tudtuk a zeaxantin és lutein szétválasztását megoldani, ezért ezek elválasztására nem utánszilanzált töltetet alkalmaztunk. Ezt a rendszert a későbbiekben csak annyiban változtattuk meg (acetont helyett diklórmétánt alkalmaztunk), hogy diódasoros detektor használata esetén a 300 és 400 nm közötti tartományban is detektálhassunk. Mivel célunk nem az analitikai rendszer fejlesztése, hanem ennek használatával a növényi extraktumok összetételének vizsgálata, esetleges új komponensek kimutatása, izolálása volt, így a mai napig ezt a kromatográfiás rendszert alkalmazzuk vizsgálatainkhoz.

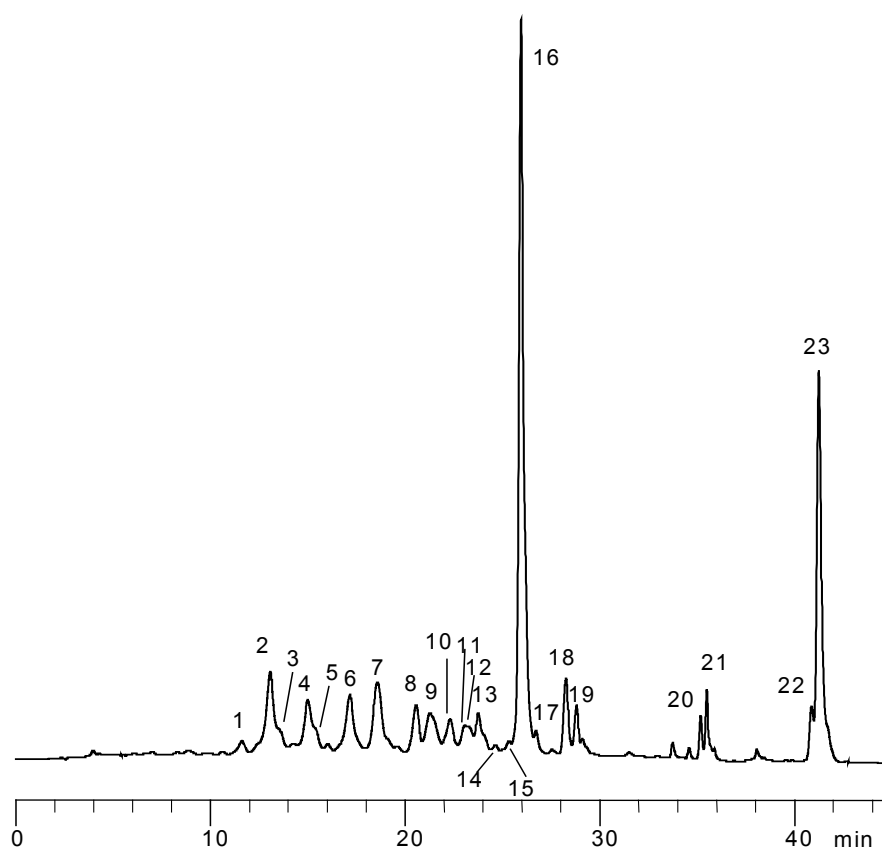
Az előzőekben említett módszerrel megvizsgáltuk a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*), a fekete fűszerpaprika (*C.a.* var. *longum nigrum*), a piros paradicsompaprika (*C.a.* var. *lycopersiceforme rubrum*), valamint a Szentesi Kosszarvú (*C.a.* var. *longum ceratoides*) és Bovet-4 jelű paprika (*C.a.* var. *abbreviatum pendens*) karotinoid-összetételének változását az érés során, és következtetéseket vontunk le a paprikakarotinoidok bioszintézisének mechanizmusára [1*-

5*]. Minden esetben hat érési fokozatban, hat különböző színű paprikát dolgoztunk fel. A későbbiekben elvégeztük még az ún. „kaliforniai paprika” (*C.a.* var. *grossum* cv. Kaliforniai wonder) különböző színű változatainak a karotinoidanalízisét is [6*].

Bár a paprikafajták különböznek alakjukban, nagyságukban, csípősségükben egymástól, a karotinoid-összetétel minden fajta esetében hasonló, és csak a paprika színétől függ. A három jellegzetes színű paprika, a zöld (bár ezt a klorofill okozza), a sárga és a piros szín eltérő és jellemző karotinoid-összetételt mutat. Természetesen az érés során a színek fokozatosan átalakulnak, és az ilyen átmeneti állapotokban az összetétel is sokkal bonyolultabb képet mutat. A három különböző karotinoid-összetételt három kromatogramon mutatom be. Mivel a disszertáció alapvetően nem analitikai jellegű, ezért ezekre az eredményekre csak röviden térek ki. A különböző paprikafajták részletes karotinoidanalízise, és az ebből levonható következtetések az [1*-6*] közleményekben találhatók meg részletesen. Mivel az analízisek és az új szerkezetű karotinoidok izolálása párhuzamosan történt, így az újonnan izolált vegyületek közül több is szerepel ezekben a közleményekben, esetenként azonban még hibás sztereokémiával és névvel.

Az éretlen (zöld) paprikában - függetlenül attól, hogy az érés végső stádiumában sárga, vagy piros színű-e - mindig a kloroplasztra jellemző karotinoidokat, luteint, β -karotint találunk fő komponensként. Kisebb mennyiségben a neoxantin és a 9-*cis*-neoxantin is megtalálható (12. ábra).

Az érés során, a klorofill eltűnésével a karotinoidok bioszintézise áttevődik a kromoplasztba [52]. A sárga paradicsompaprikában a bioszintézis a karotinoid-5,6-epoxidok képződésével befejeződik, violaxantin és anteraxantin a fő komponensek és ezek furanoidjai (5,8-epoxidok) is megtalálhatók (13. ábra). Az érett sárga paprikában - ellentétben a piros paprikával - nagyobb mennyiségben találhatók ϵ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok (α -karotin, α -kriptoxantin, lutein, lutein-5,6-epoxid) [1*].



12. ábra. Zöld (éretlen) paprika extraktumának kromatogramja [6*]

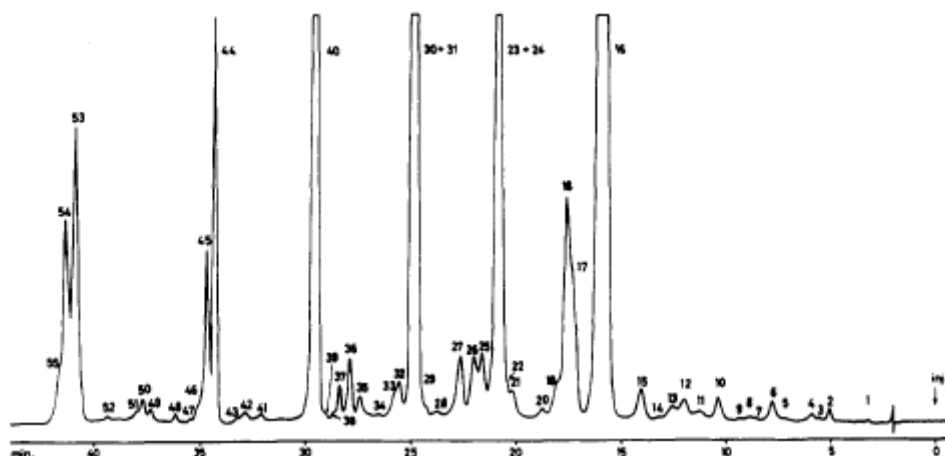
Azonosított csúcsok: **2:** neoxantin; **3:** neokróm; **4:** 9-*cisz*-neoxantin; **6:** violaxantin; **7:** luteoxantin; **8:** auroxantin; **9:** 9-*cisz*-violaxantin (violeoxantin); **10:** anteraxantin; **12:** mutatoxantin-epimer 2[#]; **13:** mutatoxantin-epimer 1[#]; **16:** lutein; **18:** 9(9')-*cisz*-lutein; **19:** 13(13')-*cisz*-lutein; **20:** α-kriptoxantin; **21:** β-kriptoxantin; **22:** α-karotin; **23:** β-karotin.

[#] a számok a CaCO₃ oszlopon való kötődés sorrendjét mutatják felülről lefelé.

A sárga paradicsompaprikában érés során végig nagyobb mennyiségben fordul elő lutein és α-kriptoxantin, mint zeaxantin és β-kriptoxantin. A teljesen érett paprikában már az α-karotin is nagyobb mennyiségben található, mint a β-karotin. A sárgára érő paprikában nem sikerült kimutatnunk sem κ-, sem 3,6-epoxi-β, illetve 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidokat. Így azt a következtetést vontuk le, hogy e két utóbbi végcsoport keletkezése összefüggésben van a κ-végcsoport bioszintézisével.

Klasszikus oszlopkromatográfia és HPLC kombinálásával sárga paradicsompaprikában kimutattuk a β-kriptoxantin-5,6-epoxid (a kriptokapszin prekursora) jelenlétét, de kis mennyisége miatt izolálni nem tudtuk [1*]. Ezért a későbbiekben előállítottuk a

szemisztetikus β -kriptoxantin-epoxidokat és megállapítottuk, hogy a sárga paprikában található β -kriptoxantin-epoxid a (3*S*,5*R*,6*S*)- β -kriptoxantin-5,6-epoxiddal azonos [7*].

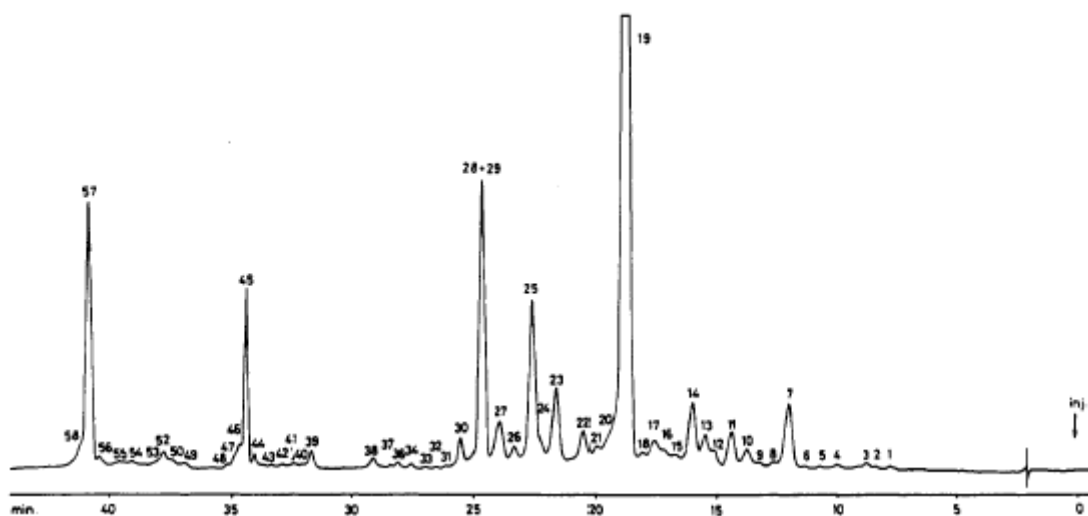


13. ábra. Érett sárga paradicsompaprika extraktumának kromatogramja [1*]

Azonosított csúcsok: 12: neoxantin+neokróm-epimer 3[#]; 14: neokróm-epimer 1[#] és 2[#]; 15: 9-*cisz*-neoxantin+neokróm-epimer 2[#]; 16: violaxantin; 17: luteoxantin-epimer 2[#]; 18: luteoxantin-epimer 1[#]; 19: auroxantin-epimer 2[#]; 20: auroxantin-epimer 3[#]; 21: auroxantin-epimer 1[#]; 22: 9-*cisz*-violaxantin; 23: lutein-5,6-epoxid; 24: anteraxantin; 25: 13-*cisz*-violaxantin; 26: mutatoxantin-epimer 2[#]; 27: mutatoxantin-epimer 1[#]; 30: lutein; 31: zeaxantin; 35: 9(9')-*cisz*-lutein; 36: 13(13')-*cisz*-lutein+9-*cisz*-zeaxantin; 37: 13-*cisz*-zeaxantin; 40: kantaxantin (standard); 42: β -kriptoxantin-5,6-epoxid; 44: α -kriptoxantin; 45: β -kriptoxantin; 50: mutatokróm; 53: α -karotin, 54: β -karotin; 55: *cisz*- β -karotin.

[#] a számok a CaCO₃ oszlopon való kötődés sorrendjét mutatják felülről lefelé.

A pirosra érő paprikák karotinoid-összetételét fajtától függetlenül hasonlóan találtuk, a karotinoid-tartalom és a karotinoidok egymáshoz viszonyított aránya természetesen eltérést mutatott (14. ábra).



14. ábra. Érett piros fűszerpaprika extraktumának kromatogramja [2*]

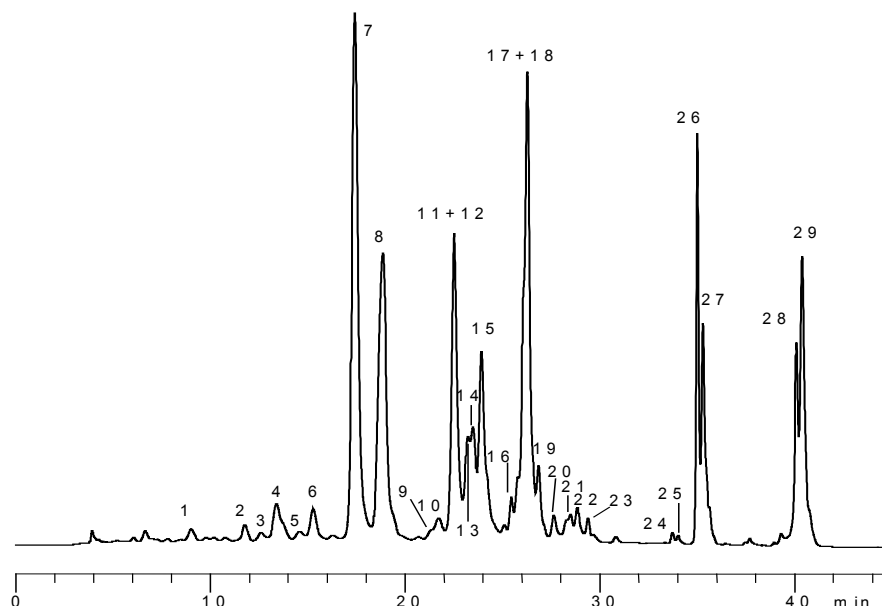
Azonosított csúcsok: 3: 5,6-diepikapszokarboxantin[#]; 4: 5,6-diepilatoxantin[#]; 7: kapszorubin; 9: 6-epikarboxantin; 10: kapszantin-5,6-epoxid; 11: 5,6-diepikarboxantin; 12: kapszokróm; 13: violaxantin; 14: kapszantin-3,6-epoxid; 15: 9-*cisz*-kapszorubin; 16: 13-*cisz*-kapszorubin; 17: cucurbitaxantin B; 18: luteoxantin; 19: kapszantin; 20: cikloviolaxantin; 22: anteraxantin; 23: mutatoxantin-epimer 2^{###}; 24: mutatoxantin-epimer 1^{###}; 25: cucurbitaxantin A; 26: 9(9')-*cisz*-kapszantin; 27: 13(13')-*cisz*-kapszantin; 28: lutein; 29: zeaxantin; 30: nigroxantin[#]; 33: 9(9')-*cisz*-lutein; 34: 9-*cisz*-zeaxantin; 35: 13(13')-*cisz*-lutein; 36: 13-*cisz*-zeaxantin; 39: kriptokapszin; 44: α-kriptoxantin; 45: β-kriptoxantin; 46-47: *cisz*-β-kriptoxantin; 56: α-karotin; 57: β-karotin; 58-*cisz*-β-karotin.

[#] csak később azonosítva

^{###} a számok a CaCO₃ oszlopon való kötődés sorrendjét mutatják felülről lefelé.

Az érett piros paprikákban a fő komponens kapszantin mellett nagyobb mennyiségben található zeaxantin, β-kriptoxantin, β-karotin és cucurbitaxantin A. Minor komponensként kapszorubin, violaxantin, anteraxantin, mutatoxantin, és kriptokapszin mellett számos 3,6-epoxi-karotinoidot, 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidot, nigroxantint és kapszantont, valamint *cisz*-izomereket mutattunk ki. Az érett piros paprikákban ε-végcsoportot tartalmazó karotinoidok (lutein, α-kriptoxantin, α-karotin) csak nyomokban fordulnak elő.

A vizsgált paprika fajták közül a Szentesi sárga paradicsompaprika sosem pirosodott meg - azaz nem képződtek ketocsoportot tartalmazó karotinoidok - a fűszerpaprika és a piros paradicsompaprika már az érés elején elkezdett pirosodni, a ketokarotinoidok képződése már ekkor megkezdődött. A Szentesi Kosszarvú paprikában és a Szentesi Bovet-4 jelű paprikában - amelyek az érés elején zöld vagy sárga színűek, és csak később kezdenek pirosodni - az érés kezdetén a sárga paprikára jellemző karotinoidok (lutein, neoxantin), és karotinoid-arányok (zeaxantin/lutein, β -karotin/ α -karotin, β -kriptoxantin/ α -kriptoxantin) találhatók meg, igen alacsony összkarotinoid-tartalom mellett. A pirosodás megindulása után növekszik meg nagyobb mértékben az összkarotinoid-tartalom, a karotinod-összetétel pedig megegyezik a piros fűszerpaprikára jellemző összetétellel [4*-5*].



15. ábra. Érett sárga kaliforniai paprika extraktumának kromatogramja [6*]

Azonosított csúcsok: 4: neoxantin; 6: 9-*cisz*-neoxantin; 7: violaxantin; 8: luteoxantin; 9: auroxantin-epimer 2[#]; 10: auroxantin-epimer 1[#]; 12: anteraxantin; 14: mutatoxantin-epimer 2[#]; 15: mutatoxantin-epimer 1[#]; 17: lutein+zeaxantin; 21: 9(9')-*cisz*-lutein; 22: 13(13')-*cisz*-lutein+9-*cisz*-zeaxantin; 23: 13-*cisz*-zeaxantin; 24: β -kriptoxantin-5,6-epoxid; 26: α -kriptoxantin; 27: β -kriptoxantin; 28: α -karotin; 29: β -karotin

[#] a számok a CaCO₃ oszlopon való kötődés sorrendjét mutatják felülről lefelé

A későbbiek során megvizsgáltuk a különböző színű, ún. kaliforniai paprika karotinoid összetételét is [6*]. A zöld és piros színű paprikák az előzőekben említetthez hasonló összetételt mutattak. Találtunk egy lila színű variánst is, ezt a színt azonban a paprika

bőrében lévő antocianidin festékek okozzák, a karotinoid-összetétel a zöld színű paprikáéhoz hasonlított a legjobban. A sárga kaliforniai paprikában néhány új, eddig ismeretlen csúcs tűnt fel (15. ábra). Diódasoros detektor alkalmazásával, és az extraktum redukciójával ezeket a csúcsokat (peak 16, 19, 20) feltételelesen, mint apo-karotinoidokat azonosítottuk. A pontos szerkezetazonosításhoz még további hosszadalmas vizsgálatokra van szükség, így tehát ebben a dolgozatban ezek nem szerepelnek. Időközben japán kutatók piros paprikából izolált apo-karotinoidok szerkezetazonosításáról számoltak be [59].

Végül megvizsgáltuk az erős paprikák karotinoid-összetételét is. Az éretlen és érett cseresznyepaprika, és pfefferoni karotinoid-összetétele is megfelelt az előzőekben leírtaknak. Az érett piros paprika extraktumokban kimutatható volt az 5,6-diepikarpoxantin, a kapszantin-3,6-epoxid, a nigroxantin és a cucurbitaxantin A is. Nem mutatott eltérést a karotinoid-összetételben az érett chili paprika sem. Mivel ezeket az eredményeket még nem közöltük, így csak a teljesség kedvéért emlitem meg őket.

Az elmúlt 10 évben nagyon sok közlemény jelent meg, amely különböző piros paprikafajták karotinoidanalízisével foglalkozott [60-69]. Terjedelmi okokból ezek részletes ismertetésére itt lehetetlen kitérni. Meg kell jegyezni, hogy egyetlen kromatográfiás rendszer sem közelítette meg az általunk elért elválasztást. Nagyon kevés azon publikációk száma is, amelyben 3,6-epoxi-vegyületek azonosításáról számoltak be [68,69], 3,5,6-trihidroxi-karotinoidokat pedig munkacsoportunkon kívül senki sem azonosított, vagy izolált paprikából.

2. Izolálás, szerkezet- és konfigurációmeghatározás

Az ismert szerkezetű karotinoidok teljes jellemzése vagy az ismeretlen szerkezetű karotinoidoknak a szerkezetazonosítása („*structure elucidation*”) – beleértve a kiralitás és az *E/Z* konfiguráció meghatározását is – a spektroszkópai technikák széles skálájának a használatát, továbbá a származékképzési reakciók elvégzését is igényli [70].

Egy ismeretlen karotinoid szerkezetazonosításában a kromatográfiás tisztítás, majd a kristályosítás az első alapvető lépés. A kromatográfiás viselkedés egyúttal felvilágosítást ad a karotinoid polaritására is. A már ismert karotinoidok polaritásához való viszonyítás alapján a vegyület feltételesen besorolható a karotinok, monoolok, diolok vagy a polárosabb karotinoidok csoportjába. A megoszlás 10% víztartalmú metanol és hexán között, további adalékot jelenthet a vegyület polaritására.

A műszeres mérések közül az első, könnyen kivitelezhető és igen kis anyagmennyiséget igénylő módszer az UV/VIS spektroszkópia. Az abszorpciós maximumok helyei és a spektrum finomszerkezete felvilágosítást ad a kromofórban lévő konjugált kettőskötések számáról. A konjugált keto-csoport rendszerint batokrómm eltolódást eredményez, miközben a spektrum finomszerkezete csökken. A *cisz*-izomerek fő maximumai karakterisztikus hipszokrómm eltolódást mutatnak, és az UV tartományban is megjelenik az ún. "*cisz*-peak".

A tömegspektrometriás mérésből kapható legfontosabb információ a vegyület molekulatömege, melyből az összegképletre, és a molekulában jelenlévő oxigén atomok számára lehet következtetni. A karakterisztikus fragmentumok felvilágosítást adnak egyes funkciók csoportok jelenlétére. Tömegspektrometriával lehet megerősíteni egyes származékképzési reakciók (redukció, acetilezés, stb.) végbemenetelét is.

Az NMR vizsgálatok tekinthetők a legalapvetőbb vizsgálatoknak a szerkezetazonosításban. A részletes ¹H- és ¹³C NMR vizsgálatok segítségével – beleértve a legmodernebb kétdimenziós technikákat is – a karotinoidok sztereokémiája is tisztázható. A kétdimenziós technikák alkalmazásának azonban határt szabhat a mérésekhez szükséges anyagmennyiség hiánya, illetve ha a hosszú mérési idő alatt a karotinoid degradálódik.

Az infravörös spektroszkópia csak a jellemző funkciók csoportok jelenlétének kimutatására alkalmas, de helyzetük meghatározására nem, így a karotinoidok szerkezetének vizsgálatában nem terjedt el ez a módszer. Tovább csökkentette jelentőségét, hogy 0,1-0,2 mg anyagmennyiségből ma már jó minőségű proton spektrum nyerhető, amely a karotinkémikus számára több információt tartalmaz, mint az IR spektrum. Ennek ellenére, mivel az FT-IR technika lehetővé tette igen kis anyagmennyiségekből IR

felvételek készítését, az elmúlt években elvégeztük számos, a kollekciónkban rendelkezésre álló karotinoid infravörös spektroszkópai vizsgálatát [15[#], 18[#]].

Mivel számos karotinoid kiralitása és cirkuláris dikroizmus spektruma ismert, így az összehasonlító CD spektroszkópia nagy segítséget nyújt az abszolút konfiguráció kijelölésében. A karotinoidok végcsoportjainak Cotton effektusa összeadódik [71], így aszimmetrikus karotinoidok esetén a gyenge Cotton hatással rendelkező csoportok jele nem érvényesül, ami megnehezíti az abszolút konfiguráció meghatározását.

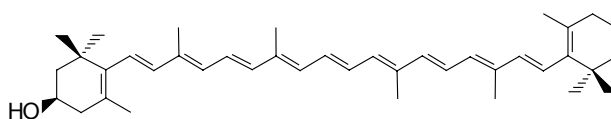
A származékképzési reakciók [72] közül az acetilálás és szililezés a primer és szekunder hidroxilcsoportok kimutatására alkalmas, míg a tercier hidroxilcsoportok nem acetilezhetők, csak szililezhetők. A konjugált karbonilcsoport redukciója (10. ábra) megnöveli a polaritást, és az UV/VIS spektrumok alacsonyabb hullámhosszak felé tolódnak el, egyben a finomszerkezet is nő. Ugyancsak a kromofór rövidülésével jár a karotinoid-5,6-epoxidok sav hatására bekövetkező ún. furanoid átrendeződése is (9. ábra). Ez utóbbi két reakció küvetta méretben elvégezhető, és így nagyon kis anyagmennyiségből, gyorsan kimutathatók ezek a funkciós csoportok.

Munkánk során a fent említett módszereket alkalmaztuk a természetes forrásból, vagy a reakcióelegyből izolált karotinoidok szerkezetazonosítására. Az izolált és kristályosított vegyületeket minden esetben spektroszkópai módszerekkel (UV/VIS, MS, NMR, CD) jellemeztük. Az UV/VIS spektrum, a származékképzési reakciók és a tömegspektrum ismeretében többnyire ki lehetett jelölni a szerkezetet, amelyet végsősoron NMR spektroszkópiával bizonyítottunk. Abban az esetben, ha 1 mg-nál kisebb anyagmennyiség állt rendelkezésünkre, általában csak ¹H-NMR, esetenként ¹H,¹H-COSY méréseket tudtunk végezni. Nagyobb anyagmennyiségek esetén a konfigurációk egyértelmű kijelöléséhez T-ROESY, NOE, ¹³C, DEPT-135, HMBC, inverz HMQC, HSQC stb. mérések elvégzésére is lehetőség nyílt. Minden egyes izolált vegyület részletes NMR vizsgálatára dolgozatomban nem térek ki, azok a mellékletként megadott közleményekben a proton és szén aszignációkkal együtt megtalálhatók. Ugyancsak e közleményekben megtalálható az összes egyéb spektroszkópai adat (UV/VIS, MS, CD) is amellyel az izolált vegyületeket jellemeztük, ezeket a dolgozatban nem részletezem, csak utalok a vizsgálatok elvégzésére. Minden esetben elvégeztük a vegyületek CD spektroszkópai vizsgálatát is, számos esetben azonban az NMR vizsgálatokra kellett hagyatkoznunk az abszolút konfigurációk kijelölésénél.

2.1. β -Kriptoxantin-epoxidok előállítása

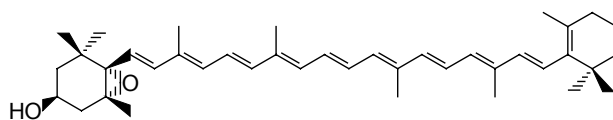
Ahogy az előző fejezetben említettem, a sárga paradicsompaprika extraktumában klasszikus oszlopkromatográfia és HPLC kombinálásával kimutattuk a β -kriptoxantin-5,6-epoxid (a kriptokapszin prekursora) jelenlétét, de kis mennyisége miatt izolálni nem tudtuk [1*]. Mivel a β -kriptoxantin-5,6-epoxid teljes szerkezet leírása még nem történt meg, elhatároztuk, hogy előállítjuk a szemisztetikus vegyületet, β -kriptoxantin monoperoxi-ftálsavval történő reakciójával. A karotinoid-5,6-epoxidok monoperoxi-ftálsavval történő előállítása jól ismert reakció a karotinoidkémiában [73]. A reakció során kétféle sztereoizomer, az (5*R*,6*S*)-, illetve az (5*S*,6*R*)-epimer keletkezik. A reagens savas jellege miatt azonban mindig keletkeznek karotinoid-5,8-epoxidok (furanoidok) is, melyek a céltermékek izolálását megnehezítik.

Csak egy epoxidálható végcsoportot tartalmazó (pl. kapszantin, lutein), vagy szimmetrikus (pl. zeaxantin) karotinoidok esetén a keletkező két vagy három epimer elkülönítése többnyire nem okoz problémát. Az általunk kiindulási anyagnak választott β -kriptoxantin nem szimmetrikus szerkezetű, és két epoxidálható β -végcsoportot tartalmaz. Így a reakció során elvileg négy monoepoxid epimer (5*R*,6*S*, 5*S*,6*R*, 5'*R*,6'*S* és 5'*S*,6'*R*), valamint négy diepoxid-epimer (5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*, 5*R*,6*S*,5'*S*,6'*R*, 5*S*,6*R*,5'*R*,6'*S* és 5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*) keletkezhet. Ezenkívül, mindegyik 5,6-epoxi-végcsoportból további két furanoid-epimer képződhet, *E-Z*-izomerizáció is lejátszódhat, amely így egy rendkívül komplex rendszert eredményez. Ezért nem is tűztük ki célul az összes lehetséges vegyület izolálását, célunk elsősorban a természetben is előforduló (3*S*,5*R*,6*S*)- β -kriptoxantin-5,6-epoxid izolálása és szerkezetének meghatározása volt.

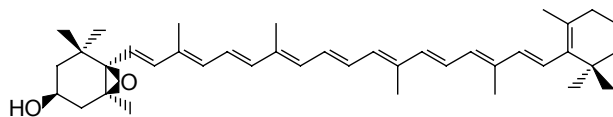


β -Kriptoxantin (3)

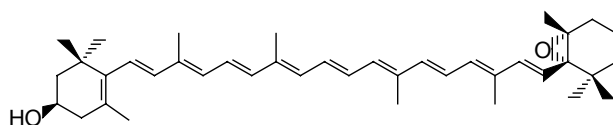
270 mg β -kriptoxantin-acetát éteres oldatát reagáltattuk frissen készített monoperoxi-ftálsav oldattal, az epoxidálás előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követtük. A reakcióelegyet feldolgozva, majd elszappanosítva, ismételt preparatív oszlopkromatográfiát alkalmazva, három β -kriptoxantin-monoepoxidot (**I-III**) és két diepoxidot (**IV-V**) izoláltunk kristályos állapotban, és határoztuk meg konfigurációjukat [7*].



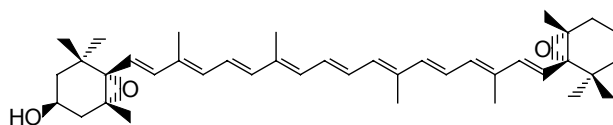
(3*S*,5*R*,6*S*)-β-Kriptoxantin-5,6-epoxid (I)
(3*S*,5*R*,6*S*)-5,6-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3-ol



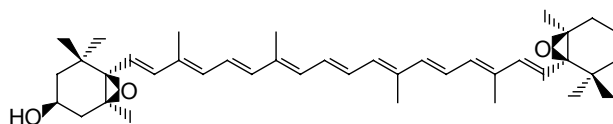
(3*S*,5*S*,6*R*)-β-Kriptoxantin-5,6-epoxid (II)
(3*S*,5*S*,6*R*)-5,6-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3-ol



(3*R*,5'*R*,6'*S*)-β-Kriptoxantin-5',6'-epoxid (III)
(3*R*,5'*R*,6'*S*)-5',6'-epoxi-5',6'-dihidro-β,β-karotin-3-ol

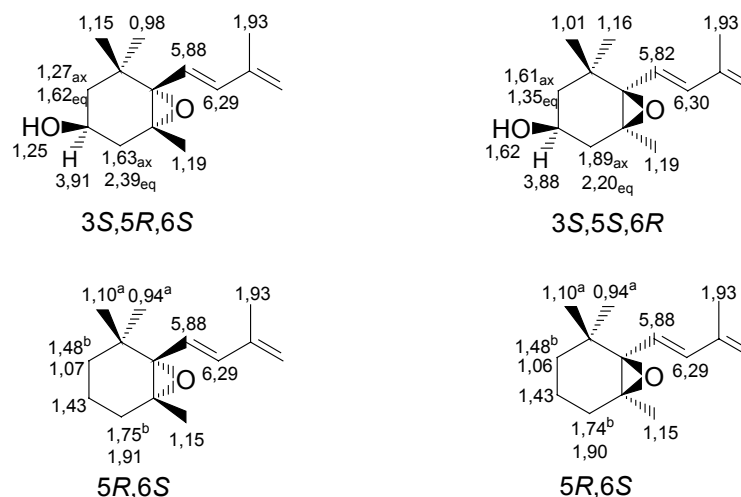


(3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-β-Kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (IV)
(3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-3-ol

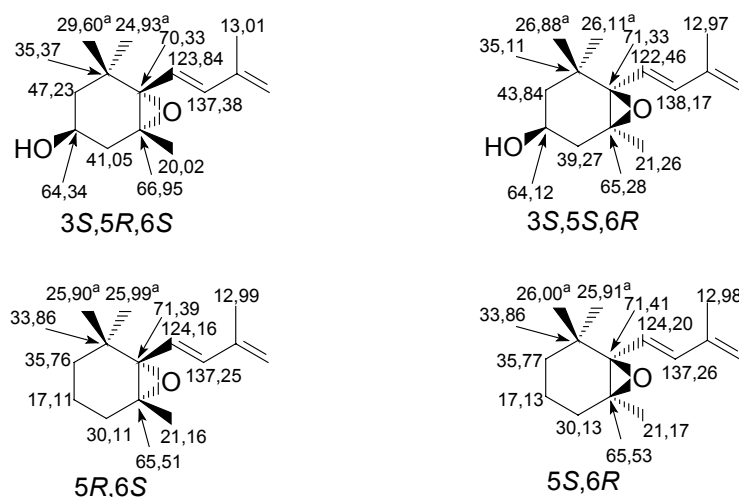


(3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-β-Kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (V)
(3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-3-ol

Az izolált vegyületek szerkezet- és konfigurációmeghatározása ^1H -, ^{13}C -NMR, UV-VIS, CD spektroszkópiával és tömegspektrometriával történt. A 3-hidroxi-5,6-epoxi-β-végcsoport abszolút konfigurációja egyértelműen meghatározható volt az ^1H -NMR adatok alapján (16. ábra). A (3*S*,5*R*,6*S*)-β-kriptoxantin-5,6-epoxid (I) az NMR mérés során a deuterokloroformos oldatban átalakult a megfelelő 5,8-furanoid-epimerekké, és így ^1H , ^1H -COSY és ^{13}C -NMR méréseket nem tudtunk végezni. A proton felvételek, illetve a furanoid-epimer elegy spektruma azonban igazolta a konfigurációt.



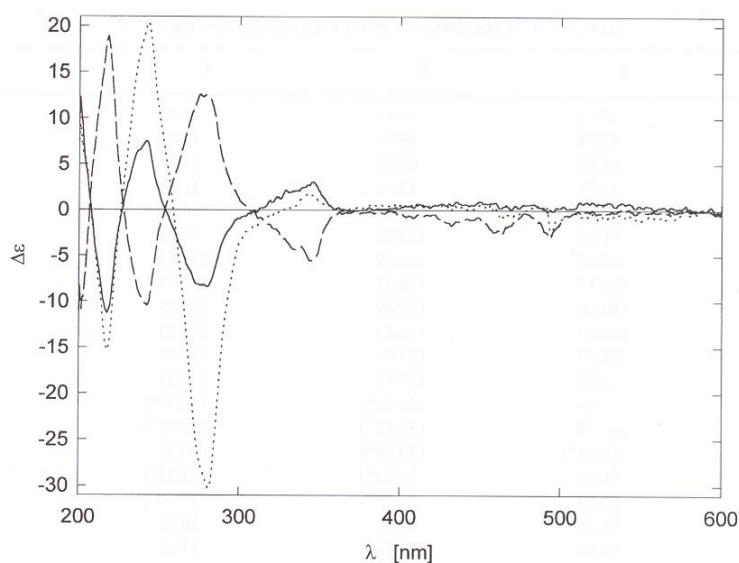
16. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoportok ^1H -NMR adatai (a felcserélhető; b az axiális és ekvatoriális pozíció nem adható meg) [7*]



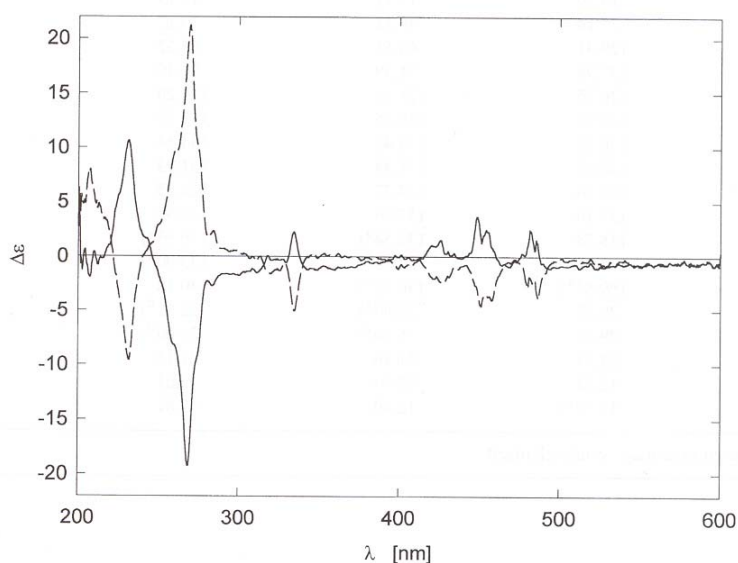
17. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoportok ^{13}C -NMR adatai (a felcserélhető) [7*]

További bizonyítékot adtak a (3S,5R,6S)- (**I**) és a (3S,5S,6R)-β-kriptoxantin-5,6-epoxidok (**II**) konfigurációjára a tükörképi CD görbék (18. ábra). Bonyolultabb feladat volt a hidroxilcsoportot nem tartalmazó oldalon az 5,6-epoxi-csoport konfigurációjának kijelölése. Míg a 3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoport esetén a 7-H dublett jele eltér a *szün*- és *anti*-epoxid esetén, addig a hidroxilcsoportot nem tartalmazó végcsoport esetén nincs szignifikáns különbség [74,75]. Így a konfiguráció meghatározást a CD spektrumok segítségével tudtuk elvégezni. A β-kriptoxantin (**3**) és a (3S,5R,6S)-β-kriptoxantin-5,6-epoxid (**I**) CD görbéjének összege különböző intenzitású, de hasonló lefutást mutat mint az 5',6'-β-kriptoxantin-epoxidé (**III**), amely ez utóbbinak az (5'R,6'S) konfigurációjára utal.

A diepoxidok esetén a két teljesen tükörképi CD görbe szintén megerősíti a $(3S,5R,6S,5'R,6'S)$ (IV), illetve a $(3S,5S,6R,5'S,6'R)$ (V) konfigurációt (19. ábra).



18. ábra. A β -kriptoxantin-monoepoxidok (I (—); II (---); III (...)) CD spektruma EPA-ban (EPA: Et_2O /izo-pentán/ EtOH 5:5:2 elegye) [7*]



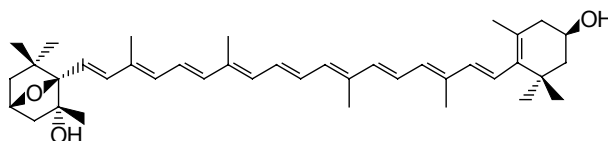
19. ábra. A β -kriptoxantin-diepoxidok (IV (—); V (---)) CD spektruma EPA-ban [7*]

A $(3S,5R,6S)$ - β -kriptoxantin-5,6-epoxidot (I) különböző rendszereken együtt-kromatografálva a sárga paradicsompaprikából származó vegyülettel, a kettő azonosságát állapítottuk meg, amely megerősíti azt a megfigyelést, hogy a természetben mindig a $(3S,5R,6S)$ konfigurációval rendelkező karotinoid-5,6-epoxidok fordulnak elő.

Munkánk további részében célul tűztük ki a piros paprikában kis mennyiségben jelenlévő, eddig még nem azonosított karotinoidok izolálását. Alapul véve a korábban felvázolt [55] bioszintézis sémát, feltételeztük, hogy további 3,6-epoxi- β -, illetve 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidoknak kell jelen lenniük a piros paprika extraktumában. Ezen kívül minden piros paprika extraktumban feltűnt egy jellegzetes csúcs (14. ábra: peak 30), melynek izolálását szintén célul tűztük ki.

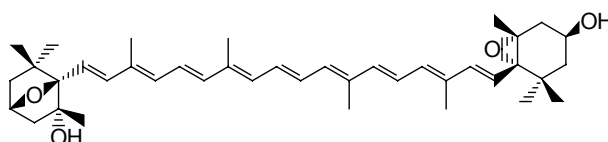
2.2. 3,6-Epxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok

Az első 3,6-epoxi-végcsoportot (7-oxabicyclo[2.2.1]heptil) tartalmazó karotinoidok, az eutreptiellanone, az α -cryptoeutreptiellanone és a β -cryptoeutreptiellanone tengeri algából (*Eutreptiella gymnastica*) való izolálásáról a nyolcvanas évek közepén számoltak be Liaaen-Jensen és munkatársai [76-78]. 1986-ban, gyakorlatilag egy időben közölték Matsuno és munkatársai [56] a cucurbitaxantin A (4) és cucurbitaxantin B (5) sütőtökből, Szabolcs és munkatársai [55] pedig a kapszantin-3,6-epoxid (6) és a cucurbitaxantin A (4) piros paradicsompaprikából való izolálását és szerkezetazonosítását.



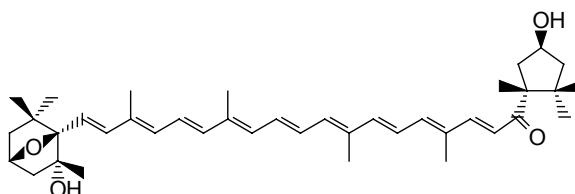
Cucurbitaxantin A (4)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro- β , β -karotin-5,3'-diol



Cucurbitaxantin B (5)

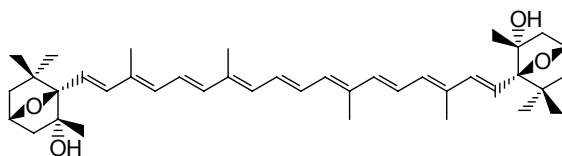
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-3,6,5',6'-diepxi-5,6,5',6'-tetrahidro- β , β -karotin-5,3'-diol



Kapszantin-3,6-epoxid (6)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-5,3'-dihidroxi- β , κ -karotin-6'-on

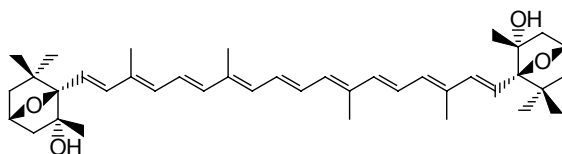
1990-ben Gmünder és Eugster [79] arról számoltak be, hogy megkísérelték a cikloviolaxantin (7) totálszintézisét, a szintézis utolsó lépése során azonban nem a kívánt vegyület keletkezett, és így nem tudták előállítani.



Cikloviolaxantin (7)

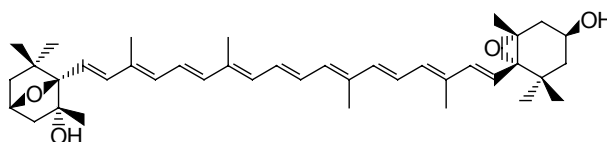
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-3,6,3',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-5,5'-diol

1990 őszén, 25 kg piros fűszerpaprika feldolgozása során kb. 1 mg-nyi mennyiségben egy új vegyületet sikerült izolálnunk. A vegyület UV/VIS spektruma, kémiai reakciói és tömegspektruma alapján szimmetrikus szerkezetű vegyületre gondoltunk, mely az Eugster által leírt cikloviolaxantinnak (7) felelt meg. Mivel akkor Magyarországon nem találtunk NMR-laboratóriumot, amely ilyen anyagmennyiségből a mérést elvégezte volna, a Zürichi Egyetem Szerves Kémiai Intézetében Eugster és munkatársai segítségével történtek meg az NMR és CD-mérések. A kis anyagmennyiség csak ¹H-NMR méréseket tett lehetővé, amely azonban egyértelműen igazolta a ciklovioxantin (VI) szerkezetét és konfigurációját [8*]. Ugyanekkor izoláltunk cucurbitaxantin B-t (VII) igen kis mennyiségben, valamint cucurbitaxantin A-t (VIII) is, azonosításuk azonban ekkor csak tömeg UV/VIS és CD spektrumuk (20. ábra), illetve kémiai reakcióik alapján történt meg.



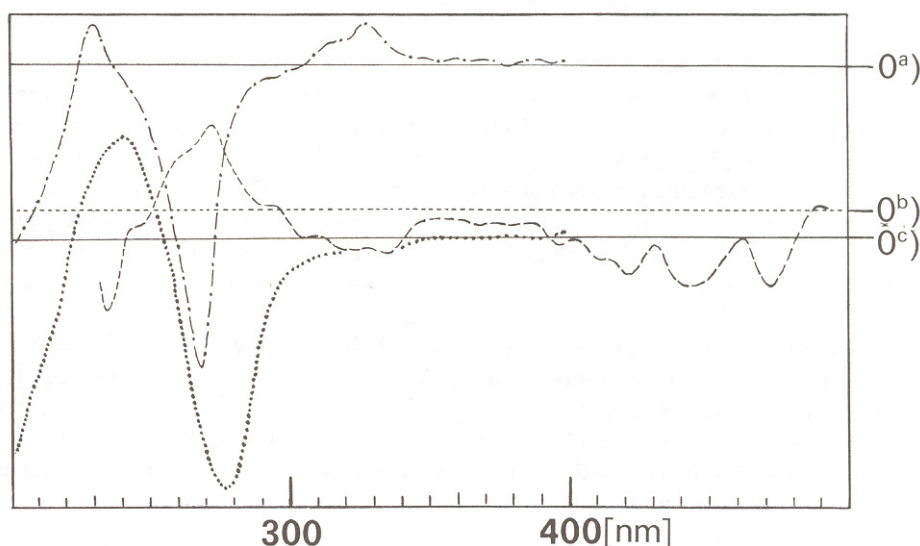
Cikloviolaxantin (7 = VI)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-3,6,3',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-5,5'-diol



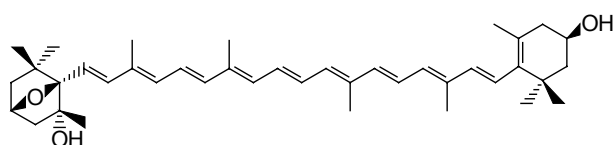
Cucurbitaxantin B (5 = VII)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-3,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-5,3'-diol

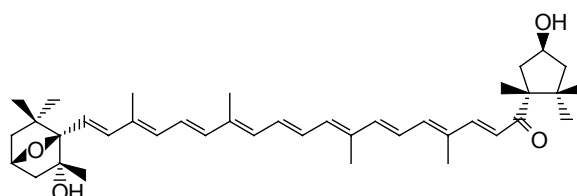


20. ábra. A cikloviolaxantin (VI) (---), cucurbitaxantin B (VII) (-.-.-) és cucurbitaxantin A (VIII) (.....) CD spektruma [θ^*]; a) nulla vonal VII-ra MeOH-ban, b) VI-ra EPA-ban, c) VIII-ra MeOH-ban.

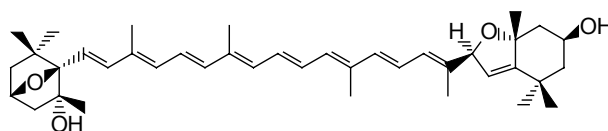
A későbbiek során módszert dolgoztunk ki a 3,6-epoxi-karotinoidok kinyerésére. Ez a módszer frakcionált kristályosításon, illetve petroléter és 10% víztartalmú metanol közti megoszláson alapul. Így a kevésbé poláros 3,6-epoxi-karotinoidokat sikerült feldúsítani, és az igen kis mennyiségben jelenlévő komponenseket is izolálni. Piros fűszerpaprikából a következő 3,6-epoxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidokat izoláltuk, és végeztük el a teljes szerkezet- és konfigurációmeghatározásukat (^1H - és ^{13}C -NMR, CD, MS): cucurbitaxantin A (VIII), cucurbitaxantin B (VII), cikloviolaxantin (VI), kapszantin-3,6-epoxid (IX) és cucurbitakróm epimerek (X-XI) [9*].



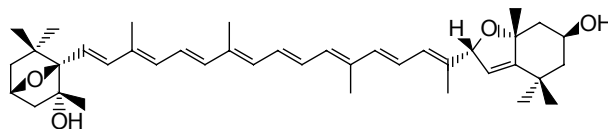
Cucurbitaxantin A (4 = VIII)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro- β , β -karotin-5,3'-diol



Kapszantin-3,6-epoxid (6 = IX)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-5,3'-dihidroxi- β , κ -karotin-6'-on



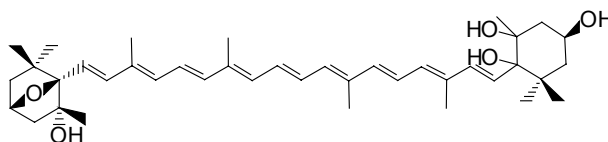
Cucurbitakróm epimer 1 (X)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,8'*S*)-3,6,5',8'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahydro-β,β-karotin-5,3'-diol

Cucurbitakróm epimer 2 (XI)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,8'*R*)-3,6,5',8'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahydro-β,β-karotin-5,3'-diol

0,1 mg-nál kisebb mennyiségben kaptunk 3,6-epoxi-5,6,5',6'-tetrahydro-β,β-karotin-5,3',5',6'-tetrol-t (XII) is, e vegyületet csak UV/VIS, CD és tömegspektruma alapján tudtuk azonosítani.



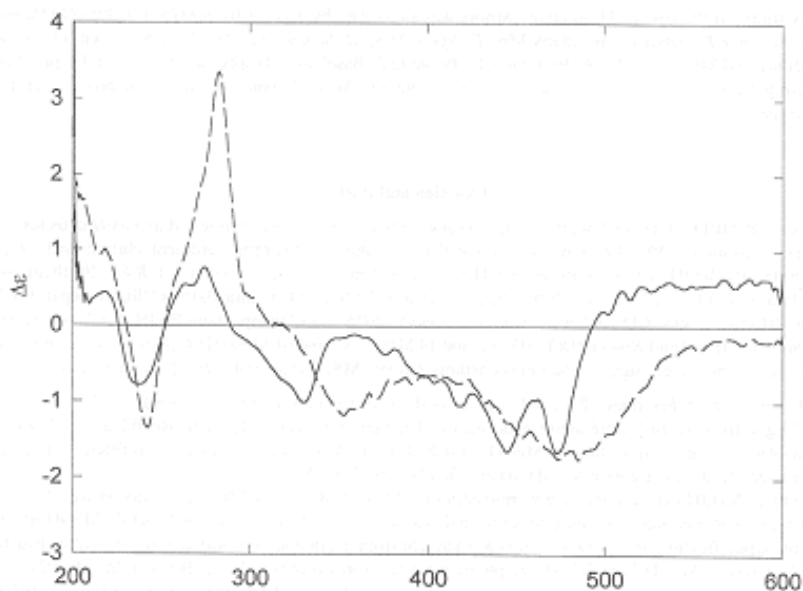
3,6-epoxi-5,6,5',6'-tetrahydro-β,β-karotin-5,3',5',6'-tetrol (XII)

NMR méréseink alapján (21. ábra) helyesbítettük Matsuno 1986-ban közölt [56], a 3,6-epoxi-β-végcsoportra vonatkozó adatait.

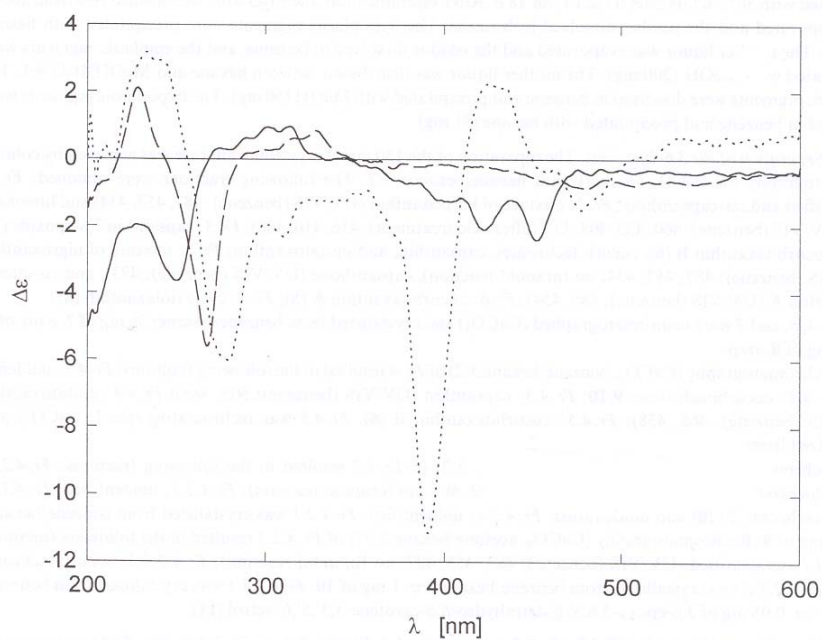
21. ábra. A 3,6-epoxi-β-végcsoport ^1H - és ^{13}C -NMR adatai [9*]

A CD vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a 3,6-epoxi-végcsoport csak gyenge Cotton-effektussal rendelkezik, így a CD-spektrumok lefutását nem szimmetrikus karotinoidok esetén a másik végcsoport szabja meg (22-23. ábra).

Eugster [79] javaslatát ekkor még elfogadva azt feltételeztük, hogy a 3,6-epoxi-karotinoidok képződése a karotinoid-5,6-epoxidokból 3,5,6-trihidroxi-karotinoidokon keresztül történik. Ezt a nézetünket később módosítottuk (2.3. fejezet).



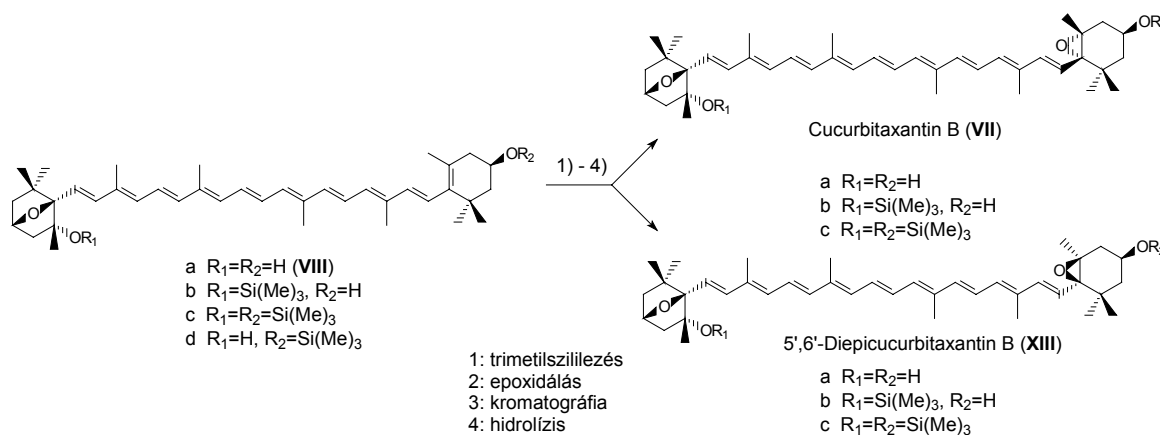
22. ábra. Kapszantin-3,6-epoxid (IX) (---) és ciklovloxantin (VI) (—) CD spektruma; oldószer: EPA [9*]



23. ábra. Cucurbitaxantin A (VIII) (...), cucurbitaxantin B (VII) (----) és cucurbitakróm epimer I (X) (—) CD spektruma; oldószer: EPA [9*]

Vizsgálataink kezdetén még nem tudtunk megfelelő mennyiségben cucurbitaxantin B-t (VII) izolálni, így elhatároztuk, hogy cucurbitaxantin A (VIII) epoxidálásával előállítjuk a szemisztetikus termékeket (24. ábra).

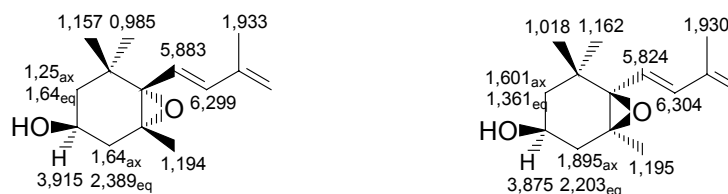
Az epoxidálási reakciónál meg kell védeni a hidroxilcsoportokat. Mivel a karotinoidoknak csak a primer és szekunder hidroxilcsoportjai acetilezhetőek, a tercierek nem, így más védőcsoportot kellett találnunk, hogy az 5-hidroxi-csoportot is meg tudjuk védeni. Ezért először a cucurbitaxantin A-ból (VIII) trimetilkloroszilánnal 5,3'-O-bisztrimetilszilil-cucurbitaxantin A-t állítottunk elő, majd éteres oldatban monoperoxid-savval reagáltattuk [10*]. A reakció lefolyását vékonyréteg-kromatográfiával követtük. A reakcióelegy megbontása után a szililezett termékeket preparatív oszlop-kromatográfiával választottuk szét. A keletkezett cucurbitaxantin B epimerek (VII, XIII) trimetilszilil származékait ezután hidrolizáltuk, és az elegy ismételt kromatografálásával kaptuk a (3'S,5'R,6'S)- és (3'S,5'S,6'R)-konfigurációjú cucurbitaxantin B-t (VII) és 5',6'-diepicucurbitaxantin B-t (XIII). Melléktermékként számos monoszilil terméket is kaptunk, amelyeket UV/VIS és tömegspektrometriával azonosítottunk.



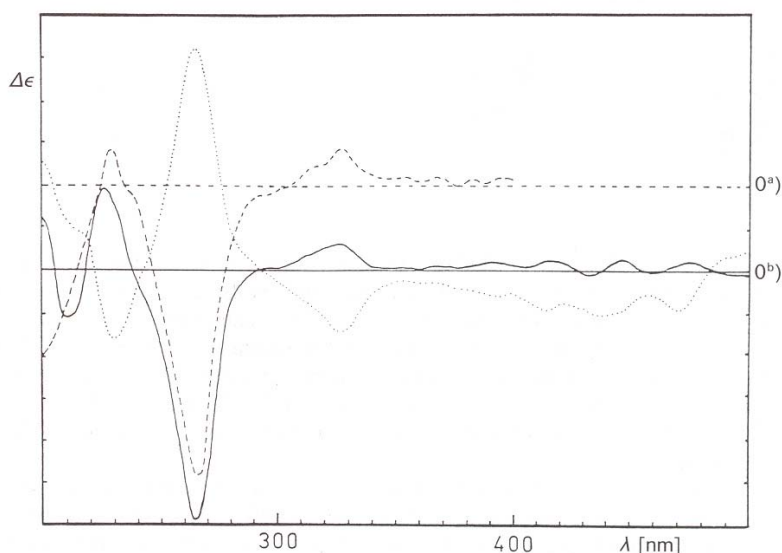
24. ábra. Cucurbitaxantin B epimerek előállítása

A céltermékekből csak 1 mg-nál kisebb mennyiségeket sikerült kristályosan előállítanunk, így csak 1H -NMR vizsgálatok elvégzésére volt mód a Zürichi Egyetem Szerves Kémiai Intézetében (25. ábra). Az NMR vizsgálatok alapján (H-C(7'), Me(16') és Me(17')) egyértelműen hozzárendelhető volt a 3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoportokhoz a (3'S,5'R,6'S)- (*anti*-) és (3'S,5'S,6'R)- (*szün*-) konfiguráció. Az ellentétes konfigurációkat jól mutatta a teljesen tükröképi CD görbe is (26. ábra), amely egyben azt is megerősítette, hogy a paprikából izolált cucurbitaxantin B (VII) is (3'S,5'R,6'S)-konfigurációval rendelkezik [10*].

Itt említem meg, hogy munkánk során előállítottuk a cikloviolaxantin (VI) és a cucurbitaxantin A (VIII) *cis*-izomerjeit is [2[#], 3[#]]. Mivel az izomerizációs folyamatok vizsgálata nem tartozik az értekezés tárgykörébe, így nem részletezem az e téren elért eredményeinket.



25. ábra. A cucurbitaxantin B (VII) és az 5,6-diepicucurbitaxantin B (XIII) 5,6-epoxi-végcsoportjának ¹H-NMR adatai [10*]



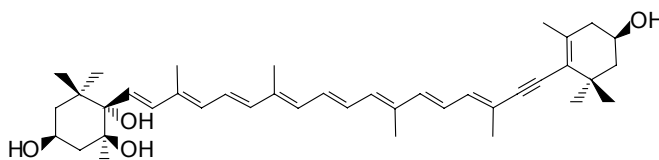
26. ábra. A szemisztetikus (—) és a paprikából izolált (---) cucurbitaxantin B (VII) és az 5,6-diepicucurbitaxantin B (XIII) (·····) CD spektruma; a) nulla vonal a paprikából izolált vegyületre MeOH-ban, b) nulla vonal a szemisztetikus vegyületekre EPA-ban

2.3. 3,5,6-Trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidok

A 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidok különböző gyümölcsökben való jelenlétéről már a 70-es évek elején beszámoltak Gross és munkatársai [80]. A szerkezetazonosítást nem végezték el, csupán UV-VIS és tömegspektrometriai adatok alapján feltételezték a szerkezetet. 1977-ben izolálták *Euglena gracilis*-ből norvég kutatók a heteroxantint (8), melyben a 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoport konfigurációját (3*S*,5*S*,6*S*)-nek írták le [81]. Eugster és munkatársai karpoxantint (9)

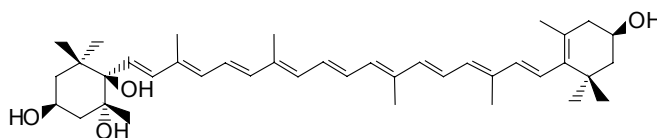
izoláltak érett csipkebogyóból (*Rosa pomifera*) [82], karpoxantint (**9**) és 6-epikarpoxantint (**10**) tigris liliom (*Lilium tigrinum*) szirmából és porzójából [83], latoxantint (**11**) sárga rózsza (*Rosa foetida*) szirmából [84], valamint neoflort (**12**) és 6-epineoflort (**13**) a *Trollius europaeus* nevű alpesi növény szirmából [85].

A karpoxantin (**9**), latoxantin (**11**), és neoflor (**12**) 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportjára a (3*S*,5*R*,6*R*), míg a 6-epi-vegyületekre (**10**, **13**) a (3*S*,5*R*,6*S*)-konfigurációt adták meg.



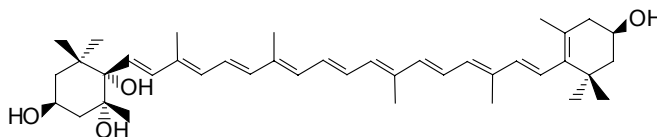
Heteroxantin (**8**)

(3*S*,5*S*,6*S*,3'*R*)-7',8'-didehidro-5,6-dihidro- β , β -karotin-3,5,6,3'-tetrol



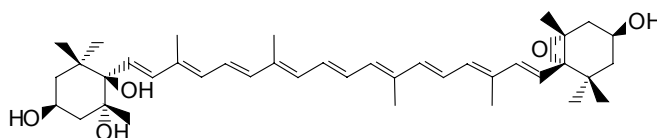
Karpoxantin (**9**)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-5,6-dihidro- β , β -karotin-3,5,6,3'-tetrol



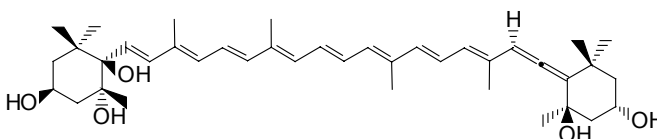
6-Epikarpoxantin (**10**)

(3*S*,5*R*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro- β , β -karotin-3,5,6,3'-tetrol



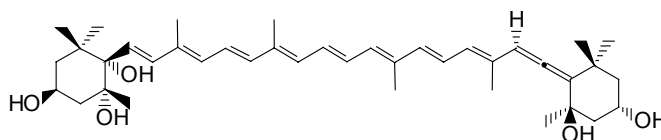
Latoxantin (**11**)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-5',6'-epoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- β , β -karotin-3,5,6,3'-tetrol



Neoflor (**12**)

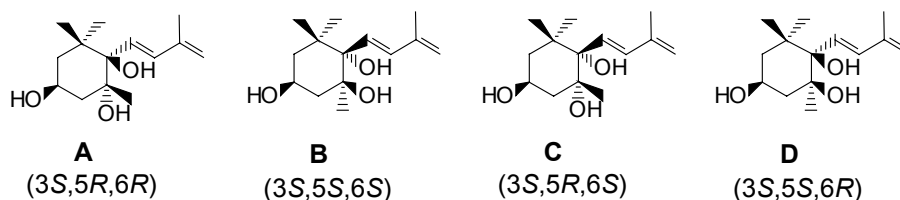
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-6',7'-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro- β , β -karotin-3,5,6,3',5'-pentol



6-Epineoflor (13)

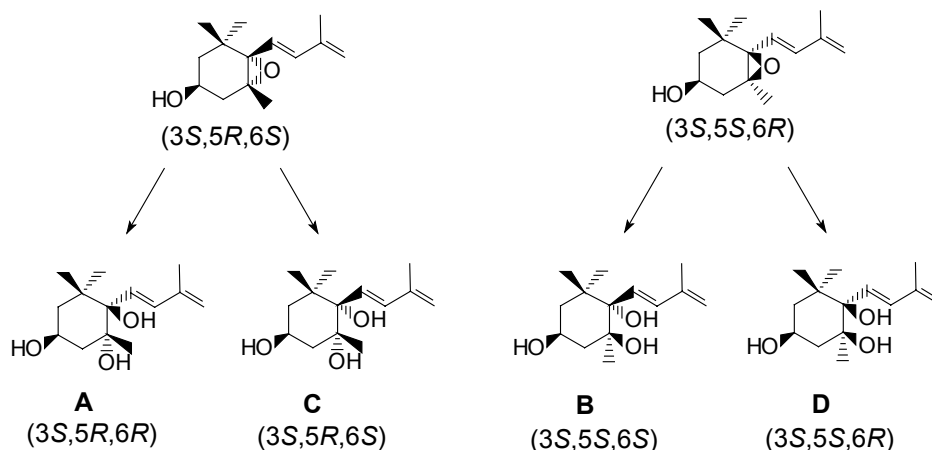
(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-6',7'-didehidro-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-3,5,6,3',5'-pentol

A 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportok abszolút konfigurációját Eugster és munkatársai tisztázták [57,86]. Előállították a négy lehetséges végcsoportot (**A-D**) (27. ábra) tartalmazó jonon-származékokat és röntgendiffrakciós módszerrel meghatározták az abszolút konfigurációkat. A kapott végcsoportok felhasználásával előállították a szimmetrikus szerkezetű szemiszintetikus mactraxantint is.



27. ábra. A négy lehetséges 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoport [86]

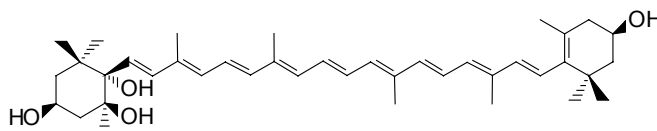
Elvégezték a karotinoid-5,6-epoxidok savkatalizálta gyűrűnyitását is [82]. A természetben előforduló *anti*- (3*S*,5*R*,6*S*)-anteraxantinból kiindulva a megfelelő mutatoxantin-epimereken kívül kis mennyiségben karpoxantint (**9**) és 6-epikarpoxantint (**10**) kaptak. A szemiszintetikus *szün*- (3*S*,5*S*,6*R*)-lutein-5,6-epoxidból kiindulva a furanoid-epimereken kívül csak egy 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidot izoláltak, amely (3*S*,5*S*,6*R*)-konfigurációval rendelkezett [86]. A (3*S*,5*S*,6*S*)-konfigurációjú végcsoportot (**B**) tartalmazó karotinoid keletkezését nem tapasztalták. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonták le, hogy az 5,6-epoxygyűrű savkatalizált felnyílása során az 5-ös szénatomon a konfiguráció változatlan marad (retenció), míg a 6-os szénatomon vagy megváltozik a konfiguráció (inverzió), vagy változatlan marad (retenció). Így a (3*S*,5*R*,6*S*)-3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoportból (3*S*,5*R*,6*R*)- (**A**) és (3*S*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-β-végcsoport (**C**), míg a (3*S*,5*S*,6*R*)-3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoportból (3*S*,5*S*,6*R*)- (**D**) és (3*S*,5*S*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-β-végcsoport (**B**) keletkezhet (28. ábra).



28. ábra. A savkatalizált gyűrűnyitás lehetséges 3,5,6-trihidroxi-termékei Eugster szerint [86]

Mivel minden, a természetben előforduló karotinoid-5,6-epoxid $(3S,5R,6S)$ -konfigurációval rendelkezik, így Eugster szerint a természetben előforduló 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok csak $(3S,5R,6R)$ - (**A**) és $(3S,5R,6S)$ -konfigurációjúak (**C**) lehetnek. Ennek alapján javaslatot tett a heteroxantin konfigurációjának $3S,5R,6R$ -re történő módosítására is [57].

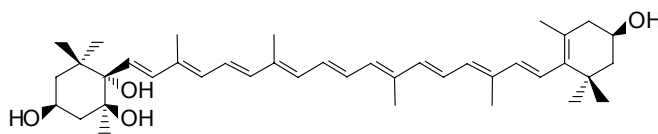
Nem sokkal ezután számoltak be Szabolcs és munkatársai a piros paprikából izolált karpoxantinnról (**14**), melynek konfigurációjára az NMR mérések alapján a $(3S,5S,6S)$ -t javasolták [55], amely ellentétben állt Eugster elképzeléseivel.



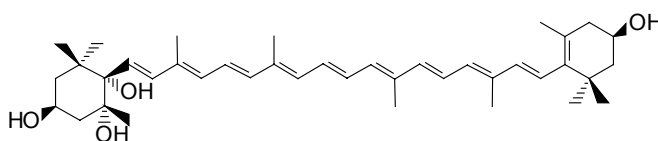
Karpoxantin (**14**)
 $(3S,5S,6S,3'R)$ -5,6-dihidro- β,β -karotin-3,5,6,3'-tetrol

Munkánkat folytatva, a 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok izolálására koncentrálván, fűszerpaprika hipofázisos extraktumából a már korábban izolált karpoxantinon (**14**) kívül további három vegyületet sikerült izolálnunk. ^1H -NMR mérések alapján az egyik vegyület $(3S,5R,6S)$ -konfigurációjú volt, ami a 6-epikarpoxantinnak (**XV**) felel meg. A másik kettő vegyület $(3S,5S,6S)$ -konfigurációjú 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazott (29. ábra). Hogy a további keveredést a konfigurációs indexekkel elkerüljük, így e vegyületek nevéhez az „5,6-diepi” előtagot tettük.

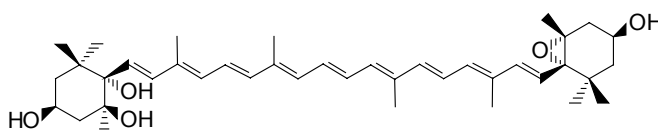
Így tehát piros fűszerpaprikából 5,6-diepikarpoxantint (**XIV**), 6-epikarpoxantint (**XV**), 5,6-diepilatoxantint (**XVI**), és egy új, eddig nem ismert vegyületet 5,6-diepikapszokarpoxantint (**XVII**) izoláltunk [11*].



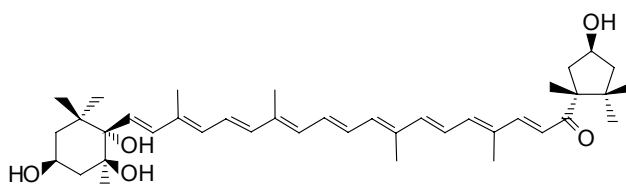
5,6-Diepikarpoxantin (**XIV = 14**)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



6-Epikarpoxantin (**10 = XV**)
(3*S*,5*R*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol

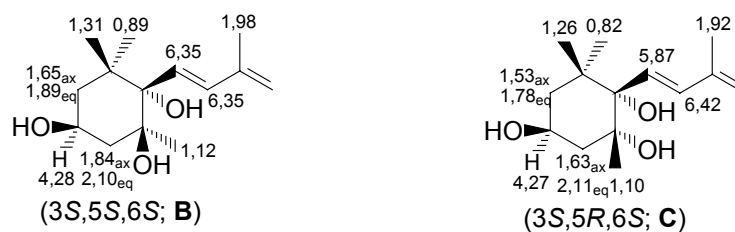


5,6-Diepilatoxantin (**XVI**)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-5',6'-epoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



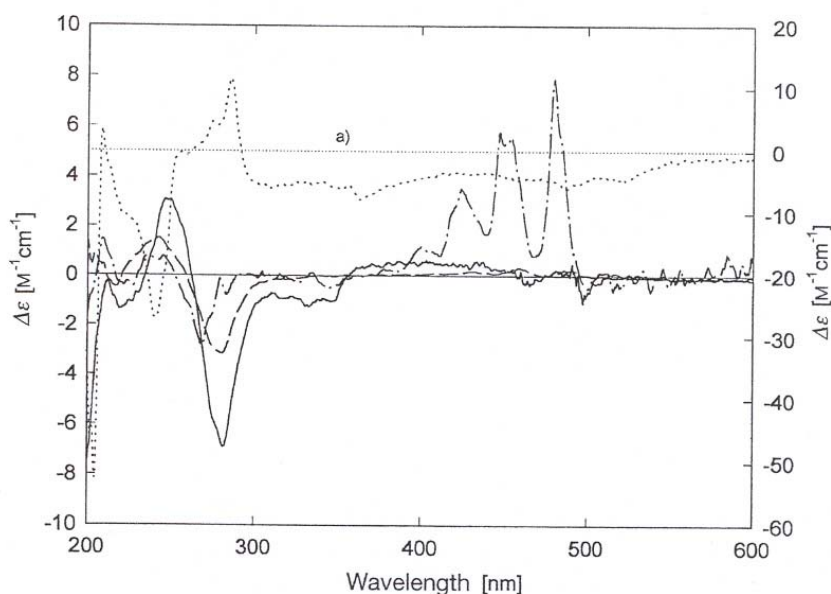
5,6-Diepikapszokarpoxantin (**XVII**)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-5,6-dihidro-3,5,6,3'-tetrahidroxi-β,κ-karotin-6'-on

A 6-epikarpoxantin (**XV**) és az 5,6-diepilatoxantin (**XVI**) esetén a kis anyagmennyiség miatt csak $^1\text{H-NMR}$ méréssel tudtuk a szerkezetet bizonyítani. Az $^1\text{H-NMR}$ adatokat összevetve Eugster adataival, az 5,6-diepi-vegyületekre a (3*S*,5*S*,6*S*), míg a 6-epikarpoxantinra (**XV**) a (3*S*,5*R*,6*S*) konfigurációt adtuk meg (29. ábra). Az 5,6-diepikarpoxantin (**XIV**) és az 5,6-diepikapszokarpoxantin (**XVII**) $^{13}\text{C-NMR}$ vizsgálatát is elvégeztük (32. és 38. ábra).



29. ábra. Az 5,6-diepikarpoxantin (XIV, B) és a 6-epikarpoxantin (XV, C) 3,5,6-trihidroxi végcsoportjának ^1H -NMR adatai [11*].

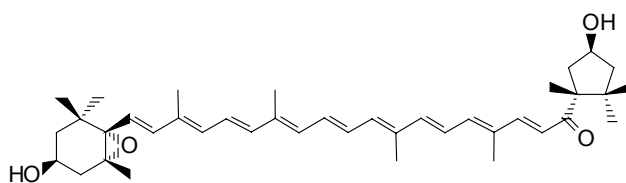
A 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportnak a 3,6-epoxi-végcsoporthoz hasonlóan gyenge Cotton effektusa van, így a konfigurációk megkülönböztetésére a CD spektroszkópia nem alkalmas. Ezt jól mutatja a 30. ábrán az 5,6-diepikarpoxantin (XIV) és a 6-epikarpoxanthin (XV) hasonló lefutású CD spektruma.



30. ábra. Az 5,6-diepikarpoxantin (XIV, —), a 6-epikarpoxantin (XV, - - -), az 5,6-diepilatoxantin (XVI, - · - · -), és az 5,6-diepikapszokarpoxantin (XVII, · · · ·) CD spektruma oldószer: EPA a) nulla vonal XVII-re [11*].

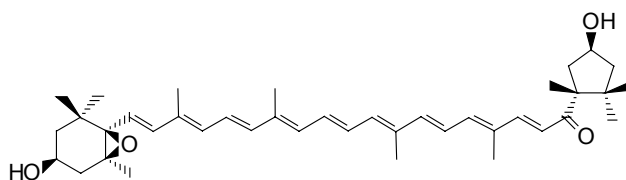
Újabb eredményeink is ellentétben álltak az Eugster által korábban javasoltakkal [57], így elhatároztuk, hogy az izolált vegyületek konfigurációjának egyértelmű bizonyításához előállítjuk a további három lehetséges epimert. Az 5,6-diepikapszokarpoxantin (XVII) teljesen újonnan izolált vegyület volt, így először ennek a szemisztetikus származékait kívántuk előállítani. Ehhez először a kapszantin (1) acetilezésével nyert kapszantin-diacetátot monoperoxi-ftálsavval epoxidáltuk, majd hidrolízis és kromatografálás után megkaptuk a kiindulási *anti*- (3S,5R,6S)- (XVIII) és

szün- (3*S*,5*S*,6*R*)-kapszantin-5,6-epoxid (**XIX**). Mivel az irodalomban e két vegyületnek nem volt ismert minden adata, így elvégeztük teljes spektroszkópai (^1H -, ^{13}C -NMR, MS, CD) jellemzésüket [12*]. Az *anti*- és *szün*- 5,6-epoxi-végcsoportok ^1H - és ^{13}C -NMR adatai jó egyezést mutattak a 16. és 17. ábrán megadott értékekkel. További bizonyítékot szolgáltatott az ellentétes konfigurációra a tükörképi CD görbe.



anti-Kapszantin-5,6-epoxid (**XVIII**)

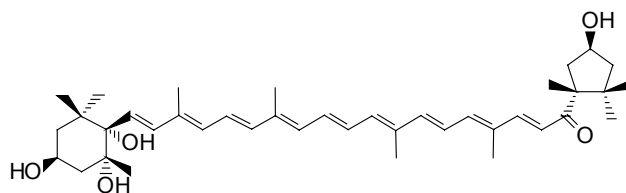
(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-5,6-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi- β , κ -karotin-6'-on



szün-Kapszantin-5,6-epoxid (**XIX**)

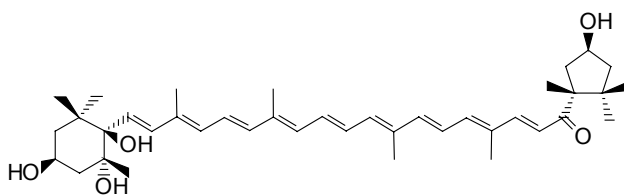
(3*S*,5*S*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-5,6-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi- β , κ -karotin-6'-on

A kénsav jelenlétében végzett gyűrűnyitás összhangban volt Eugster eredményeivel. *anti*-Kapszantin-5,6-epoxidból (**XVIII**) kiindulva a megfelelő furanoid epimereken kívül a (3*S*,5*R*,6*S*)- (**XX**) és (3*S*,5*R*,6*R*)-kapszokarpoxantint (**XXI**), míg *szün*-kapszantin-5,6-epoxidból (**XIX**) kiindulva a furanoid epimereken (**XXIII-XXVI**) kívül csak egy, a (3*S*,5*S*,6*R*)-kapszokarpoxantint (**XXII**) kaptuk, és nem tudtunk a reakció elegyben 5,6-diepikapszokarpoxantint (**XVII**) kimutatni.

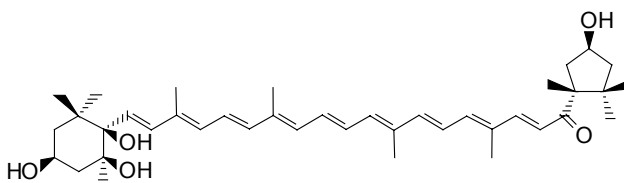


(3*S*,5*R*,6*S*)-Kapszokarpoxantin (**XX**)

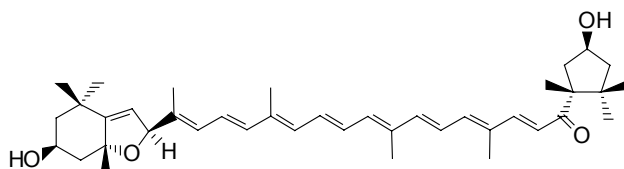
(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-5,6-dihidro-3,5,6,3'-tetrahidroxi- β , κ -karotin-6'-on



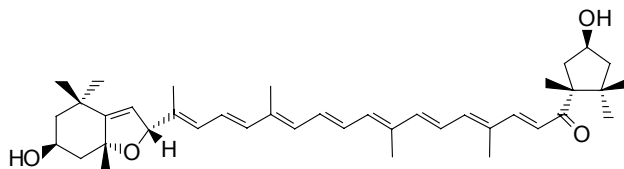
(3*S*,5*R*,6*R*)-Kapszokarpoxantin (**XXI**)
 (3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-5,6-dihidro-3,5,6,3'-tetrahidroxi-β,κ-karotin-6'-on



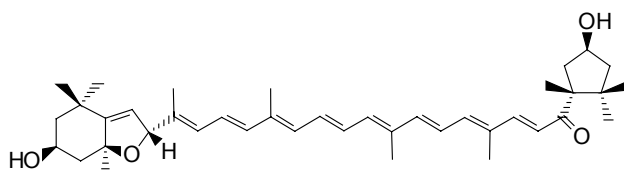
(3*S*,5*S*,6*R*)-Kapszokarpoxantin (**XXII**)
 (3*S*,5*S*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-5,6-dihidro-3,5,6,3'-tetrahidroxi-β,κ-karotin-6'-on



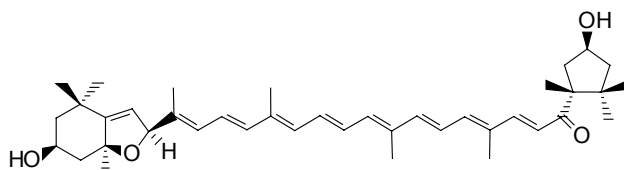
(3*S*,5*R*,8*S*)-Kapszokróm (**XXIII**)
 (3*S*,5*R*,8*S*,3'*S*,5'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi-β,κ-karotin-6'-on



(3*S*,5*R*,8*R*)-Kapszokróm (**XXIV**)
 (3*S*,5*R*,8*R*,3'*S*,5'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi-β,κ-karotin-6'-on

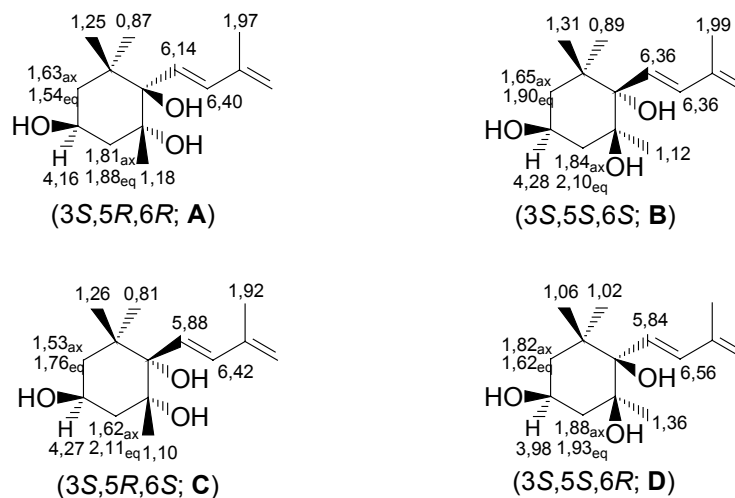


(3*S*,5*S*,8*R*)-Kapszokróm (**XXV**)
 (3*S*,5*S*,8*R*,3'*S*,5'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi-β,κ-karotin-6'-on

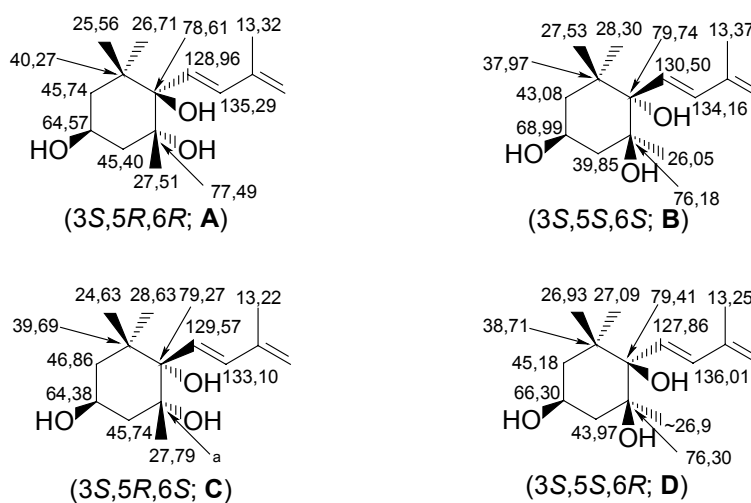


(3*S*,5*S*,8*S*)-Kapszokróm (**XXVI**)
 (3*S*,5*S*,8*S*,3'*S*,5'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi-β,κ-karotin-6'-on

A szemiszintetikus 3,5,6-trihidroxi-vegyületek (XX-XXII) ^1H - és ^{13}C -NMR adatai (31. és 32. ábra) megerősítették a természetes 5,6-diepikapszokarpoxantin (XVII) (3*S*,5*S*,6*S*) konfigurációját [12*].



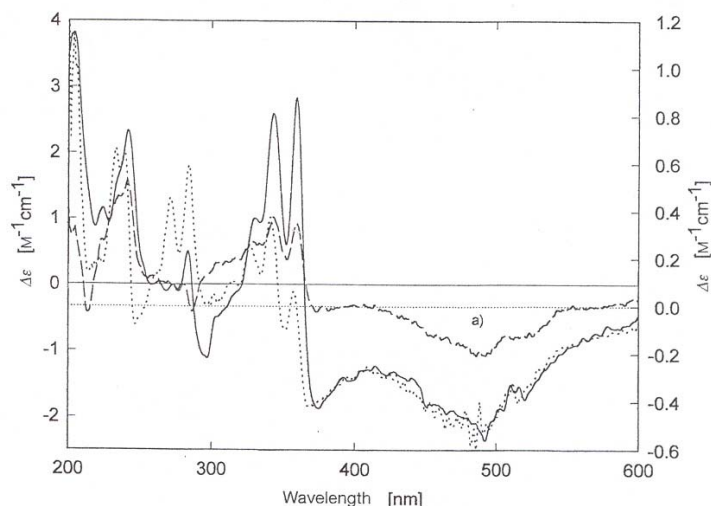
31. ábra. A természetes (XVII, B) és szemiszintetikus (XX-XXII, C, A, D) kapszokarpoxantinok 3,5,6-trihidroxi-végcsoportjának ^1H -NMR adatai [11*, 12*].



32. ábra. A természetes (XVII, B) és szemiszintetikus (XX-XXII, C, A, D) kapszokarpoxantinok 3,5,6-trihidroxi-végcsoportjának ^{13}C -NMR adatai; a: az oldószerjele lefedte [11*, 12*]

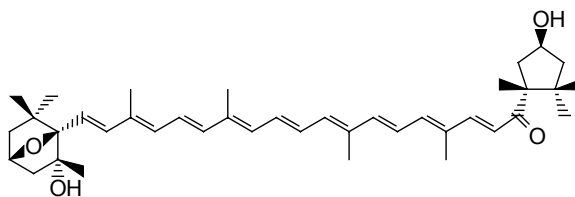
További bizonyítékot szolgáltatott HPLC vizsgálataink, melynek során a paprikából izolált vegyület elkülönült a szemiszintetikus komponensektől.

A szemiszintetikus kapszokarpoxantinok gyenge ún. nem konzervatív CD spektrumot adtak (33. ábra).

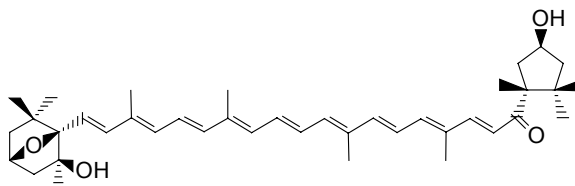


33. ábra. A (3*S*,5*R*,6*S*)-kapszokarboxantin (XX, - - - -), a (3*S*,5*R*,6*R*)-kapszokarboxantin (XXI, —), és a (3*S*,5*S*,6*R*)-kapszokarboxantin (XXII, ·····) CD spektruma -180°C -on [12*]
a) nulla vonal XXII-re

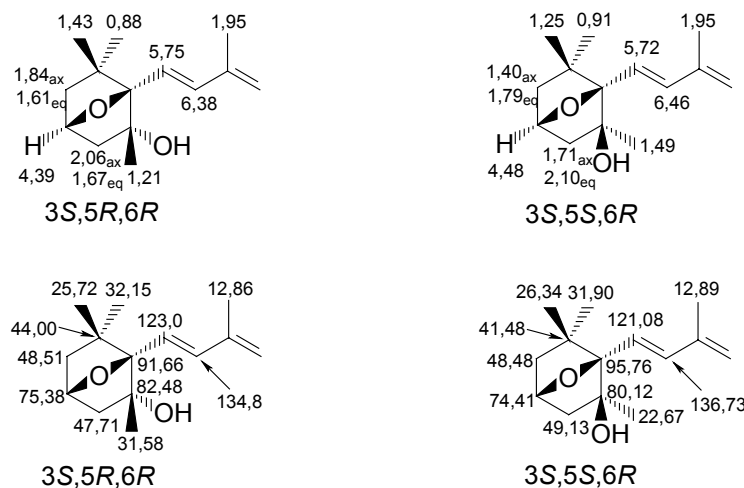
Mindkét esetben a reakcióelegyben még egy-egy minor komponenst találtunk, melyek az MS és NMR adatok (34. ábra) alapján 3,6-epoxi-vegyületeknek bizonyultak. Az *anti*-kapszantin-5,6-epoxidból (XVIII) kiindulva így (3*S*,5*R*,6*R*)-kapszantin-3,6-epoxidot (IX) nyertünk ki, amelyet korábban piros paprikából már izoláltunk. A *szűn*-kapszantin-5,6-epoxid (XIX) hidrolízise pedig (3*S*,5*S*,6*R*)-kapszantin-3,6-epoxidot (XXVII) eredményezett. Ez volt az első eset, amikor szemisztetikus 3,6-epoxidok előállításáról tudtunk beszámolni, az irodalomban ez az átalakulás eddig nem volt ismeretes.



(3*S*,5*R*,6*R*)-Kapszantin-3,6-epoxid (IX)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-5,3'-dihidroxi- β,κ -karotin-6'-on

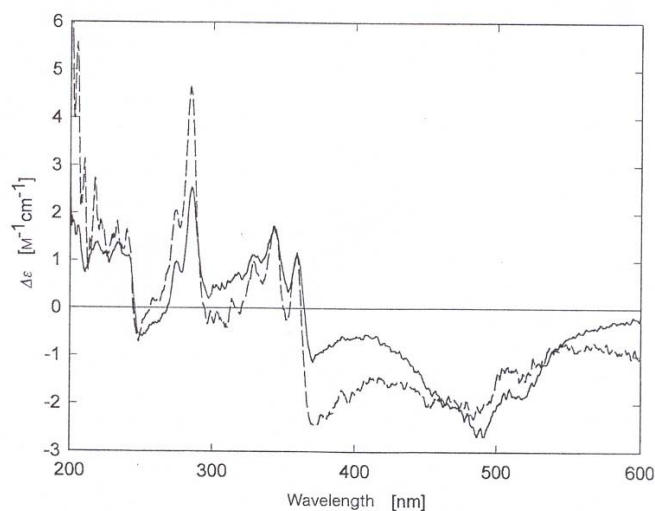


(3*S*,5*S*,6*R*)-Kapszantin-3,6-epoxid (XXVII)
(3*S*,5*S*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-5,3'-dihidroxi- β,κ -karotin-6'-on



34. ábra. A szemisztetikus (3S,5R,6R)- (IX) és (3S,5S,6R)-kapszantin-3,6-epoxid (XVII) 3,6-epoxi-végcsoportjának ^1H - és ^{13}C -NMR adatai [12*]

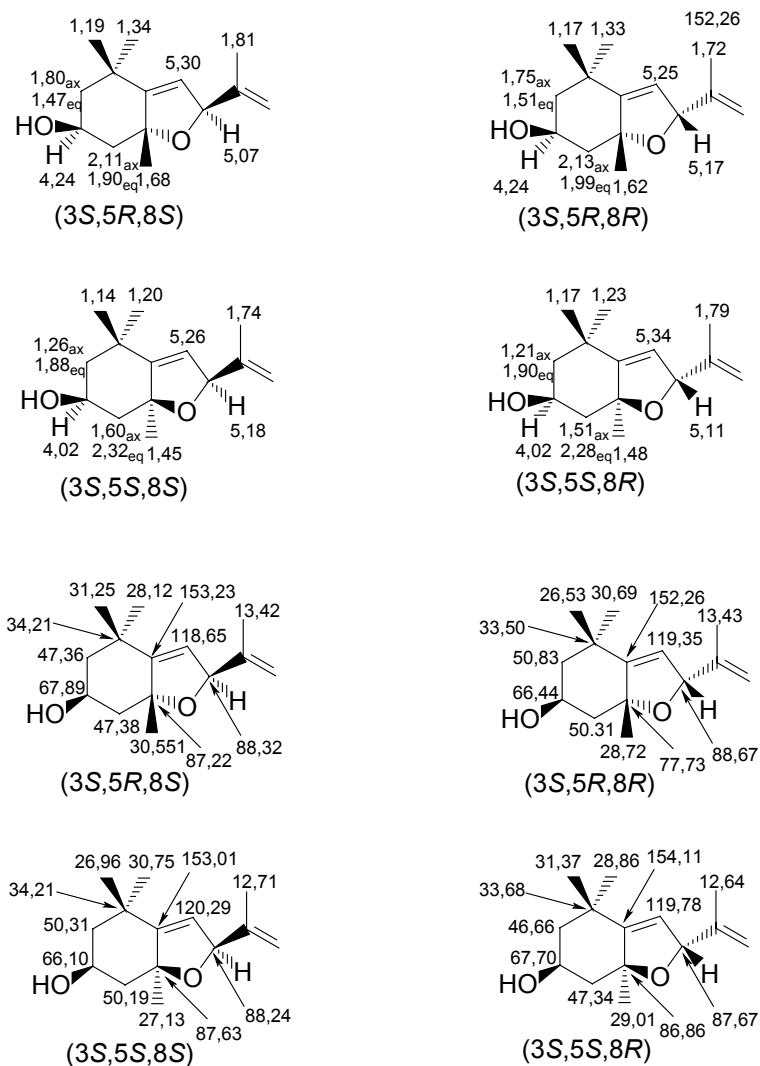
A CD spektrum mindkét vegyület esetében hasonló lefutást mutat (35. ábra), amely a 3,6-epoxi-végcsoport gyenge Cotton effektusának tudható be.



35. ábra. A szemisztetikus (3S,5R,6R)- (IX, —) és (3S,5S,6R)-kapszantin-3,6-epoxid (XXVII, - - - -) CD spektruma [12*].

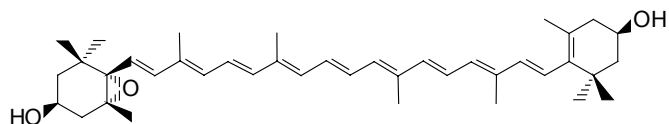
A (3S,5S,6R)-kapszokarpoxantin (XXII) és a (3S,5S,6R)-kapszantin-3,6-epoxid (XXVII) híg sav hatására ún. furanoid átrendeződést mutatott, és mindkét esetben a (3S,5S,8R)-kapszokróm (XXV) és a (3S,5S,8S)-kapszokróm (XXVI) elegyét kaptuk, melyet autentikus mintával való összekromatografálással igazoltunk.

Az összes szemisztetikus vegyület, beleértve a főtermékként keletkező négy különböző 5,8-epoxid (furanoid) teljes spektroszkópai jellemzését (MS, ^1H - és ^{13}C -NMR (36. ábra), CD) is elvégeztük.



36. ábra. A kapszokróm epimerek (XXIII-XXVI) 5,8-epoxi-végcsoportjának ^1H - és ^{13}C -NMR adatai [12*]

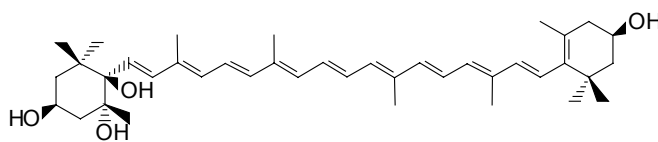
Az 5,6-diepikarpoxantin (XIV) szerkezetigazolásához az *anti*- és *szün*-anteraxantin (15, 16) kénsavval katalizált gyűrűnyitását is elvégeztük [13*].



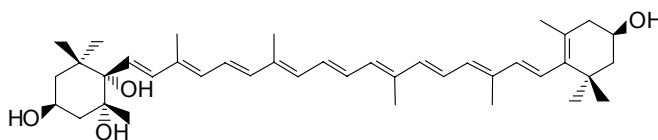
anti-Anteraxantin (15)

(3S,5R,6S,3'R)-5,6-Epoxi-5,6-dihidro- β,β -karotin-3,3'-diol

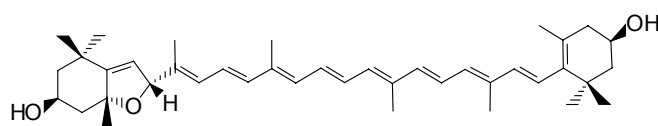
anti- (3S,5R,6S)-Anteraxantin (15) reakciója karpoxantint (9=XXVIII) és 6-epikarpoxantint (10=XV), (3S,5R,8R)- (XXIX) és (3S,5R,8S)-mutatoxantint (XXX), valamint cucurbitaxantin A-t (VIII) eredményezett.



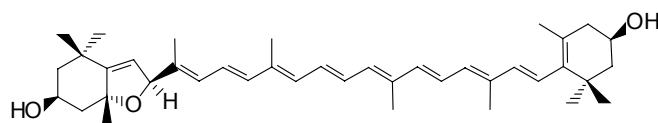
Karpoxantin (**XXVIII**)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



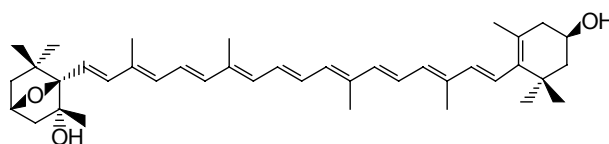
6-Epikarpoxantin (**XV**)
(3*S*,5*R*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



(3*S*,5*R*,8*R*)-Mutatoxantin (**XXIX**)
(3*S*,5*R*,8*R*,3'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,3'-diol



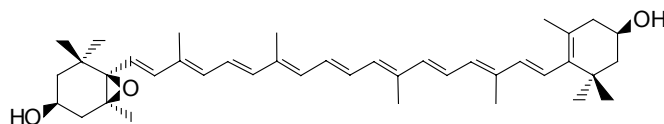
(3*S*,5*R*,8*S*)-Mutatoxantin (**XXX**)
(3*S*,5*R*,8*S*,3'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,3'-diol



Cucurbitaxantin A (**VIII**)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-5,3'-diol

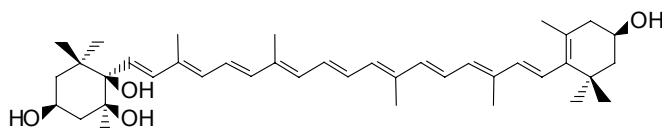
Itt jegyzem meg, hogy piros fűszerpaprikából is izoláltuk a két természetes mutatoxantin-epimert (**XXIX-XXX**), és elvégeztük teljes spektroszkópai (MS, CD, ^1H - és ^{13}C -NMR) jellemzésüket [14*]. A (3*S*,5*R*,8*R*)- és a (3*S*,5*R*,8*S*)-5,8-epoxi-végcsoport ^1H - és ^{13}C -NMR adatai jó egyezést mutattak a 36. ábrán feltüntetett értékekkel. A két vegyület tükörképi CD görbéje szintén a 8-as szénatom ellentétes konfigurációját erősítette meg.

A *szün*- (3*S*,5*S*,6*R*)-anteraxantin (**16**) hidrolízise, hasonlóan a *szün*-kapszantin-5,6-epoxid (**XIX**) hidrolíziséhez, csak egy epimert, az 5-epikarpoxantint (**XXXI**) eredményezte, és a főtermék mutatoxantin epimereken (**XXXII-XXXIII**) felül 5-epicucurbitaxantin A-t (**XXXIV**) is kaptunk.



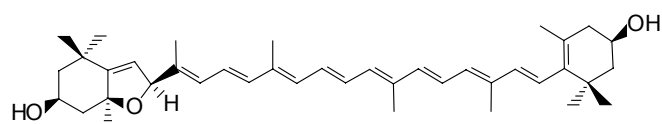
szün-Anteraxantin (**16**)

(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*)-5,6-Epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,3'-diol



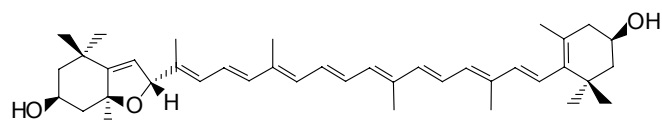
5-Epikarpoxantin (**XXXI**)

(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



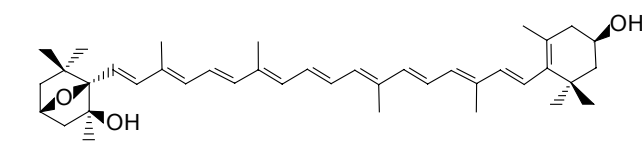
(3*S*,5*S*,8*S*)-Mutatoxantin (**XXXII**)

(3*S*,5*S*,8*S*,3'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,3'-diol



(3*S*,5*S*,8*R*)-Mutatoxantin (**XXXIII**)

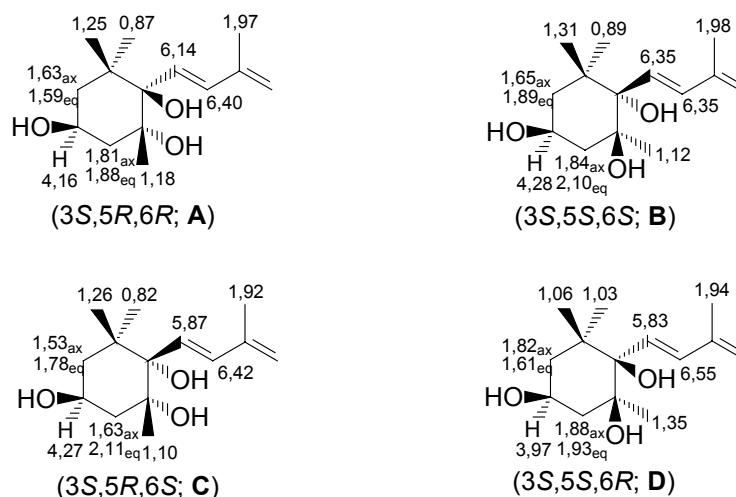
(3*S*,5*S*,8*R*,3'*R*)-5,8-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,3'-diol



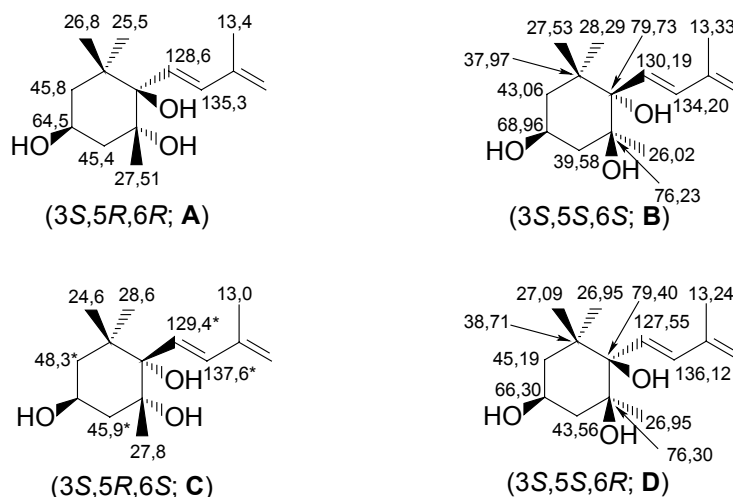
5-Epicucurbitaxantin A (**XXXIV**)

(3*S*,5*S*,6*R*,3'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-β,β-karotin-5,3'-diol

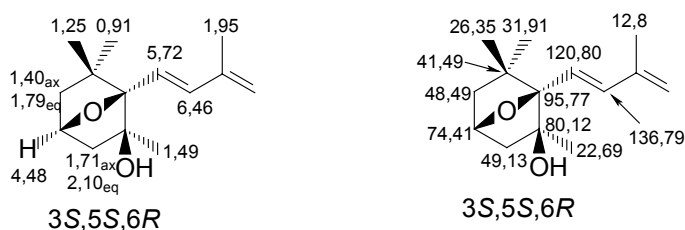
Az előállított vegyületeket tömeg-, CD-, ¹H- és ¹³C-NMR spektrumukkal azonosítottuk [13*]. Az ¹H- és ¹³C-NMR (37-39. ábra) adatok jó egyezést mutattak a kapszokarpoxantinok, illetve a kapszantin-3,6-epoxidok adataival (31-32. és 34. ábra).



37. ábra. A természetes (XIV, B) és szemisztetikus (XXVIII (A), XV (C), és XXXI (D)) karpoxantinok 3,5,6-trihidroxi-végcsoportjának ^1H -NMR adatai [11*, 13*].



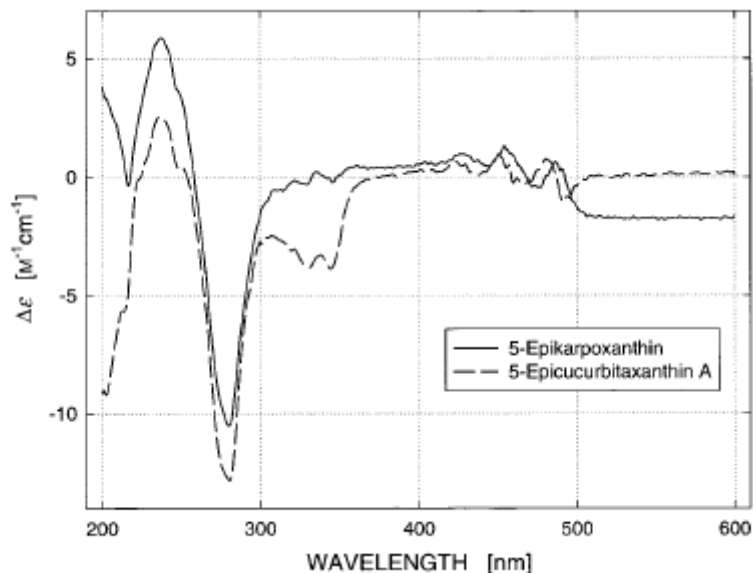
38. ábra. A természetes (XIV, B) és szemisztetikus (XXVIII (A), XV (C), és XXXI (D)) karpoxantinok 3,5,6-trihidroxi-végcsoportjának ^{13}C -NMR adatai [11*, 13*]. Az A és B végcsoport szén eltolódásai az inverz HMQC kísérletekből származnak, így a kvaterner szénekre nem megadhatók. *) aszignáció bizonytalan



39. ábra. Az 5-epicucurbitaxanthin A (XXXIV) (3S,5S,6R)-3,6-epoxi-végcsoportjának ^1H - és ^{13}C -NMR adatai [13*]

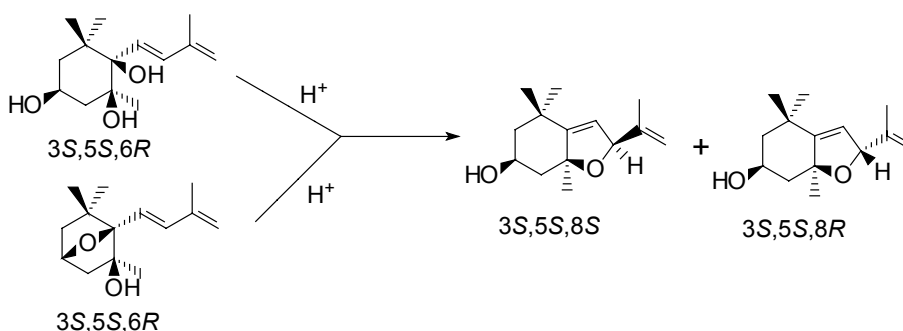
A mutatoxantin epimerek kémiai eltolódás értékei megegyeztek a 36. ábrán feltüntetett értékekkel.

Az újonnan előállított 5-epikarpoxantin (**XXXI**) és 5-epicucurbitaxantin A (**XXXIV**) CD spektruma hasonló lefutást mutatott (40. ábra), mint az 5,6-diepikarpoxantiné (**XIV**) és 6-epikarpoxantiné (**XV**) (30. ábra), illetve mint a cucurbitaxantin A-é (**VIII**) (23. ábra).



40. ábra. Az 5-epikarpoxantin (**XXXI**; —) és az 5-epicucurbitaxantin A (**XXXIV**; - - -) CD spektruma

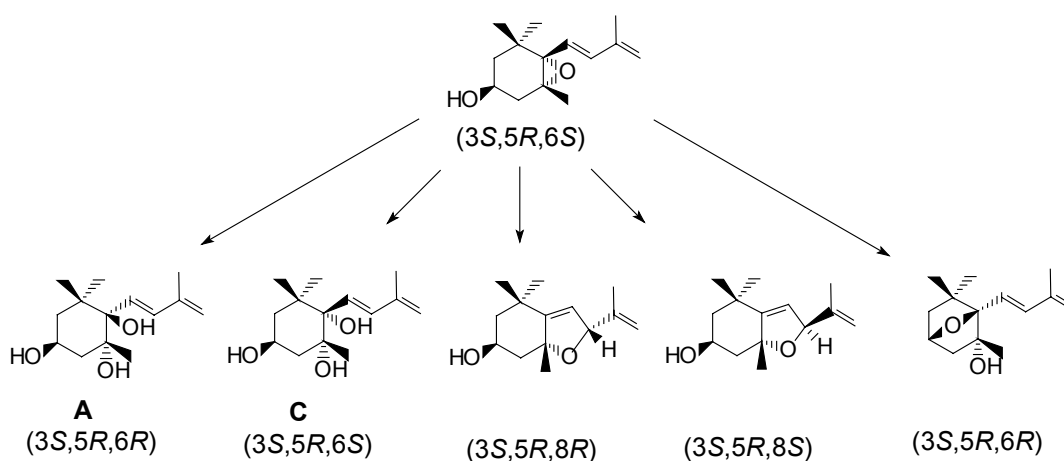
Az 5-epikarpoxantin (**XXXI**) és az 5-epicucurbitaxantin A (**XXXIV**) ugyancsak ún. furanoid átrendeződést mutatott híg sav hatására, és mindkét esetben a (3*S*,5*S*,8*R*)-mutatoxantin (**XXIX**) és a (3*S*,5*S*,8*S*)-mutatoxantin (**XXX**) elegyét kaptuk (41. ábra), melyet autentikus mintával való összekromatografálással igazoltunk. A reakcióelegyekről készült ¹H-NMR felvételek szintén a mutatoxantin-epimerek 1:2,5 (8*S*/8*R*) arányban való képződését erősítette meg.



41. ábra. A (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5,6-trihidroxi- és a (3*S*,5*S*,6*R*)-3,6-epoxi-végcsoport reakciója savval

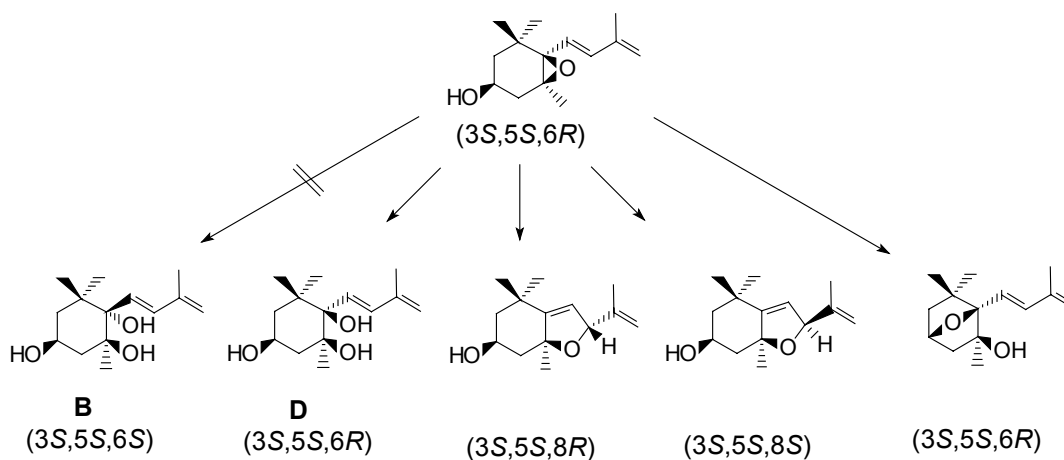
Saját eredményeink, valamint Eugster korábban közölt eredményei azt mutatják, hogy a karotinoid-5,6-epoxidok savkatalizált gyűrűnyitása csak az 5,6-epoxi-végcsoport

konfigurációjától függ, és független a másik végcsoporttól. Így (3*S*,5*R*,6*S*)-3-hidroxi-5,6-epoxi végcsoportot tartalmazó karotinoidból kiindulva minden esetben (3*S*,5*R*,6*R*)- (**A**) és (3*S*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-vegyület (**C**) keletkezik, a főtermék (3*S*,5*R*,8*R*)- és (3*S*,5*R*,8*S*)-5,8-epoxi-karotinoidok mellett, és (3*S*,5*R*,6*R*) konfigurációjú 3,6-epoxi-karotinoid is detektálható (42. ábra).



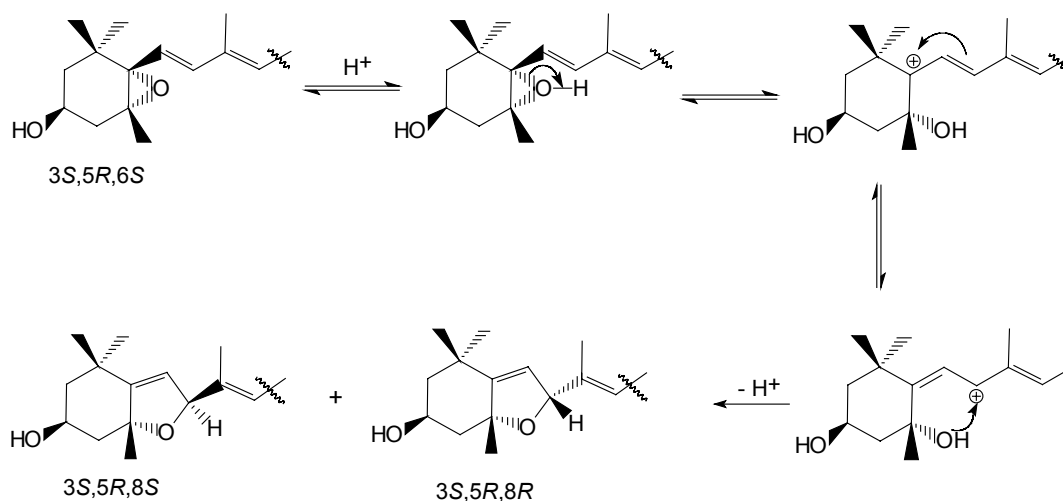
42. ábra. A (3S,5R,6S)-5,6-epoxi-végcsoport savkatalizált gyűrűnyitásának termékei

A (3*S*,5*S*,6*R*)-3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoportot tartalmazó karotinoidból kiindulva, a főtermék (3*S*,5*S*,8*R*)- és (3*S*,5*S*,8*S*)-5,8-epoxi-karotinoidok mellett minden esetben csak egy, (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5,6-trihidroxi-vegyület (**D**), és (3*S*,5*S*,6*R*) konfigurációjú 3,6-epoxi-karotinoid keletkezik. A természetben előforduló (3*S*,5*S*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-karotinoid ilyen körülmények között a reakcióelegyben nem mutatható ki (43. ábra).



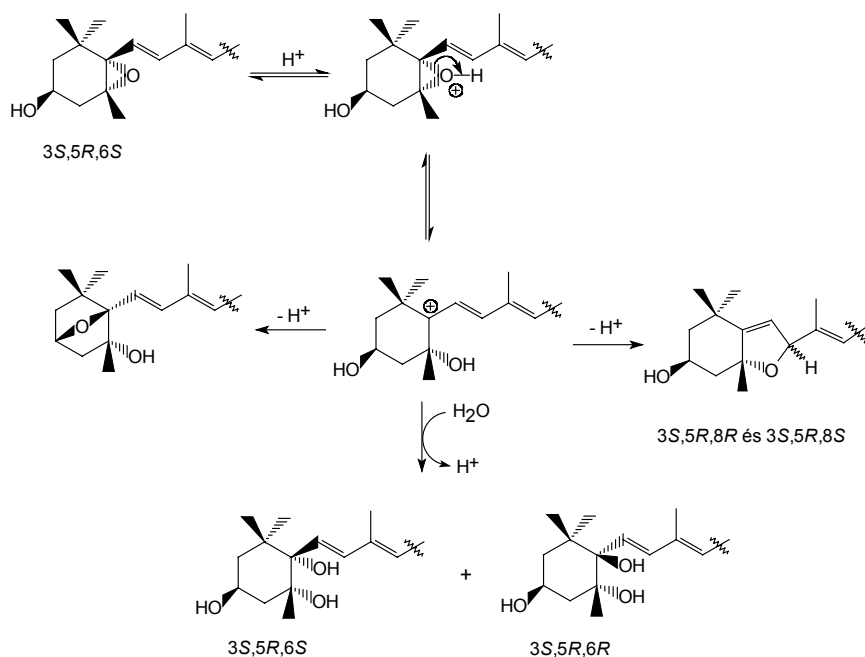
43. ábra. A (3S,5S,6R)-5,6-epoxi-végcsoport savkatalizált gyűrűnyitásának termékei

A keletkező 3,5,6-trihidroxi-vegyületek konfigurációját jól lehet magyarázni a furanoid-oxid képződésre felállított mechanizmussal [72] (44. ábra): eszerint sav hatására először a 6-os szénatomon egy karbóniumion keletkezik. A kettős kötés vándorlása, a hidroxilcsoport nukleofil támadása, valamint a proton leadás után alakul ki a két sztereoizomer furanoid-epimer, miközben az 5-ös szénatom konfigurációja változatlan marad.



44. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport furanoid átrendeződésének mechanizmusa [72]

A karbóniumionra azonban a reakció elegyben jelenlévő vízmolekula is intézhet nukleofil támadást, és így 6-OH vegyület formájában is stabilizálódhat. Elméletileg mindkét sztereoizomer kialakulhat, miközben az 5-ös szénatom konfigurációja ugyancsak változatlan marad (45. ábra) [11*].



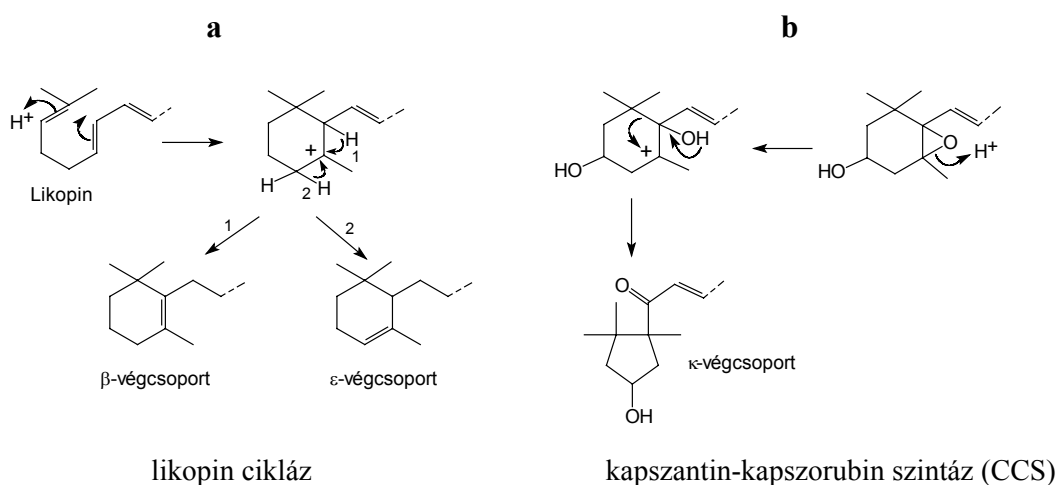
45. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport savkatalizált gyűrűnyitási reakciójának mechanizmusa [11*]

Az itt felvázolt reakciómechanizmussal a 3,6-epoxi-végcsoport kialakulása is magyarázható: a karbóniumionra a 3-OH csoport is intézhet támadást, és a protonvesztés után kialakul a biciklusos gyűrű. Elvileg elképzelhető, hogy karbóniumion kialakulhat a 3,5,6-trihidroxi-vegyület(ek)ből is, ahogy azt a [12*] irodalomban írtuk, ezt azonban még eddig nem sikerült bizonyítanunk.

Miután a szemisztetikus vegyületek képződése és szerkezete ily módon megmagyarázható, nyilvánvalónak tűnik, hogy a paprikából izolált, (3*S*,5*S*,6*S*)-konfigurációjú vegyületeknek más úton, feltehetőleg enzim katalizálta folyamatban kell keletkezniük.

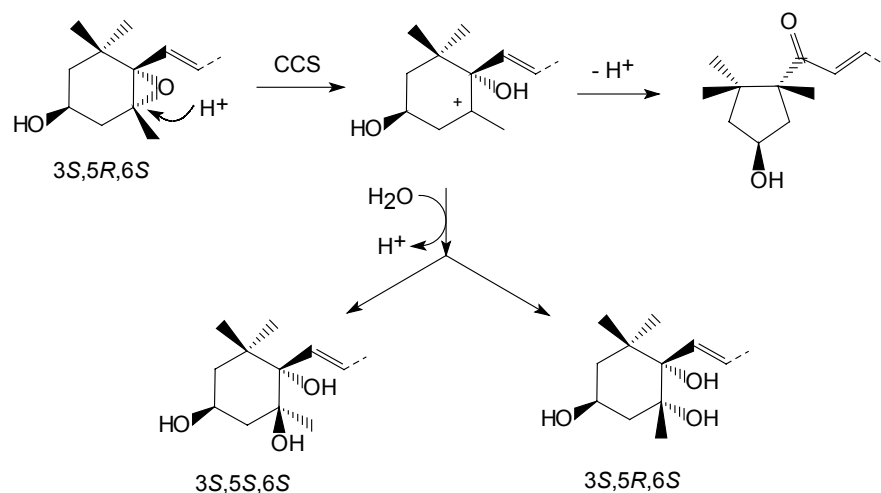
E feltevésünk bizonyítását segítette a Bilal Camara és munkatársai által 1994-ben publikált közlemény, amelyben a kapszantin-kapszorubin-szintáz (CCS) izolálásáról és szekvencia meghatározásáról számoltak be [87]. A CCS a karotinoidok 5,6-epoxi-végcsoportjának ún. pinakolin átrendeződését katalizálja, amelynek során a κ -végcsoport keletkezik. Ennek az enzimnek a létezését és szerepét már az 1980-as években leírták Camara és munkatársai [51,52], azonban izolálni csak most sikerült. Mivel Camara és munkatársai nagymértékű hasonlóságot találtak a likopin β -cikláz és a kapszantin-kapszorubin-szintáz szekvenciája között, és mivel a CCS likopin β -cikláz aktivitást is mutatott, így hasonló mechanizmust feltételeztek a két enzim működésére [88].

Az általánosan elfogadott mechanizmus szerint a likopin gyűrűzárása egy az 5-ös szénatomon kialakuló karbóniumionon keresztül játszódik le [88], melyet a 46a. ábra szemléltet.



46. ábra. A likopin cikláz és a kapszantin-kapszorubin-szintáz működési mechanizmusa [88]

Alapul véve a szekvenciák hasonlóságát és a CCS β -cikláz aktivitását, jogosnak tűnik a feltételezés, hogy a pinakolin átrendeződés is egy az 5-ös szénen kialakuló karbóniumionon keresztül történik **(b)** [88]. E mechanizmust alapul véve már magyarázható az általunk izolált 3,5,6-trihidroxi-vegyületek konfigurációja is (47. ábra):



47. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport enzimkatalizált gyűrűnyitási reakciójának mechanizmusa [11*]

Mivel az 5-ös szénatomon alakul ki a karbóniumion, így a C(6) konfigurációja változatlan marad, míg a C(5) vagy változatlan (pl. 6-epikarboxantin **(XIV)**), vagy megváltozik (pl. 5,6-diepikarboxantin **(XIV)**).

Így tehát érthetővé válik a paprikából izolált 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok (3S,5S,6S) és (3S,5R,6S) abszolút konfigurációja, és az is, hogy egyéb növényi forrásokból (amelyek nem tartalmaznak κ -végcsoportú karotinoidokat) miért nem találtak eddig ilyen vegyületeket [11*].

Eredményeink tehát nem mondanak ellent Eugster feltevéseinek [57]. Azokban a növényekben, amelyekben nincs κ -végcsoportot tartalmazó karotinoid, de karotinoid-5,6-epoxid igen, a növényi savak hatására is lejátszódhat gyűrű felnyílás, ami a (3S,5R,6R)- és (3S,5R,6S)-konfigurációjú 3,5,6-trihidroxi-karotinoidokat eredményez. Hogy Eugster eredményeit megerősítsük, elvégeztük a csipkebogyó (*Rosa Canina*) újbóli karotinoid analízisét. Preparatív oszlopkromatográfia és HPLC kombinálásával, valamint autentikus mintákkal igazoltuk a karpoxantin **(9)** és 6-epikarboxantin **(10)** jelenlétét, olyan mennyiséget azonban, amelyből a műszeres méréseket el tudtuk volna végezni, még nem sikerült izolálnunk [89].

2.4. γ -Végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálása [15*,16*]

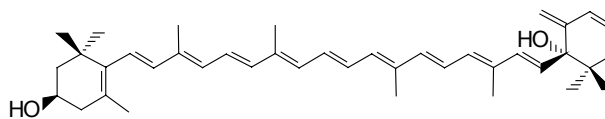
Már a különböző piros paprikafajták HPLC analízisének feltűnt egy csúcs, amely következetesen megjelent a kromatogramban közvetlenül a zeaxantin után (14. ábra: peak 30), és a rendelkezésre álló standard anyagainkkal azonosítani nem tudtuk. Ezért célul tűztük ki izolálását és szerkezetének meghatározását.

Ez a karotinoid a CaCO_3 oszlopon a cucurbitaxantin A és B között kötődik, és a 3,6-epoxi-karotinoidokhoz hasonlóan frakcionált kristályosítással és ún. megoszlatással feldúsítható. Ismételt oszlopkromatográfiával a cucurbitaxantin A-tól elválasztható, illetve egy piros komponenstől (kapszanton) megtisztítható. Mivel a vegyületet először ún. „fekete„ paprikából izoláltuk, így nigroxantinnek neveztük el. A nigroxantin szerkezetének és konfigurációjának kiderítése azonban hosszadalmas feladat volt [15*].

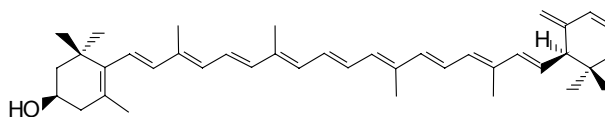
Az izolált vegyület UV-VIS spektruma megegyezett a luteinével, amely arra utalt, hogy 10 konjugált kettős kötés található a molekulában. Nem reagált sem savval, sem redukálószerrel (LiAlH_4), ami kizárta az 5,6-epoxi-, illetve a karbonilcsoport jelenlétét. Tömegspektroszkópiás mérés alapján a molekulatömeg 566-nak adódott, amely kettővel kisebb, mint a lutein molekulatömege, és amely a $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_2$ összegképletnek felel meg. IR vizsgálataink allén-, acetilén-, karbonil- vagy karboxilcsoportra utaló jelet nem mutattak ki.

A vegyület két oxigént tartalmaz, és acetilezése monoacetil származékot eredményezett, így egy primer vagy szekunder és egy tercier hidroxilcsoport jelenlétére következtettünk. A két proton hiány ezek után csak egy újabb kettős kötésből származhat, amely nincs a láncsal konjugált helyzetben. Feladatunk tehát ennek a kettős kötésnek a végcsoportban való elhelyezése volt. NMR vizsgálataink a Veszprémi Egyetem NMR Laboratóriumában kezdődtek, majd később Bernben folytatódtak. Már az ^1H -NMR mérések igazolták, hogy az egyik végcsoport 3-hidroxi- β -végcsoport, így a továbbiakban a másik végcsoport szerkezete maradt csak kérdéses. Az ^1H -NMR spektrumban (48. ábra) 5,00 és 5,03 ppm-nél két éles szingulett jelet találtunk, amely a $\text{C}(18')$ terminális metilencsoportra jellemző [90,91], így tehát ez a végcsoport feltehetően egy γ -végcsoport. A H_2H -COSY spektrumban látható cross-peak-ek a $\text{H}_2\text{C}(2')$ és $\text{H}-\text{C}(3')$, valamint $\text{H}-\text{C}(3')$ és $\text{H}-\text{C}(4')$ között azt mutatják, hogy a hiányzó kettős kötés a 3' és 4' szénatom között található. Így a hidroxilcsoport csak a 6'-szénatomon helyezkedhet el. Ezek után a nigroxantin mint 3',4'-didehidro- β,γ -karotin-3,6'-diol (XXXV) adható meg. A további szerkezetazonosításhoz és az NMR vizsgálatokhoz felhasználtuk a már korábban

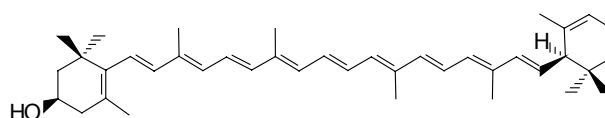
intézetünkben Baranyai Márta és munkatársai által előállított [90] deoxilutein II-t (**17**) és deoxilutein III-t (**18**) is.



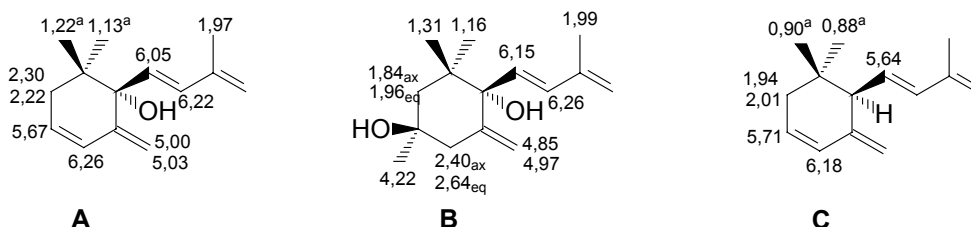
Nigroxantin (**XXXV**)
(3*R*,6'*S*)-3',4'-Didehidro-β,γ-karotin-3,6'-diol



Deoxilutein II (**17**)
(3*R*,6'*S*)-3',4'-Didehidro-β,γ-karotin-3-ol

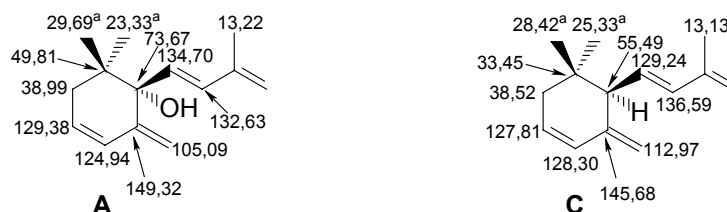


Deoxilutein III (**18**)
(3*R*,6'*S*)-2',3'-Didehidro-β,ε-karotin-3-ol



48. ábra. A nigroxantin (**XXXV**, **A**), a prenigroxantin (**XXXVI**, **B**) és a deoxilutein II (**17**, **C**) γ -végcsoportjának ^1H -NMR adatai [15*, 16*]. a): felcserélhetők

A ^{13}C -NMR spektrumok (49. ábra) is alátámasztották a fent megadott szerkezetet, bár a C(18') jele a nigroxantinban meglehetősen gyengén jelentkezett.

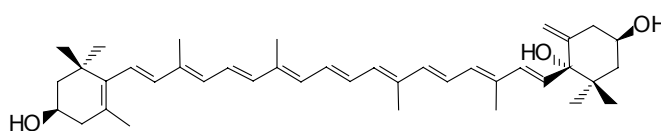


49. ábra. A nigroxantin (**XXXV**, **A**) és a deoxilutein II (**17**, **C**) γ -végcsoportjának ^{13}C -NMR adatai [15*]. a): felcserélhetők

A 48. és 49. ábrán feltüntettem a [15*] közlemény megjelenése után a nigroxantinról készült inverz HMQC spektrumból nyert proton és szén eltolódásokat is, melyek az említett közleményben még nem szerepelnek.

Sem NMR, sem CD vizsgálataink nem adtak azonban információt a C(6') konfigurációjára. A nigroxantin CD görbéjét a 3-hidroxi- β -végcsoporthatározza meg, így a másik végcsoporthat konfigurációjára nem nyújt felvilágosítást [15*].

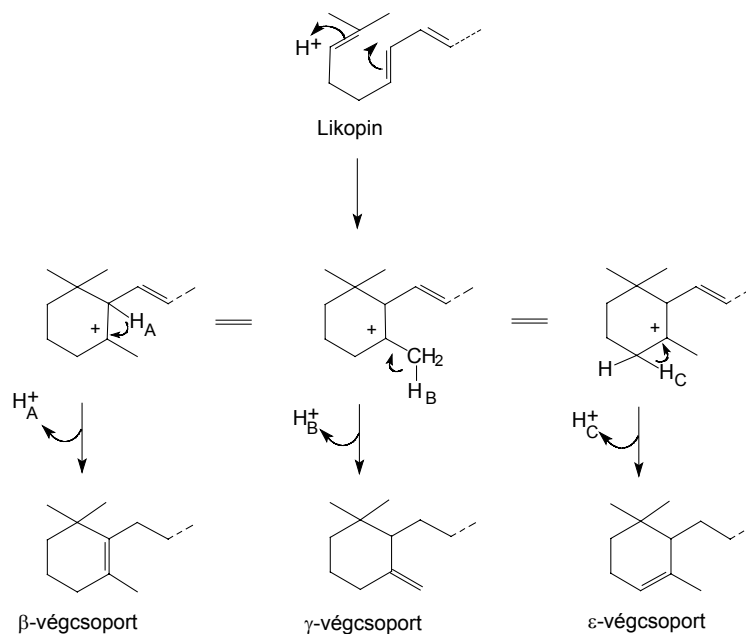
Közel tíz évvel a nigroxantin kimutatása és izolálása után sikerült egy újabb, γ -végcsoporthat tartalmazó karotinoidot izolálnunk, melyet prenigroxantinnek nevezünk el [16*].



Prenigroxantin (XXXVI)
(3R,3'S,6'S)- β,γ -karotin-3,3',6'-triol

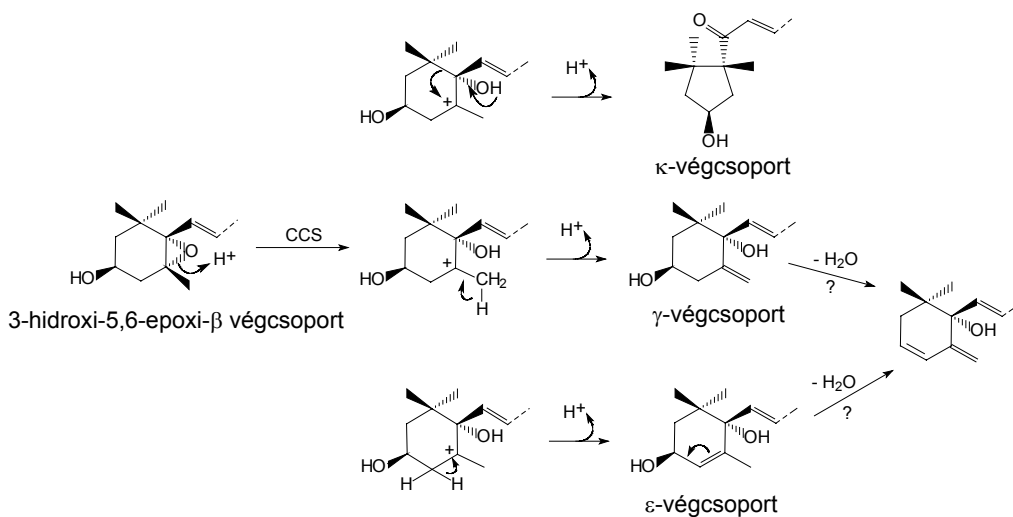
Összesen 1 mg anyagot sikerült izolálnunk, amely az UV-VIS, CD és tömegspektroszkópiai vizsgálatokon kívül csak ^1H -NMR vizsgálatokat (48. ábra) tett lehetővé. A hosszú mérési idő alatt az anyagunk elbomlott, így értékelhető ^{13}C -NMR adatokat nem kaptunk. Az ^1H -NMR, ^1H -COSY és T-ROESY felvételek azonban teljes proton hozzárendelést tettek lehetővé. Felhasználva a deoxilutein II (17) és nigroxantin (XXXV) adatait is, az újonnan izolált vegyület β,γ -karotin-3,3',6'-triolnak (XXXVI) bizonyult. A CD felvételek a prenigroxantin esetén sem adtak felvilágosítást a C(6') konfigurációjára, így azt mind a nigroxantin (XXXV), mind a prenigroxantin (XXXVI) esetén a feltételezett bioszintézis sémából próbáltuk kikövetkeztetni.

Már a 3,5,6-trihidroxi-vegyületek kapcsán említettem a likopin gyűrűzárási mechanizmusát. Az 5-ös szénen kialakuló karbokation háromféleképpen stabilizálódhat, β -, ε - vagy γ -végcsoporthat kialakítva, attól függően, hogy melyik szénatomról lép ki a proton (50. ábra) [92]:



50. ábra. A likopin gyűrűzárási mechanizmusa [92]

Ha figyelembe vesszük a Camara által javasolt karbóniumion képződéssel járó pinakolin átrendeződést, akkor ésszerűnek tűnik a feltételezés, hogy a kapszantin-kapszorubin-szintáz (CCS) enzim hatására keletkező kation stabilizálódhat oly módon is, hogy ε-, illetve γ-végcsoportot szolgáltasson (51. ábra).



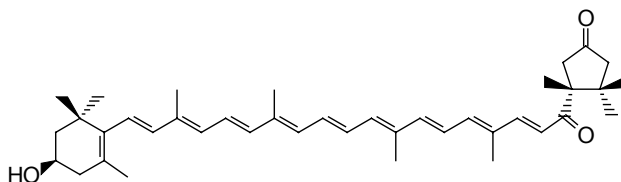
51. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport lehetséges átalakulásai [16*]

Mivel 3,6-dihidroxi-ε-végcsoportú karotinoidot nem tudtunk eddig kimutatni, így elképzelhető, hogy víz elimináció után, ebből a végcsoportból keletkezik a 6-hidroxi-3,4-didehidro-γ-végcsoport.

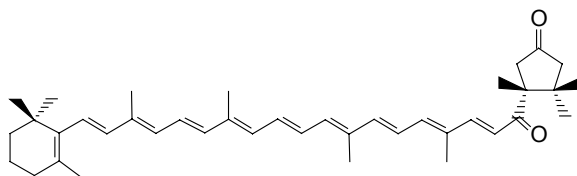
Ha elfogadjuk ezt a mechanizmust, akkor a 6'-os szénatom konfigurációja nem változik meg, és így mind a nigroxantin (**XXXV**), mind a prenigroxantin (**XXXVI**) esetén a 6'S konfigurációt javasoljuk [16*].

2.5. Kapszanton izolálása [17*]

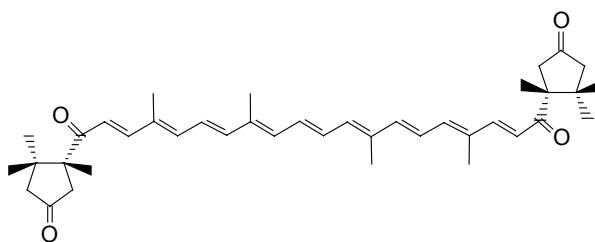
A kapszanton (**XXXVII**), kriptokapszon (**19**) és a kapszorubon (**20**) jelenlétét a vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum*) porzójában több mint 20 évvel ezelőtt román szerzők írták le [93-94], de az izolálást és szerkezetazonosítást nem végezték el. Rüttimann és munkatársai [40] a kapszantin (**1**) és kapszorubin (**2**) szintézise kapcsán viszont előállították a szintetikus kapszantont (**XXXVII**), kriptokapszont (**19**) és kapszorubont (**20**), és elvégezték a spektroszkópai jellemzésüket is. Növényi forrásból származó kapszanton izolálásról az irodalomban nem találtunk utalást.



Kapszanton (**XXXVII**)
(3*R*,5'*R*)-3-Hidroxi-β,κ-karotin-3',6'-dion



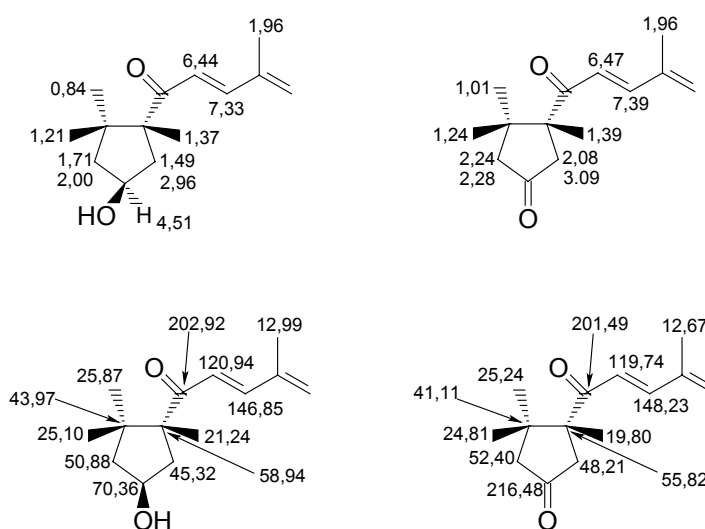
Kriptokapszon (**19**)
(5'*R*)-β,κ-karotin-3',6'-dion



Kapszorubon (**20**)
(5*R*,5'*R*)-κ,κ-karotin-3,6,3',6'-tetraon

A nigroxantin izolálása során figyeltünk fel arra, hogy a frakcióban mindig található egy piros kísérő festék, amelynek izolálását szintén célul tűztük ki. 22 kg ún. „fekete” fűszerpaprika metanolos extraktumából ismételt preparatív oszlop-kromatográfiával sikerült 0,8 mg kristályos anyagot nyernünk. A vegyület UV-VIS

spektruma (493 nm benzolban), megegyezett az irodalomban [40] leírttal, és a tömegspektrum ($[M]^+=582$) is a 3'-oxocsoport jelenlétére utalt. Az izolált anyagot együttkromatografálva az intézetünkben korábban Szabolcs és munkatársai által [95] kapszantinból Oppenauer oxidációval előállított szemiszintetikus kapszantonnal, egy csúcsot kaptunk, amely szintén az azonosságot erősítette meg. A további műszeres vizsgálatokhoz így a szemiszintetikus kapszantont is felhasználtuk. Mivel a természetes forrásból származó kapszanton kis mennyisége miatt csak ^1H -NMR spektrum felvételét tette lehetővé (amely teljes mértékben megegyezett a szemiszintetikus vegyületével), így a teljes proton és szén hozzárendelést a szemiszintetikus vegyülettel végeztük el (52. ábra).



52. ábra. A 3-hidroxi-κ- [12*] és a 3-oxo-κ-vegcsoport [17*] ^1H - és ^{13}C -NMR adatai

Bár a későbbiek során fűszerpaprikában és más pirosra érő paprikákban is kimutattuk a kapszanton (XXXVII) jelenlétét, kapszorubont (20) és kriptokapszont (19) eddig nem sikerült találnunk. A kapszanton (XXXVII) a piros paprika fő komponensének, a kapszantinnak (1) oxidált származéka, így a sokkal kisebb mennyiségben jelenlévő kapszorubin (2) és kriptokapszin oxoszármazékait nyilvánvalóan nehéz kimutatni. Mivel oxidációs termékről van szó, felmerülhet a kérdés, hogy az izolálás során keletkező 'műtermék'-e vagy sem. Újabb kísérleteink, melyek a kapszantin levegőn való oxidációját vizsgálják, kapszantont mint oxidációs terméket nem mutattak ki. Így feltételezhetjük, hogy a kapszanton nem az izolálás során keletkező műtermék.

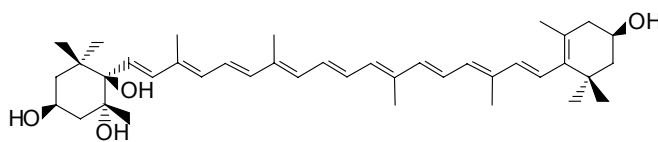
3. Egyéb növényi források vizsgálata 3,6-epoxi- β - és 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálására

Munkánk további részében újabb adatokat kívántunk nyerni a 3,6-epoxi-karotinoidok és a 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok más növényekben való előfordulására, konfigurációjára, hogy további felvilágosítást kapjunk a bioszintézisben betöltött szerepükre. Kiinduló feltevésünk az volt, hogy a (3*S*,5*S*,6*S*)-trihidroxi-végcsoportot tartalmazó karotinoidok keletkezése összefüggésbe hozható a κ -végcsoport biogenezésével. Így tehát olyan növényi forrásokat kerestünk, amelyek κ -végcsoportú karotinoidokat tartalmaznak. Az irodalomban kevés olyan növény szerepel, amelyben kapszantin, kapszorubin jelenlétét írták le, és Magyarországon is elérhető. Simpson és munkatársai [96] a spárga (*Asparagus officinalis*) bogyójának karotinoidanalízisét végezték el még a hetvenes években, és kapszantint (**1**) mutattak ki benne. Neamtu és munkatársai különböző vadgesztenye fajták (*Aesculus*) vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata során találtak a porzóban kapszantint (**1**), kapszantont (**XXXVII**), kapszorubint (**2**) és kapszorubont (**20**) [93,94]. Eugster és munkatársai pedig a tigris liliom (*Lilium tigrinum*) szirmában mutatták ki és izolálták a kapszantint (**1**) és különböző *cisz*-izomerjeit [83].

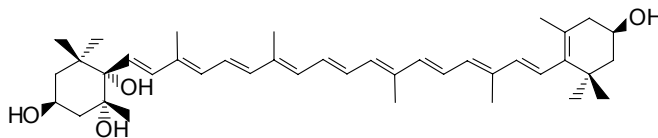
Így tehát ezeknek a növényeknek az újbóli, illetve egy újabb dísznövény az *Asparagus falcatus* bogyójának karotinoidanalízisét végeztük el, azzal a céllal, hogy 3,5,6-trihidroxi-, illetve 3,6-epoxi-karotinoidokat izoláljunk, és konfigurációjukat összehasonlítsuk a paprikából izolált vegyületekével.

3.1. Tigris liliom (*Lilium tigrinum*) [18*,19*]

Eugster és munkatársai a nyolcvanas évek közepén számoltak be a tigris liliom szirmának és porzójának részletes karotinoidanalíziséről [83] melynek során 29 karotinoidot különítettek el, és jellemezték. A fő komponens 9-*cisz*-anteraxantin, valamint a kapszantin és *cisz*-izomerjein kívül számos minor komponenst azonosítottak, többek közt karpoxantint (**9**) (3*S*,5*R*,6*R*)- és 6-epikarpoxantint (**10**) (3*S*,5*R*,6*S*)-konfigurációval. Extrém kis mennyiségben egy ismeretlen karotinoidot is izoláltak, amely feltehetően kapszokarpoxantin volt, azonban a konkrét szerkezetazonosítást nem végezték el. 3,6-Epoxi-karotinoidot nem tudtak kimutatni.



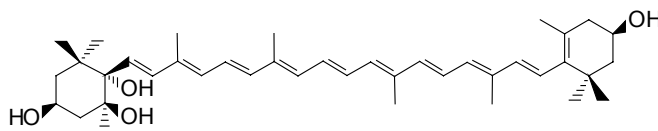
Karpoxantin (9)



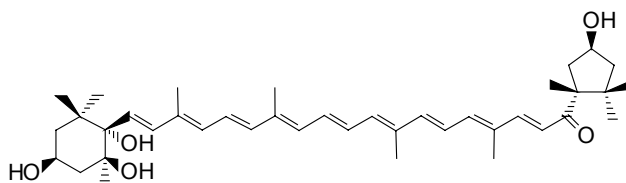
6-Epikarpoxantin (10 = XV)

Mivel az Eugster által izolált karpoxantin (9) konfigurációja nem egyezett meg a piros paprikából izolált vegyület konfigurációjával, így célul tűztük ki a lilium sziromban előforduló 3,5,6-trihidroxi-vegyületek izolálását is.

1100 g szirom metanolos extraktumát vizsgáltuk. A fő komponens 9-*cis*-anteraxantint - amelynek adszorpciós affinitása a célvegyületekéhez hasonló - a már korábban is alkalmazott megosztatással sikerült eltávolítani. Ismételt preparatív oszlop-kromatográfiával kapszorubin (2), kapszantin (1), kapszantin-5,6-epoxid (XVIII) és 9-*cis*-anteraxantin mellett 0,5 mg 5,6-diepikarpoxantint (XIV), 0,2 mg 6-epikarpoxantint (XV) és 0,2 mg 5,6-diepikapszokarpoxantint (XVII) izoláltunk.



5,6-Diepikarpoxantin (XIV)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol

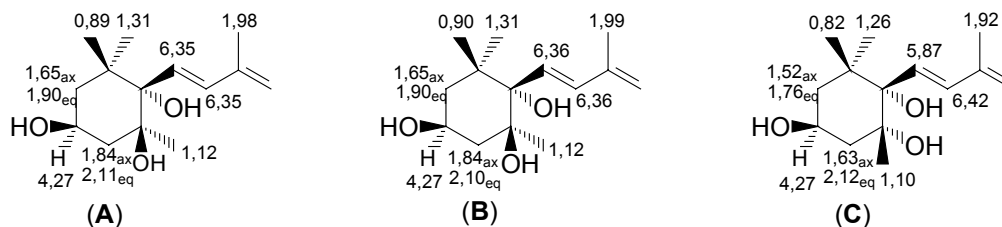


5,6-Diepikapszokarpoxantin (XVII)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-5,6-dihidro-3,5,6,3'-tetrahidroxi-β,κ-karotin-6'-on

Az izolált karotinoidok kis mennyisége csak MS, CD és ¹H-NMR (53. ábra) vizsgálatokat tett lehetővé, amelyek egyértelműen igazolták a 3,5,6-trihidroxi-vegyületek szerkezetét és konfigurációját.

Az izolált vegyületek konfigurációja - Eugsterrel ellentétben [83] - teljes mértékben megegyezett a korábban piros paprikából izolált vegyületekével, így azt a következtetést

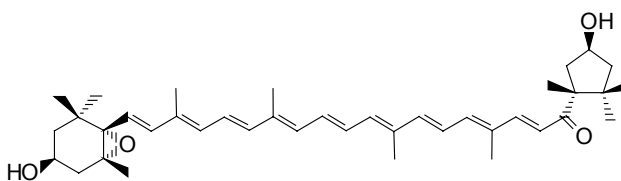
vontuk le, hogy azokban a növényekben, amelyek tartalmaznak κ -végcsoportú karotinoidokat, a 3,5,6-trihidroxi-vegyületek konfigurációja mindig (3*S*,5*S*,6*S*) (XIV), illetve (3*S*,5*R*,6*S*) (XV) [18*].



53. ábra. A lilomból izolált 5,6-diepikarboxantin (XIV, A), 5,6-diepikapszokarboxantin (XVII, B) és 6-epikarboxantin (XV, C) 3,5,6-trihidroxi-végcsoportjának $^1\text{H-NMR}$ adatai [18*]

Elvégeztük a többi frakció, illetve a tigris lilom porzójának karotinoidanalízisét is HPLC-vel, de 3,6-epoxi-karotinoidot nem sikerült egyik frakcióban sem kimutatnunk.

Kapszantin-5,6-epoxidot eddig csak piros paprikából izoláltak, és határozták meg szerkezetét [55]. Ezért a tigris lilom sziromból kristályos állapotban izolált kapszantin-5,6-epoxid szerkezet és konfiguráció meghatározását is elvégeztük (MS, CD, $^1\text{H-NMR}$) [19*].



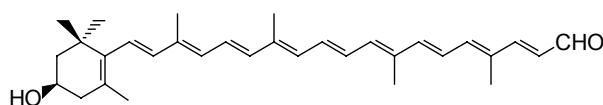
Kapszantin-5,6-epoxid (XVIII)
(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-5,6-epoxi-5,6-dihidro-3,3'-dihidroxi- β,κ -karotin-6'-on

Az 5,6-epoxi-végcsoport abszolút konfigurációja (3*S*,5*R*,6*S*)-nek bizonyult, amely összhangban van azzal, hogy a természetben mindig az *anti*-epoxidok fordulnak elő.

3.2. Vadgesztenye (*Aesculus*) virág porzójának vizsgálata [20*, 21*]

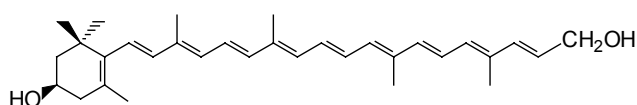
Román szerzők korábban különböző *Aesculus* fajták (*Aesculus parviflora*, *A. rubicunda*) porzójának főfestékét kapszantonnak írták le [93,94]. Mivel az analízist vékonyréteg-kromatográfiával, az azonosítást pedig csak UV-VIS spektroszkópiával végezték, így ésszerűnek tűnt az újbóli analízist elvégezni. HPLC analízissel megvizsgáltuk a fehér (*Aesculus hippocastanum*) és a piros virágú (*Aesculus pavia*) vadgesztenye rügyének, porzójának és szirmának karotinoid-összetételét. Már az analízis kezdetén kimutattuk, hogy a fő komponens nem kapszanton (XXXVII). Mintegy 250 g porzó extrakciójával sikerült 1,8 mg fő komponenst, 0,8 mg luteint és 0,5 mg β -citraurint

kristályos állapotban izolálnunk. Az ismeretlen vegyület UV-VIS spektruma közel megegyezett a kapszantonéval, és NaBH₄-es redukció hatására 20 nm-es hipszokrómm eltolódást szenvedett, amely egy dekaén kromoforra utalt, ami konjugált karbonilcsoporttal egészül ki. A molekulatömeg azonban csak 458-nak adódott, amely C₃₂H₄₂O₂, összegképletnek, azaz egy 6'-apo-karotinoidnak felel meg. Az acetilezési reakció egy primer vagy szekunder hidroxilcsoportra utalt. Az ¹H- és ¹³C-NMR adatok szerint az új vegyület (all-*E*,3*R*)-3-hidroxi-6'-apo-β-karotin-6'-al-nak bizonyult, melyet aesculaxantin-nak (**XXXVIII**) neveztünk el.



Aesculaxantin (**XXXVIII**)
(3*R*)-3-Hidroxi-6'-apo-β-karotin-6'-al

A 3-hidroxilcsoport konfigurációját a CD spektrum is alátámasztotta. A konzervatív CD görbe lefutása megegyezett a zeaxantinéval illetve a β-citraurinéval, amelyekben a 3-OH csoport konfigurációja *R*. Az aesculaxantin NaBH₄-es redukciójával előállítottuk a megfelelő hidroxil-vegyületet is, az aesculaxantolt (**XXXIX**) ((3*R*)-3-hidroxi-6'-apo-β-karotin-6'-ol) és elvégeztük spektroszkópai (UV-VIS, CD, NMR, MS) jellemzését is. Mivel izolálnunk ezt a vegyületet nem sikerült, így oszlop- kromatográfia és HPLC kombinálásával megpróbáltuk természetes előfordulását igazolni, ezt azonban egyértelműen nem tudtuk bizonyítani.



Aesculaxantol (**XXXIX**)
(3*R*)-3-Hidroxi-β-apo-6'-karotin-6'-ol

A két vadgesztenyefajta, a fehér virágú *Aesculus hippocastanum* és a piros virágú *Aesculus pavia* rügyének, porzójának és virágszirmának teljes karotinoidanalízisét is elvégeztük HPLC-vel [21*]. Mindkét fajtánál azonos karotinoid-összetételt találtunk. A rügyben luteint, a porzóban az aesculaxantint találtuk fő komponensként, ezenkívül β-karotint, β-kriptoxantint, a lutein *cisz*-izomerjeit, lutein-5,6-epoxidot, az aesculaxantin *cisz*-izomerjeit, β-citraurint, 9-*cisz*-violaxantint, 9-*cisz*-neoxantint és neoxantint

azonosítottunk, autentikus mintával történő összekromatografálással. A különböző színű és csíkozású szirmok is hasonló karotinoidokat tartalmaztak, a fő komponens luteinen, lutein-5,6-epoxidon és β -karotinon kívül neoxantint, 9-*cisz*-neoxantint, violaxantint, luteoxantint a lutein *cisz*-izomerjeit, valamint β -kriptoxantint. Egyik növényi szervben sem sikerült κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidot kimutatnunk. Vizsgálataink így azt erősítették meg, hogy szükség van a korábban csak UV-VIS spektrumuk alapján azonosított karotinoidok újbóli izolálására, és modern spektroszkópiás módszerekkel történő szerkezetvizsgálatára.

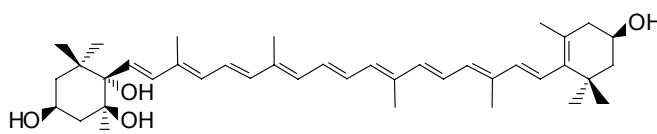
3.3. *Asparagus officinalis* bogyójának vizsgálata [22*]

A hetvenes évek közepén számoltak be Simpson és munkatársai a spárga (*Asparagus officinalis*) bogyójának vizsgálatáról [96]. Nagymértékű hasonlóságot találtak a piros paprika és a spárga bogyó kromoplasztjának szerkezetében, amely a karotinoid-összetételben is megmutatkozott. A karotinoidanalízist vékonyréteg-kromatográfiával végezték, így elhatároztuk, hogy elvégezzük a spárga bogyó HPLC analízisét is.

A rendelkezésre álló kis mennyiségű mintából csak oszlopkromatográfiával kombinált HPLC analízist tudtunk végezni. Így nemcsak a származékképzési reakciók (redukció, savazás) segítettek az azonosításban, hanem oszlopkromatográfia után az egyes frakciókat is részletesen tudtuk vizsgálni. Bár diódasoros detektor alkalmazásával és autentikus mintákkal való együttkromatografálással kapszantint (**1**), kapszantin-5,6-epoxidot (**XVIII**) és kapszorubint (**3**) ki tudtunk mutatni nagyobb mennyiségben, sem 3,5,6-trihidrox- sem 3,6-epoxi-karotinoidot nem tudtunk azonosítani.

3.4. *Asparagus falcatus* bogyójának vizsgálata [23*,24*]

Újabb kapszantin tartalmú növényi forrásokat keresve találtunk rá az *Asparagus falcatus* kerti dísznövényre, amely ősszel szép piros bogyókat érlel. A HPLC analízis azt mutatta, hogy az érett bogyók nagyobb mennyiségű kapszantint tartalmaznak, így elhatároztuk ennek vizsgálatát is. Közel 2 kg bogyót dolgoztunk fel, annak is a hipofázisos extraktumát vizsgáltuk. Kapszantin (**1**), kapszorubin (**3**), kapszantin-5,6-epoxid (**XVIII**), anteraxantin (**15**), mutatoxantin (**XXX**), és kapszokróm-epimer (**XXIII**) mellett csak 5,6-diepikarpoxantint (**XIV**) tudtunk izolálni kristályos állapotban.

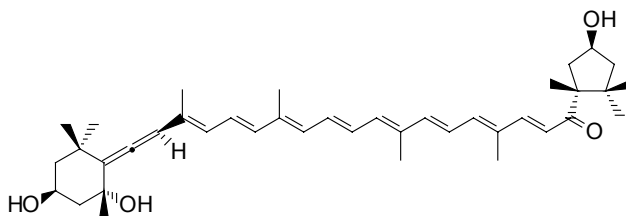


5,6-Diepikarpoxantin (**XIV**)

Az izolált vegyületek szerkezetazonosítását tömegspektrometriával, UV-VIS-, és ^1H -NMR spektroszkópiával igazoltuk. Az *asparagus* bogyóból izolált **XIV** vegyület 3,5,6-trihidroxi-végcsoportjának ^1H -NMR adatai teljes mértékben megegyeztek a 29. illetve az 53. ábrán feltüntetett értékekkel, amely egyértelműen igazolta a (3*S*,5*S*,6*S*) konfigurációt. Az 5,6-diepikarpoxantinból (**XIV**) összesen 0,2 mg-ot sikerült izolálni, így CD vizsgálatokat már nem tudtunk végezni. Nyomnyi mennyiségben kapszantont (**XXXVII**) is találtunk, amelyet azonban csak UV-VIS és tömegspektruma, valamint autentikus mintával való összekromatografálás alapján azonosítottunk [23*].

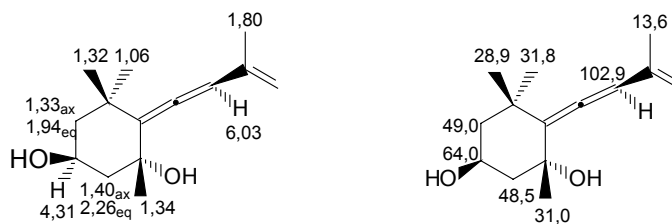
Egyéb 3,5,6-trihidroxi-, illetve 3,6-epoxi-karotinoidot HPLC kontrollált preparatív oszlop-kromatográfiával sem tudtunk kimutatni, sem a hipofázisos, sem az egyéb frakciókban.

Az oszlop-kromatográfiás elválasztás során, a legpolárosabb frakció HPLC kromatogramjában találtunk egy csúcsot, amelyet nem tudtunk azonosítani, és polaritása, valamint UV-VIS spektruma alapján új szerkezetű vegyületnek tűnt. Így többszöri, ismételt oszlop-kromatográfiás eljárással 1,1 mg kristályos anyagot izoláltunk. Az UV-VIS spektrumban 508 és 478 nm-nél találtunk maximumot, ami megfelel a kapszantin-5,6-epoxid spektrumának. Nem adott viszont reakciót savval, ami azt mutatta, hogy nem található 5,6-epoxi-végcsoport a vegyületben. A vegyület redukciója két sztereoizomer alkoholt adott, amely HPLC-vel elkülöníthető volt. A vegyület molekulatömege 600, ami a $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$ összegképletnek felelt meg. Így azt feltételeztük, hogy a κ -végcsoporton kívül egy allén-végcsoport található a molekulában. Az NMR mérések teljes mértékben megerősítették feltételezésünket, a κ - és az allén-végcsoport jelenlétét. A vegyületet kapszoneoxantinnek (**XL**) neveztük el [24*]. Eddig ilyen vegyület nem volt ismert a természetben. Mivel igen kis mennyiségű izolált anyag állt rendelkezésre, csak ^1H , ^1H , ^1H -COSY és ^{13}C - ^1H HSQC méréseket tudtunk végezni. Így azoknak a szénatomoknak az eltolódás értékeit tudtuk megadni, amelyek hidrogént tartalmaznak (54-55. ábra).

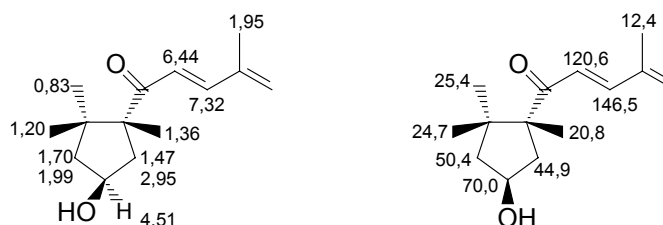


Kapszoneoxantin (**XL**)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,5,3'-Trihidroxi-5,6-dihidro-6,7-didehidro- β , κ -karotin-6'-on



54. ábra. A kapszoneoxantin (XL) allén végcsoportjának ^1H - és ^{13}C -NMR adatai [24*]



55. ábra. A kapszoneoxantin (XL) κ -végcsoportjának ^1H - és ^{13}C -NMR adatai [24*]

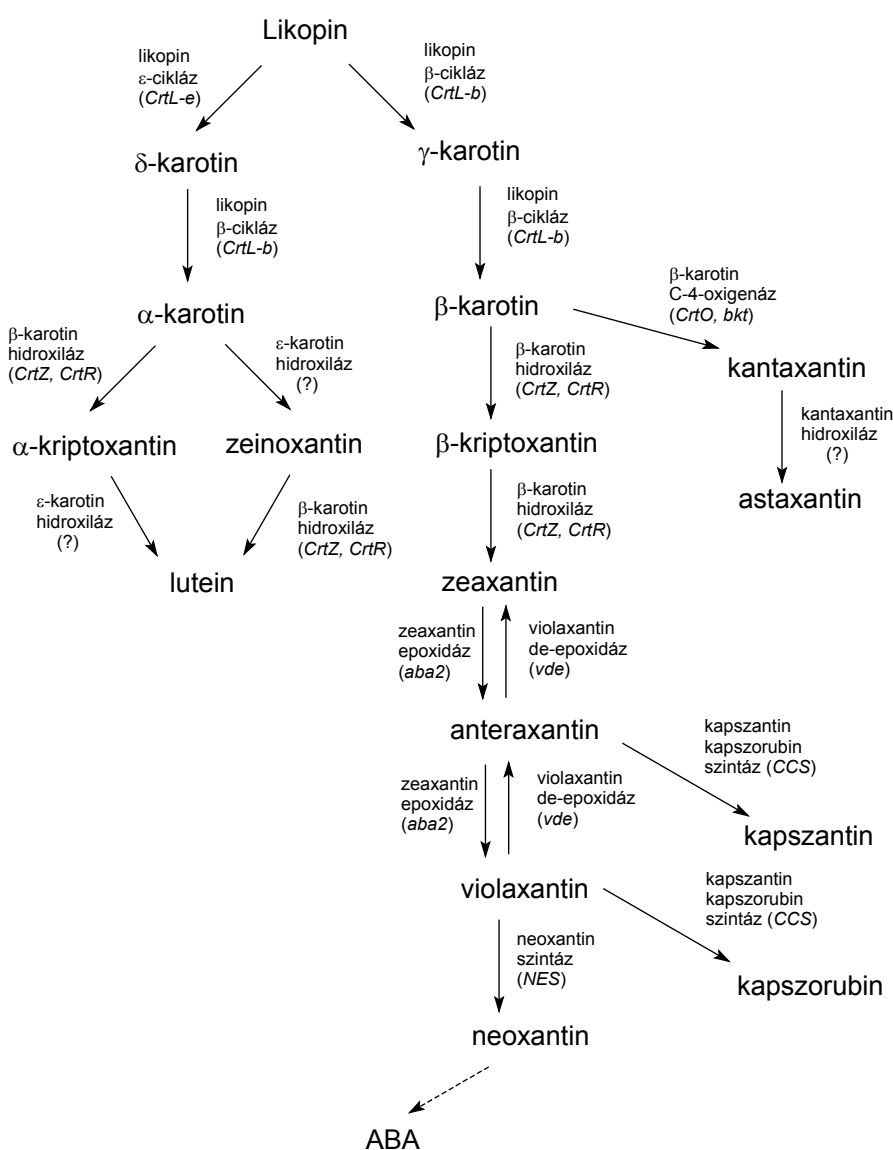
A kapszoneoxantin CD spektruma éppen ellentétes volt a neoxantinével. A neoxantin CD spektrumát a 3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoport szabja meg [97], így az allén-végcsoport konfiguráció kijelölése ennek alapján nem végezhető el. Segített viszont az ^1H -NMR. A H-C(8) allén proton jele (6.03 ppm) jó egyezést mutatott a Baumeler és Eugster által [98] a (6*R*)-neoxantinra megadott értékkel. Eddig minden természetes forrásból izolált allén-végcsoportot tartalmazó karotinoid (neoxantin, fukoxantin, peridin) (6*R*)-konfigurációval rendelkezett, a (6*S*)-epimert csak izomerizációval lehet előállítani [99,100]. Így az allén-végcsoportra a (3*S*,5*R*,6*R*)-konfigurációt javasoljuk a kapszoneoxantinban is.

A kapszoneoxantin bioszintézisére két út feltételezhető: *a*) a violaxantinból először neoxantin keletkezik, és ennek 5,6-epoxi-csoportjának pinakolin átrendeződése eredményezi a kapszoneoxantint; *b*) a violaxantinból először kapszantin-5,6-epoxid, majd ebből keletkezik a kapszoneoxantin. Mind a piros paprikában, mind a tigris liliomban nagy mennyiségben találtunk kapszantin-5,6-epoxidot, de nem találtunk kapszoneoxantint. Így azt feltételezzük, hogy az *a*) út a valószínűbb [24*].

Az *asparagus* bogyó legpolárosabb frakciójából még egy minor komponenst, a 9-*cisz*-kapszantin-5,6-epoxidot (9*Z*-XVIII) is izoláltunk, melynek szerkezetazonosítása azonban nem tartozik az értekezés tárgykörébe [9[#]].

4. A paprikakarotinoidok bioszintézise

A karotinoidok bioszintézise már régóta izgatja a kutatók fantáziáját. A bioszintézis közbenső lépéseinek jelölt prekursorokkal, specifikus inhibitorokkal való vizsgálata néhány évtizedes múltra tekint vissza. Az enzimek izolálását megnehezíti, hogy többnyire a membránhoz kötöttek, nagyon érzékenyek és könnyen elbomlanak a tisztítás során. Így csak az utóbbi 20-25 évben sikerült az izolálást, szekvencia meghatározást megvalósítani. Azóta viszont számos enzim szerkezetét sikerült tisztázni. A bioszintézis korai lépéseiben szereplő enzimek szerkezete is ismeretes, de mivel minket csak a késői bioszintetikus lépések érdekelnek, így az ezekben résztvevő enzimeket mutatom be az 56. ábrán [98]:



56. ábra. A karotinoidok bioszintézisének lehetséges útjai, és az azokat katalizáló enzimek [98]

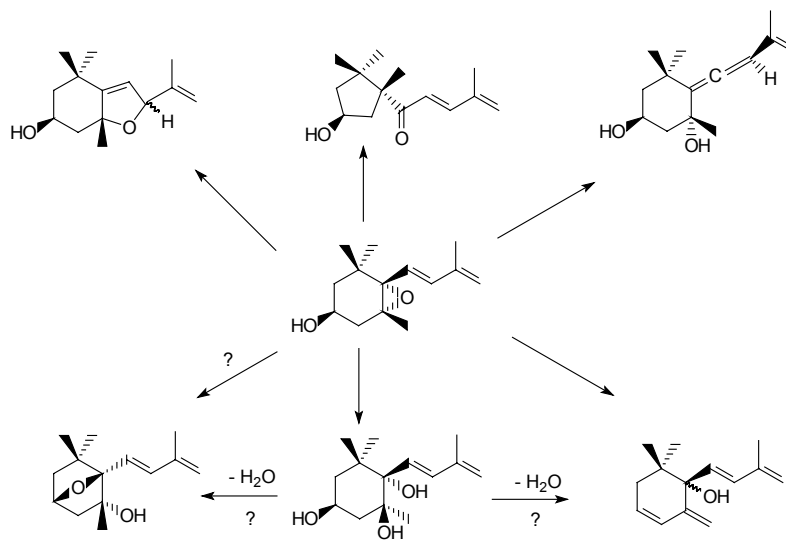
A magasabbrendű növényekben a likopin ciklizációja az első fontos lépés a karotinoidok bioszintézisében. A ciklizáció során főként ϵ - és β -végcsoporthoz keletkezik, ritkábban γ -végcsoporthoz. A reakció mechanizmusát az 50. ábra foglalja össze. A két β -végcsoporthoz tartozó β -karotin keletkezését egy enzim, a likopin β -cikláz katalizálja, míg az α -karotin képződéséhez két különböző enzimre, a likopin β -ciklázra és a likopin ϵ -ciklázra van szükség [99]. Az éretlen sárga és piros paprikában mindkét enzim jelen van, a kloroplaszt fő karotinoidjai a lutein és a β -karotin. A piros paprikában, a klorofill eltűnésével és a karotinoid bioszintézisnek a kromoplasztba való áttevődésével egyidejűleg az ϵ -cikláz működése fokozatosan megszűnik, a lutein mennyisége csökken, végül már nem is detektálható [2*-5*]. Ezzel szemben a sárgára érő paprikákban (pl. sárga paradicsom-paprika) a kromoplasztban is képződnek ϵ -végcsoporthoz tartozó karotinoidok, így nagy mennyiségben keletkezik α -karotin és α -kriptoxantin [1*]. Camara és munkatársai [100] a likopin β -ciklázot izolálták piros paprikából, a likopin ϵ -ciklázot azonban a mai napig nem sikerült még izolálni.

A bioszintézis következő lépése a xantofillok (oxigén tartalmú karotinoidok: hidroxi- és epoxi-karotinoidok) képződése. A zeaxantin és a lutein a β -karotin (β,β -karotin), illetve az α -karotin (β,ϵ -karotin) 3- és 3'-szénatomjának hidroxilezésével keletkezik. A hidroxilázok nyilvánvalóan specifikusak a β -, illetve ϵ -végcsoporthoz, hiszen a 3-, illetve 3'-hidroxi-csoport konfigurációja is ellentétes a luteinben [101-103]. Bouvier és munkatársai [103] azt találták, hogy a paprikában a β -kriptoxantin hidroxilálását végző enzim ferredoxin függő, és működését erősen gátolják a vas kelátok. Mechanizmusukat tekintve mindkét enzim a vas által aktivált oxigént építi be a szén és hidrogén közé.

A zeaxantin epoxidálásával először anteraxantin (monoepoxid), majd violaxantin (diepoxid) keletkezik. Az epoxidálást végző enzim egy ún. kevert funkciójú oxigenáz. Camara és munkatársai szerint az általuk piros paprikából izolált ciklohexenil-epoxidáznak csak a zeaxantin és az anteraxantin a szubsztrátja, de nem epoxidálja a lutein β -végcsoportját [104].

Az 1996-ban megjelent közleményünkben [4*] felvázoltuk a karotinoid-5,6-epoxidok átalakulásainak lehetséges útjait a piros paprikában (57. ábra). Ezek közül a legfontosabb a pinakolin átrendeződés, amely a κ -végcsoporthoz eredményezi. További átalakulások a furanoidoxid reakció, az allén-végcsoporthoz kialakulása, az endoepoxid átrendeződés és a gyűrűnyílás, mely a 3,5,6-trihidroxi-vegyületeket adja. Itt jegyzem meg,

hogy a [4*] irodalomban a 6. ábrán a 3,5,6-trihidroxi-végcsoport konfigurációját még helytelenül adtuk meg.



57. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport lehetséges átalakulásai a piros paprikában [4*]

Az éretlen piros és sárga, valamint az érett sárga paprikában is mindig megtalálható a neoxantin. Ez az allén végcsoportot tartalmazó vegyület a violaxantinból keletkezik, az átalakulását katalizáló enzimet a neoxantin-szintázét éppen az elmúlt évben sikerült a francia kutatóknak izolálniuk [105].

A 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok képződésére vonatkozó elképzelésünket a 2.3. fejezetben (47. ábra) már részletesen kifejtettem. Hogy elméletünket biokémiai bizonyítékokkal is alátámasszuk, felvettük a kapcsolatot Bilal Camara munkacsoportjával, akik a kapszantin-kapszorubin-szintáz izolálták. 3,5,6-Trihidroxi- β -, 3,6-epoxi- β - és γ -végcsoporthoz tartozó karotinoidokat adtunk referencia és teszt anyagként. Különböző epoxidokat (anteraxantin, violaxantin, kapszantin-5,6-epoxid) kapszantin-kapszorubin-szintáz enzimmel inkubálva két óra hosszat, a reakció elegyben 2-5% mennyiségben találtak 5,6-diepikarpoxantint (XIV), 5,6-diepilatoxantint (XVI) és 5,6-diepikapszokarpoxantint (XVII), miközben a megfelelő κ -végcsoporthoz tartozó karotinoid (kapszantin (1), kapszantin-5,6-epoxid (XVIII) és kapszorubin (2)) is keletkezett 5-10%-os mennyiségben (táblázat).

3,6-Epoxi-karotinoidokat nem tudtak kimutatni egyik esetben sem. Ha kiindulási anyagként 3,5,6-trihidroxi-karotinoidot választottak, akkor sem κ -, sem 3,6-epoxi- β -végcsoportot tartalmazó vegyület nem keletkezett. Ez arra utal, hogy a 3,5,6-trihidroxi-

karotinoidok nem átmeneti termékei a pinakolin átrendeződésnek, hanem melléktermékei. Nigroxantint (γ -végcsoport) egyik esetben sem találtak az inkubáció során. A kollaboráció során nyert eredményeket eddig még nem közöltük.

<u>Kiindulás</u>		<u>Átalakulás</u>
Anteraxantin	1,5% 5,6-diepikarpoxantin	10% kapszantin
Violaxantin	2% 5,6-diepilatoxantin	5% kapszantin 5,6-epoxid
Kapszantin 5,6-epoxid	7,5% 5,6-diepikapszokarpoxantin	* kapszorubin

100 μ M CPTA teljesen meggátolta a reakciót mindhárom esetben.

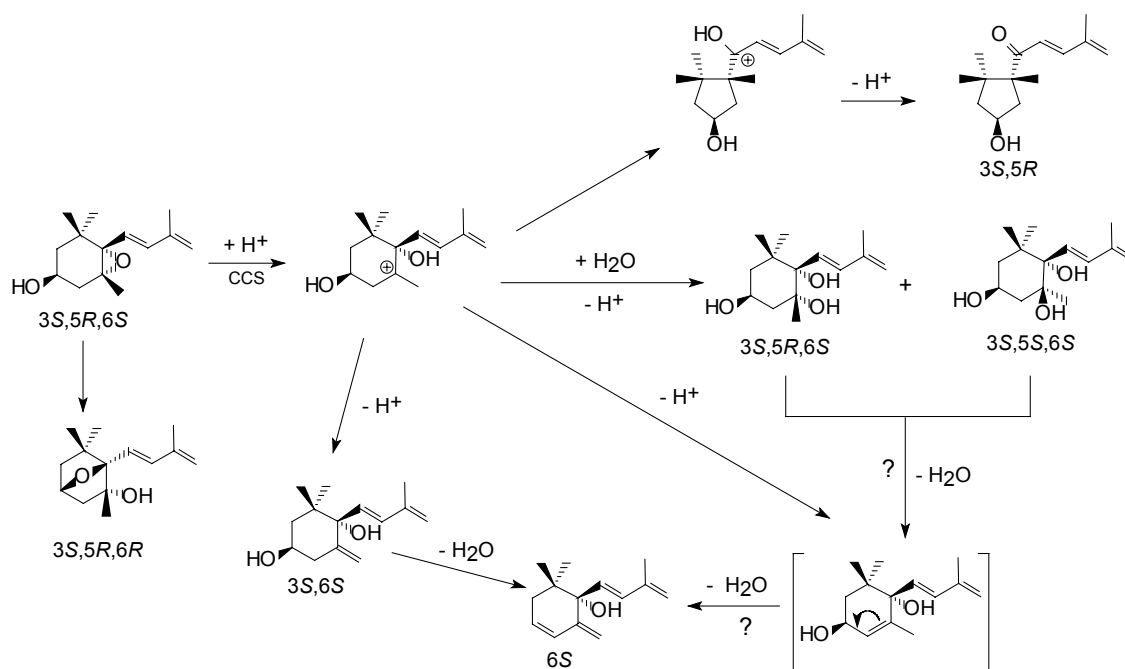
Kísérleti körülmények: 1 mg Tween 80 acetonos oldata szárazra párolva, a maradék 50 mM Tris-HCl-ben, (pH=7,6) emulzifikálva, ebben 100 μ mol karotinoid oldva. Inkubációs idő: 2 óra.

* nincs megadva

Az a tény, hogy az enzim kísérletek során a 3,6-epoxi-karotinoidok keletkezése nem volt kimutatható, megerősíti azt a feltevésünket, hogy ezek a vegyületek más úton, sav hatására történő gyűrűnyílás során keletkeznek (45. ábra). Mivel a sárgára érő paprikákban sosem sikerült 3,6-epoxid-karotinoidokat kimutatnunk, annak ellenére sem, hogy nagy mennyiségű 5,6- és 5,8-epoxidot tartalmaznak, így véleményünk szerint a 3,6-epoxi-gyűrű kialakulását a karbóniumionból egy enzimnek kell katalizálnia. Erre utal az is, hogy a piros paprikákban [2*-4*] a mutatoxantin-epimerek aránya sohasem egyezett meg a sárga paprikában [1*] találttal, vagy a „savazás” hatására keletkezett műtermékek arányával. Ezt az arány eltolódást is csak egy enzimatis hatása magyarázhatja.

A γ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok - amint azt már részletesen kifejtettem a 2.4. fejezetben - szintén a kapszantin-kapszorubin-szintáz enzim hatására képződő C(5) karbóniumionból keletkezhetnek. Annak tisztázása, hogy a nigroxantin 5,6-diepikarpoxantinból, 6-epikarpoxantinból, vagy a prenigroxantinból keletkezik-e, további enzim vizsgálatokat igényel.

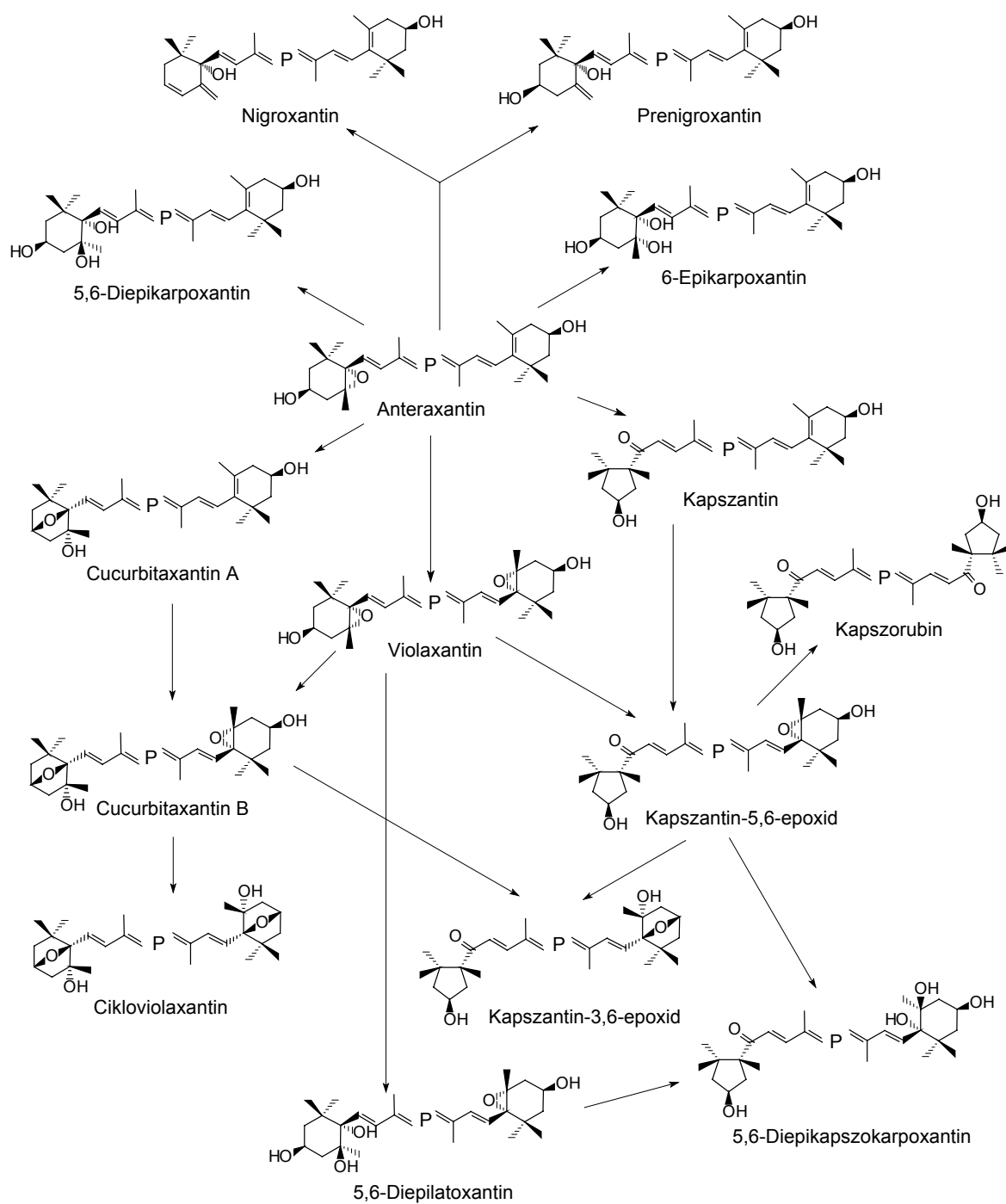
Javaslatunkat a karotinoid-5,6-epoxidok lehetséges átalakulásaira a piros paprikában a 58. ábra foglalja össze [3*,27*]:



58. ábra. A karotinoid-5,6-epoxidok lehetséges átalakulásai a piros paprikában [3*,27*]

Az általunk izolált vegyületeket beillesztettük a Davies-Szabolcs-féle bioszintézis sémába. Amint az 59. ábrán látható, a legtöbb izolált vegyület az anteraxantinból keletkezik. Ez nem meglepő, hiszen a bioszintézis során az anteraxantin – a fő komponens, a kapszantin prekuzora – keletkezik a legnagyobb mennyiségben. Így a belőle közvetlenül keletkező minor komponensek dúsulhatnak fel a legnagyobb mennyiségben.

A bioszintézis sémát alapul véve nyilvánvalónak tűnik, hogy a piros paprikában jelen kell lennie több, eddig még nem izolált minor komponensnek is. Így például további, (3S,5R,6S)-trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidnak, mint a 6-epilatoxantinnak, vagy a 6-epikapszokarpoxantinnak amelyek a violaxantinból illetve a kapszantin-5,6-epoxidból keletkezhetnek. Ugyanígy, igen kis mennyiségben de jelen lehetnek olyan γ-végcsoportot tartalmazó karotinoidok is, amelyek másik végcsoportja 5,6-epoxi-, vagy κ-végcsoport. Ezeknek a vegyületeknek az izolálása az eddig alkalmazott technikákkal azonban már lehetetlennek tűnik.



59. ábra. Paprikakarotinoidok lehetséges bioszintézise

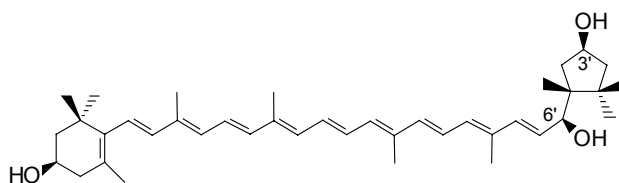
V. Kitekintés

Az elmúlt évtizedben a karotinoidokkal kapcsolatos kutatások minőségi változáson mentek keresztül. Míg 1934-ben Zechmeister monográfiájában [109] 11 karotinoid szerkezetét írta le, ez a szám 1948-ra 31-re emelkedett a Karrer és Jucker által írt kézikönyvben [110]. Otto Isler 1971-ben kiadott „Carotenoids” című könyvében [73] már 230 ismert konstitúciójú vegyületről számol be, melyek közül 25-nek ismerték az abszolút konfigurációját is. Az 1987-ben kiadott „Key to Carotenoids” [111] már kb. 450 karotinoidot referál, amelyek közül 135-nek az abszolút konfigurációja ismert. Ez a szám 1993-ra mintegy 600-ra emelkedett, a közeljövőben publikálásra kerülő harmadik kiadás pedig már kb. 700 természetből izolált karotinoid szerkezetét közli. Ez a nagymértékű növekedés elsősorban az elválasztás-technika és a műszeres analitikai módszerek rohamos fejlődésének köszönhető.

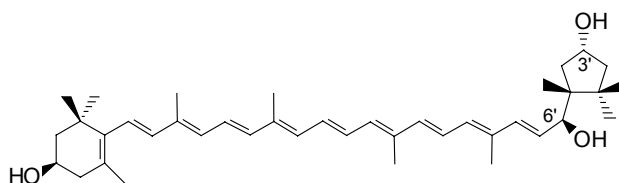
A karotinoidok szerkezetazonosítása és szintézise, azaz a klasszikus kémiai módszerek mellett a hetvenes évektől kezdve egyre inkább tért hódított a karotinoidok bioszintézisének a felderítése. Ezenkívül előtérbe került a karotinoidok biológiai aktivitásának a vizsgálata is. Három területet szokás elkülöníteni, nevezetesen a karotinoidoknak a biológiai rendszerekben játszott szerepüket (*function*), a biológiai rendszerekre kifejtett hatásukat (*effect*), és végül azon funkcióikat (*action*), amelyek kapcsolatban vannak a karotinoidbevitellel vagy a szérumszinttel. Napjainkban, a nagyhírű és régóta működő kutatócsoportok (Weedon, London; Eugster, Zürich; Pfander, Bern; Liaaen-Jensen, Trondheim) megszűnése, a biokémiai és biológiai vizsgálatok előtérbe kerülése miatt a klasszikus karotinoidkémiai kutatások egyre inkább háttérbe szorulnak. Amíg 1993-ban a Trondheimben megtartott 10th *International Carotenoid Symposium* előadásai és poszterei között a klasszikus karotinoidkémia még kb. 30%-os arányt képviselt, addig az 1999-ben Cairnsben megtartott konferencián már a 10%-ot sem érte el. Ez a tendencia késztetett minket is arra, hogy a természetben előforduló karotinoidok izolálásán, szerkezetmeghatározásán kívül, más kutatási terület felé is forduljunk. Az egyik lehetséges kutatási irány a karotinoidok prooxidáns hatásával kapcsolatos. A karotinoidok védőhatásuk kifejtése közben szerkezeti változásokat szenvedhetnek, amely következtében antioxidáns hatás helyett prooxidáns hatást fejtenek ki. Jelentősnek tűnik így a zöldségfélékben és gyümölcsökben a tárolás, feldolgozás [13[#]] során bekövetkező karotinoid-összetétel változásának nyomonkövetése, a keletkező műtermékek izolálása és szerkezetük meghatározása.

A másik ígéretesnek tűnő terület a karotinoidok szupramolekuláris szerveződése. A következőkben az e területen, az ún. „self-assembly” jelenség kapcsán, a KKKI Molekulárfarmakológiai Osztály munkatársaival közösen elért eredményeinket vázolom fel, ezzel mintegy kitekintést adva egy eddig még kevés figyelmet kapott témára.

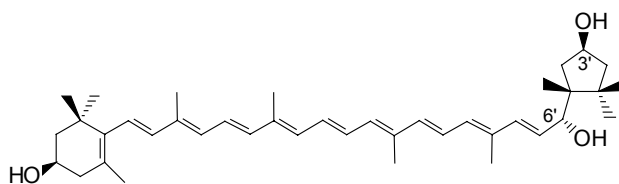
A κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok különböző fémhidridekkel való redukciójának tanulmányozása során [4[#], 12[#]], (3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)- (**21**), (3*R*,3'*R*,5'*R*,6'*S*)- (**22**), (3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)- (**23**), és (3*R*,3'*R*,5'*R*,6'*R*)-kapszantolt (**24**) állítottunk elő (3*R*,6'*S*)- (**25**) és (3*R*,6'*R*)-kapszantol-3'-onból (**26**) [4[#]]. A (3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)- (**21**) és (3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-kapszantolt (**23**) a kapszantin (**1**) NaBH₄-el végzett redukciójával Szaboics és munkatársai [95] már korábban előállították, ezek Oppenauer oxidációjával pedig az általunk kiindulási vegyületként alkalmazott (6'*S*)- és (6'*R*)-kapszantol-3'-ont (**25**, **26**) nyerték.



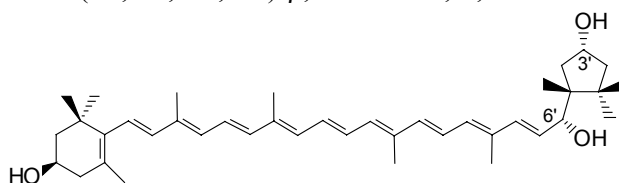
(3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-kapszantol (**21**)
(3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)- β , κ -karotin-3,3',6'-triol



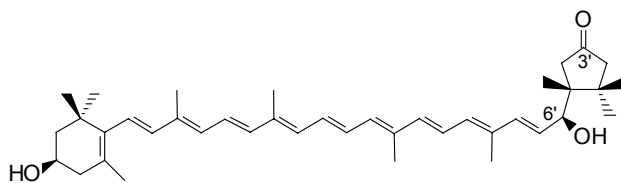
(3*R*,3'*R*,5'*R*,6'*S*)-kapszantol (**22**)
(3*R*,3'*R*,5'*R*,6'*S*)- β , κ -karotin-3,3',6'-triol



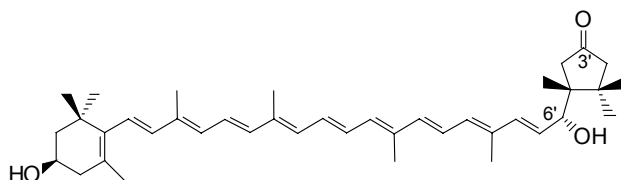
(3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-kapszantol (**23**)
(3*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)- β , κ -karotin-3,3',6'-triol



(3*R*,3'*R*,5'*R*,6'*R*)-kapszantol (**24**)
(3*R*,3'*R*,5'*R*,6'*R*)- β , κ -karotin-3,3',6'-triol



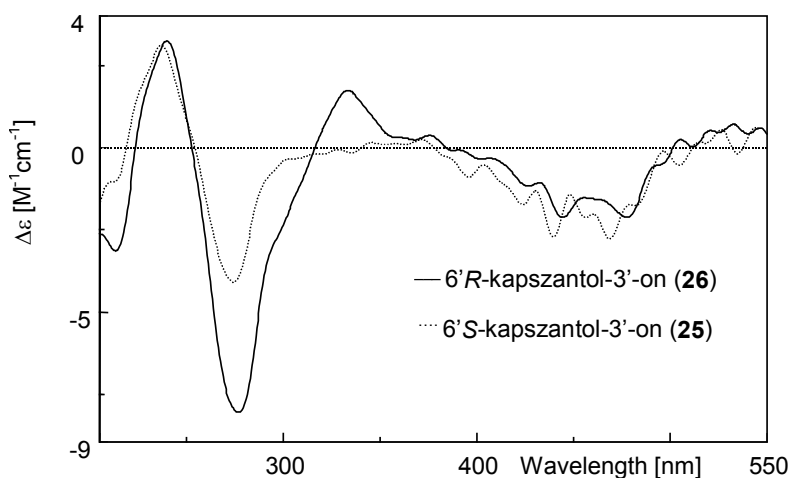
(3*R*,5'*R*,6'*S*)-kapszantol-3'-on (**25**)
(3*R*,5'*R*,6'*S*)-3,6'-dihidroxi-β,κ-karotin-3'-on



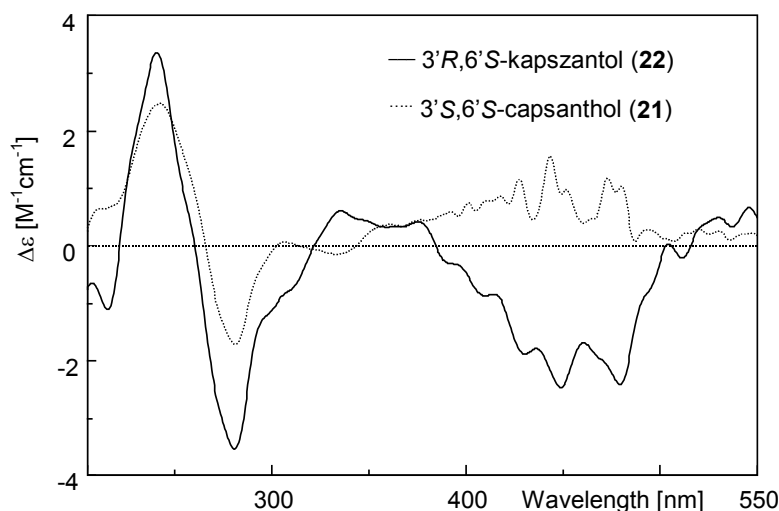
(3*R*,5'*R*,6'*R*)-kapszantol-3'-on (**26**)
(3*R*,5'*R*,6'*R*)-3,6'-dihidroxi-β,κ-karotin-3'-on

A kiindulási vegyületek és a termékek szerkezetazonosítását $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ és CD-spektroszkópiával valamint tömegspektrometriával végeztük el.

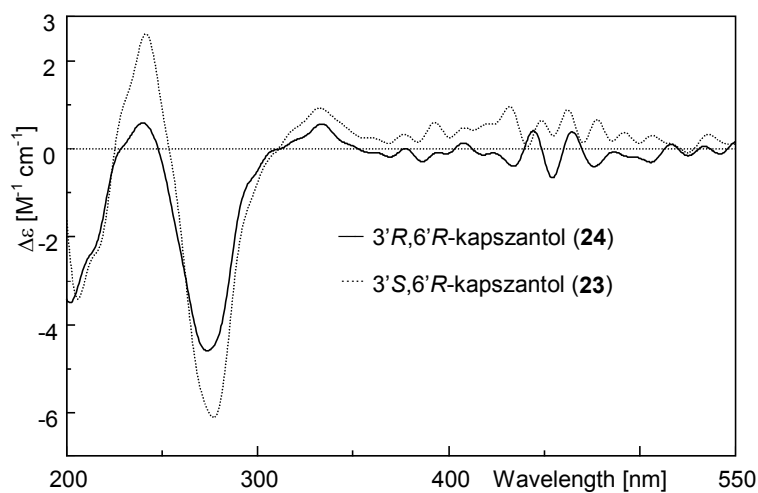
Etanolos oldatban mind a kiindulási anyagok (**25**, **26**), mind a termékek (**21-24**) a 300 nm alatti tartományban hasonló lefutású CD-görbét adtak, függetlenül a 3'- és a 6'-szénatom konfigurációjától (59-61. ábra) [4[#]].



59. ábra. A kapszantol-3'-on-ok CD spektruma etanolban



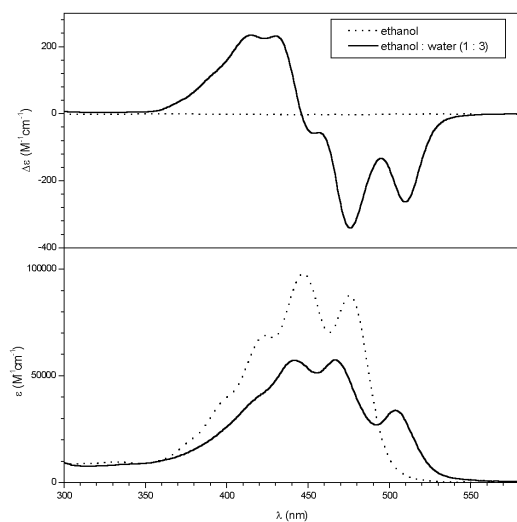
60. ábra. A (6'S)-kapszantolok CD spektruma etanolban



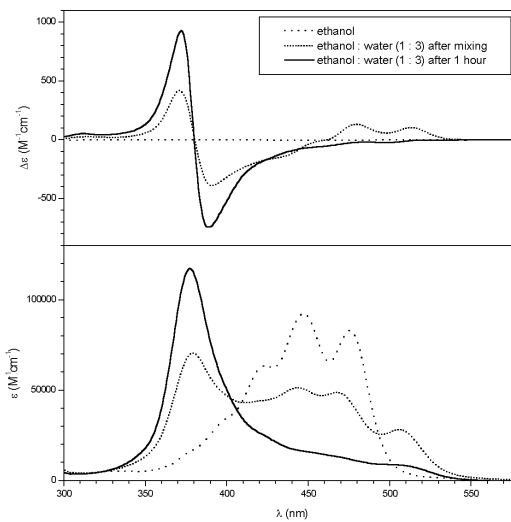
61. ábra. A (6'R)-kapszantolok CD spektruma etanolban

Az UV-VIS és CD spektroszkópai vizsgálatokat víz-etanol 3:1 arányú keverékében végezve azonban nagymértékű változást tapasztaltunk (62. ábra). A (6'S)-kapszantol-3'-on (25) UV-VIS spektruma a magasabb hullámhosszak felé tolódott el, míg a (6'R)-epimeré (26) az alacsonyabb hullámhossz felé. A CD spektrumban pedig az eltolódáson kívül a jel olyan nagymértékű megerősödését tapasztaltuk, hogy közös léptékben ábrázolva az előzőekben bemutatott etanolos spektrumok alapvonallá zsugorodnak [5[#]].

Hasonló jelenséget tapasztaltunk a kapszantol-epimerek (21-24) esetén is. A spektrum eltolódásának irányát csak a 6'-szénatom konfigurációja szabta meg, és nem befolyásolta a 3'-szénatom konfigurációja (63-64. ábra) [10[#]].

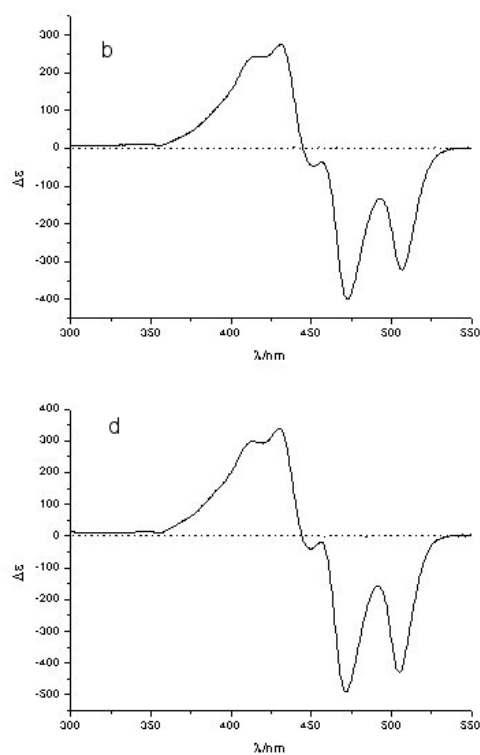
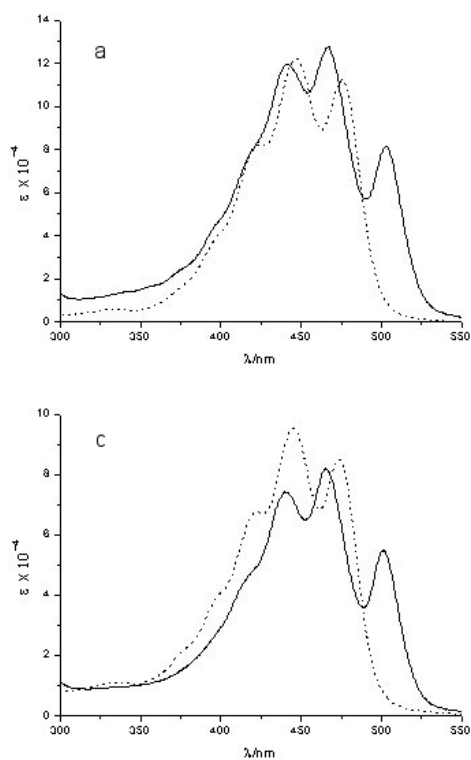


(6'S)-kapszantol-3'-on (25)

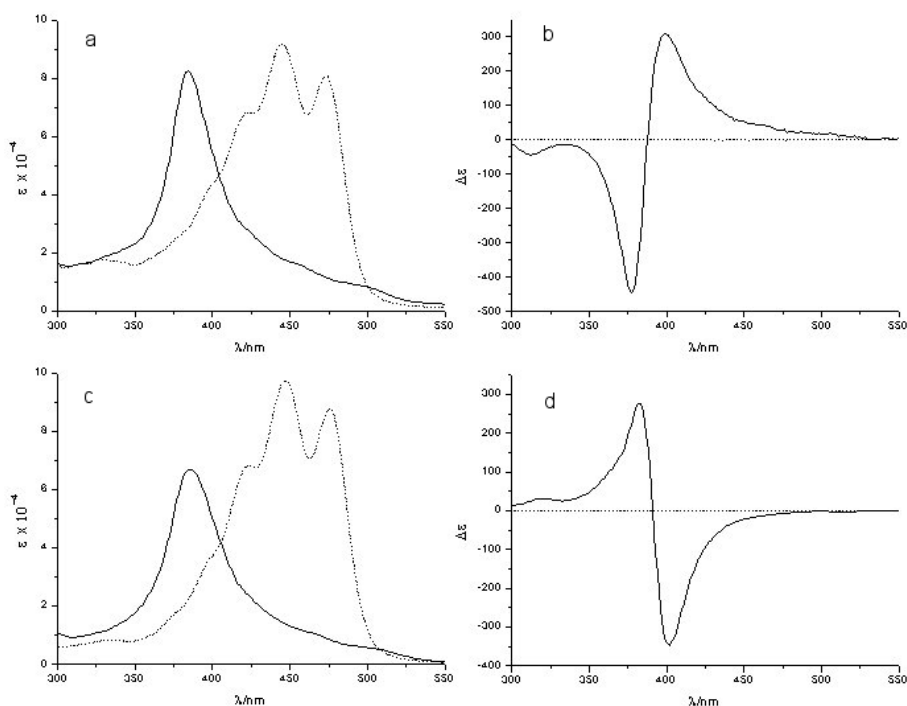


(6'R)-kapszantol-3'-on (26)

62. ábra. (6'S)- (25) és (6'R)-kapszantol-3'-on (26) CD és UV-VIS spektrumai víz-etanol (3:1) elegyében illetve etanolban [5[#]]



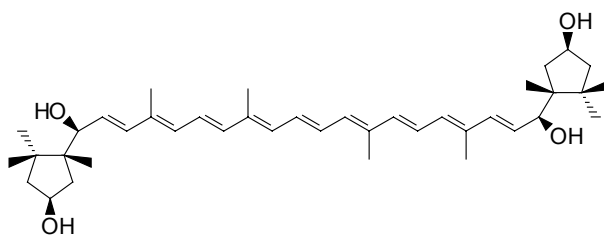
63. ábra. A (3'R,6'S)- (22; a,b) és a (3'S,6'S)-kapszantol (21; c,d) UV-VIS és CD spektruma etanolban (····) és víz-etanol (3:1) elegyében (—) [10[#]]



64. ábra. A (3'R,6'R)- (**24**; **a,b**) és a (3'S,6'R)-kapszantol (**23**; **c,d**) UV-VIS és CD spektruma etanolban (····) és víz-etanol (3:1) elegyében (—) [10[#]]

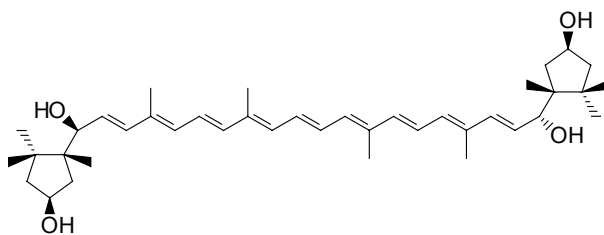
A jelenséget a karotinoidoknak a víz hatására bekövetkező aggregációjával lehet értelmezni. A karotinoidok erősen hidrofób jellegű molekulák. Szerves oldószerekben (etanol, aceton stb.) molekuláris oldatot képeznek, ami vizes hígítás hatására hidrofób aggregátum képződéséhez vezet. A karotinoid szupramolekulát intermolekulás van der Waals kölcsönhatások tartják össze. Az aggregátumok királisak, mivel a királis karotinoid-molekulák nem képesek egymással párhuzamosan elrendeződni. A végcsoportok kiralitása a molekulák jobbos, ill. balos átfedését kedvezményezi és ez az aggregátumban megsokszorozódik azáltal, hogy az aggregátumhoz csatlakozó molekulák követik a megkezdett irányt. Az ún. „card-pack” (H-típusú) aggregáció az UV-VIS és a CD spektrum alacsonyabb hullámhossz felé való eltolódását eredményezi, míg a „head-to-tail” (J-típusú) a magasabb hullámhossz felé tolja el a spektrumot. Mindkét típusú szerveződés a CD spektrumban erős exciton jelet (ellentétes előjelű sávpárt) eredményez.

Vizsgálatainkhoz további tesztanyagokat állítottunk elő. Kapszorubin (**2**) redukciójával három kapszorubol epimert ((6*S*,6'*S*; **27**), (6*S*,6'*R*; **28**), (6*R*,6'*R*; **29**)) és két kapszorubol-6'-on epimert ((6*S*; **30**), (6*R*; **31**)), míg kriptokapszin redukciójával két kriptokapszol epimert ((6'*S*; **32**), (6'*R*; **33**)) kaptunk [12[#]].



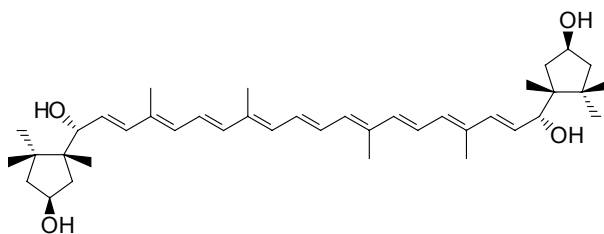
(6*S*,6'*S*)-Kapszorubol (**27**)

(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-κ,κ-karotin-3,6,3',6'-tetrol



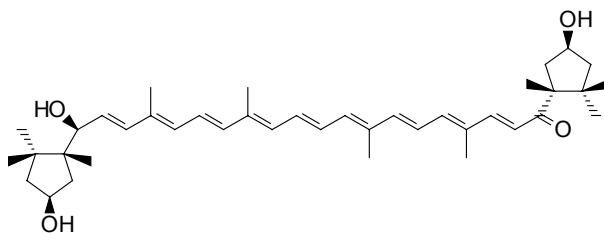
(6*S*,6'*R*)-Kapszorubol (**28**)

(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-κ,κ-karotin-3,6,3',6'-tetrol



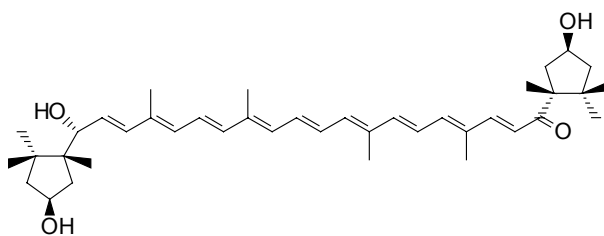
(6*R*,6'*R*)-Kapszorubol (**29**)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-κ,κ-karotin-3,6,3',6'-tetrol



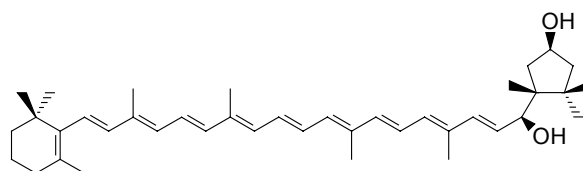
(6*S*)-Kapszorubol-6'-on (**30**)

(3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)-3,6,3'-trihidroxi-κ,κ-karotin-6'-on

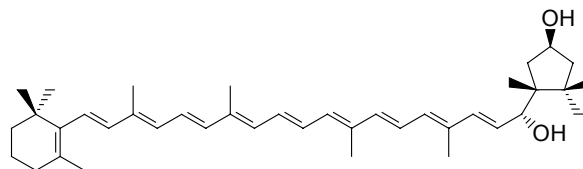


(6*R*)-Kapszorubol-6'-on (**31**)

(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6,3'-trihidroxi-κ,κ-karotin-6'-on

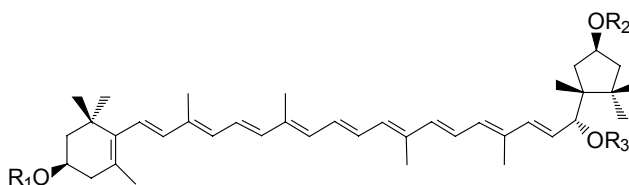


(6'*S*)-Kriptokapszol (**32**)
(3'*S*,5'*R*,6'*S*)-3,6,3'-β,κ-karotin-3'6'-diol



(6'*R*)-Kriptokapszol (**33**)
(3'*S*,5'*R*,6'*R*)-3,6,3'-β,κ-karotin-3'6'-diol

A (6'*R*)-kapszantol-3,3',6'-triacetát (**34**) NaBH₄-el végzett dezacetilezésével előállítottuk a (6'*R*)-kapszantol (**23**) összes lehetséges mono- és diacetil származékait is (**35-40**) [19[#]].

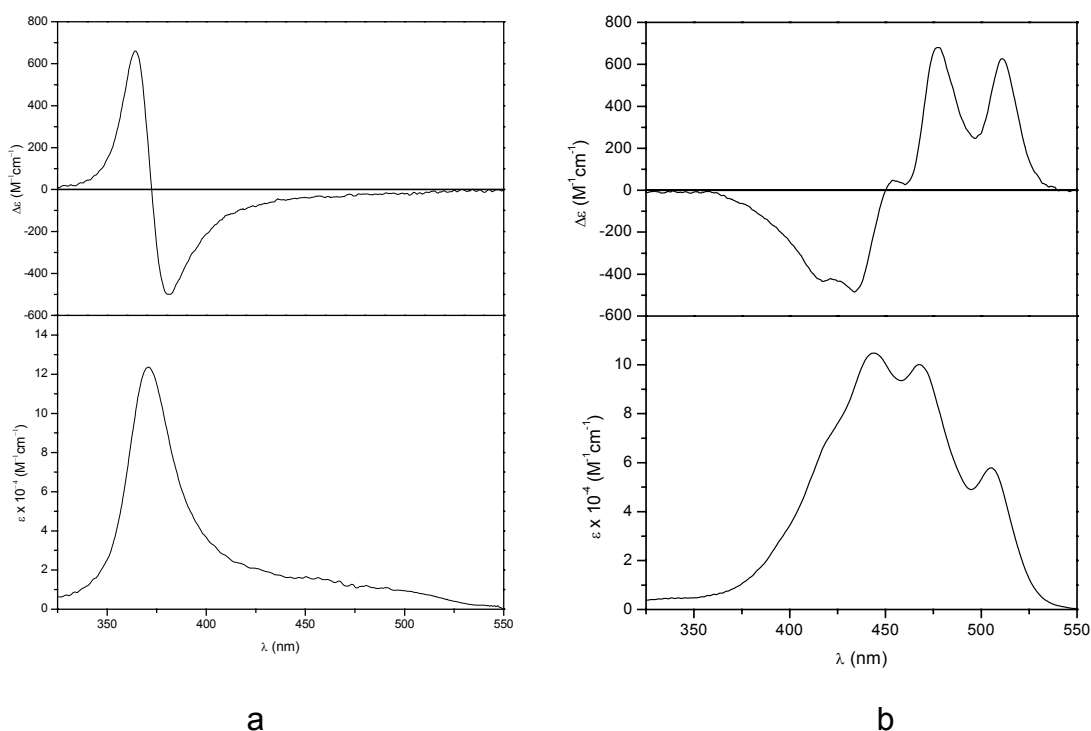


- 23:** R₁ = R₂ = R₃ = H
34: R₁ = R₂ = R₃ = COCH₃
35: R₁ = R₂ = COCH₃; R₃ = H
36: R₁ = R₃ = COCH₃; R₂ = H
37: R₁ = H; R₂ = R₃ = COCH₃
38: R₁ = R₂ = H; R₃ = COCH₃
39: R₁ = COCH₃; R₂ = R₃ = H
40: R₁ = R₃ = H; R₂ = COCH₃

Az előállított vegyületek segítségével megállapítottuk, hogy a (6'*R*)-kapszantol acetátok közül H-típusú aggregátum csak akkor jön létre (**38**, **40**) ha mindkét gyűrűn van szabad hidroxilcsoport [6[#], 16[#]]. Ha a hidroxilcsoport helyett kizárólag acetátcsoport kapcsolódik valamelyik gyűrűhöz, vagy nincs hidroxilcsoport (kriptokapszol esetén), akkor a J-típusú aggregátum keletkezik. Más karotinoidok (zeaxantin, lutein) esetén is ezt a jelenséget tapasztaltuk [6[#], 8[#]].

Jól ismert, hogy a lutein a magasabbrendű növények fotoszintetizáló apparátusában található, és energiaátadó szerepe van. A zeaxantinnal együtt az emberi szem sárgafoltjában (macula lutea) aggregált formában található, és ugyancsak a fénytől védi a szemet. Ezenkívül a lutein észterei számos virágsziromban és gyümölcsben is

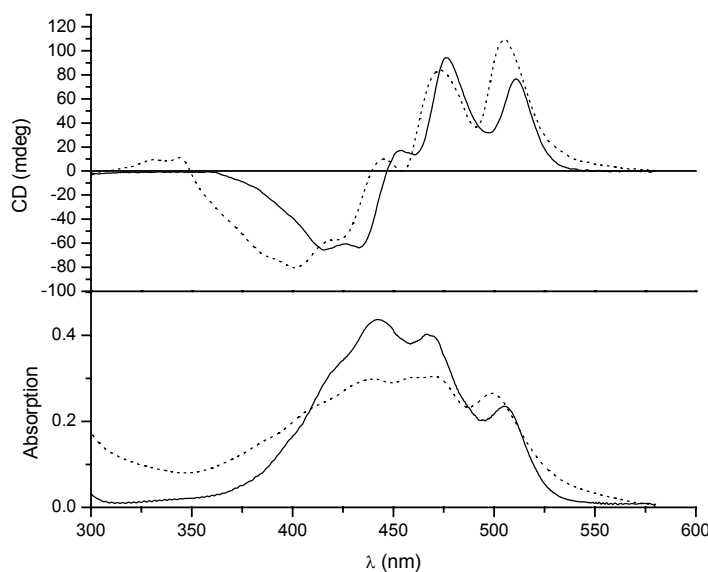
megtalálhatók. A lutein ezen biológiai szerepei miatt került előtérbe a lutein és lutein-diacetát szupramolekuláris szerveződésének vizsgálata.



65. ábra. A lutein (a) és a lutein-diacetát (b) CD és UV-VIS spektruma víz-aceton (3:1) elegyében [8[#]]

A 65. ábrán látható, hogy a lutein és lutein-diacetát a (6'R)-kapszantolhoz hasonlóan viselkedik; a szabad lutein H-típusú aggregátumot, míg a lutein-diacetát J-típusú aggregátumot képez. A lutein és lutein-diacetát filmmel végzett CD és atomerő mikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a kvarc lemezen kialakuló folyadékkristályok is a vizes oldatokéhoz hasonló szupramolekulát alkotnak [8[#]].

Ugyancsak meglepő eredményt szolgáltatott a virágszirmok CD vizsgálata. A tubuláris kromoplasztot tartalmazó virágszirmok közvetlenül felvett UV-VIS és cirkuláris dikroizmus spektruma nagy hasonlóságot mutatott a lutein-diacetát vizes-etanolos spektrumaihoz (66. ábra), ami arra utal, hogy a karotinoidok itt is a szupramolekulák alkotóelemei [7[#]]. Az irodalom szerint globuláris kromoplasztot tartalmazó virágszirmok nem adtak értékelhető CD jeleket.



66. ábra. A lutein-diacetát (—) (víz-etanol 3:1 elegyében) és a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus*) szirmának (····) CD és UV-VIS spektruma [7[#]]

Az előzőekben röviden leírt, a "self assembly" jelenséggel kapcsolatos vizsgálataink a piros paprika fő színezékének a kapszantinnak egyszerű kémiai átalakításával nyert szemisztetikus vegyületek szerkezetének igazolásából indultak ki. A bemutatott eredmények jól demonstrálják a szerves kémikus és a spektroszkópus egymásra utaltságát és eredményeiknek egymásra gyakorolt hatását. A feltárt jelenség, a karotinoid szupramolekulák szerkezetére leírt következtetések egyértelműen a kiroptikus eredményei, amelyek azonban nem jöhettek volna létre a karotinoidkémikus által (néha rendelésre) előállított, illetve izolált vegyületek nélkül.

A karotinoid molekulák biológiai rendszerekben való szerveződésének vizsgálata még számos lehetőséget rejt magában. Ezeknek a rendszereknek modellvegyületekkel való vizsgálata, a modellvegyületek előállítása, a rendszert összetevő molekulák természetes előfordulásának igazolása pedig további nagy kihívást jelent a karotinoidokkal foglalkozó kémikus számára is.

VI. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK, KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

A vizsgált paprikák közül a sárga paradicsompaprikát (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*), a fekete fűszerpaprikát (*C.a.* var. *longum nigrum*), a piros paradicsompaprikát (*C.a.* var. *lycopersiceforme rubrum*), valamint a Szentesi Kosszarvú (*C.a.* var. *longum ceratoides*) és a Bovet-4 jelű paprikákat (*C.a.* var. *abbreviatum pendens*) a Szentesi Vetőmagkutató és Termelő Intézettől kaptuk. A „kaliforniai paprika” (*C.a.* var. *grossum* cv. Kaliforniai wonder) különböző színű változatait a pécsi Tesco áruházban, az egyéb piros fűszerpaprikákat piacon vásároltuk. A tigris lilium virág, az *asparagus officinalis* és az *asparagus falcatus* bogyója magán kertekből, a vadgesztenye virág a PTE ÁOK Szigeti úti tömbjének udvarából származott.

A növények extrakcióját minden esetben szobahőmérsékleten, metanollal (3x) mint dehidratálószerrel, majd dietil-éterrel végeztük. A karotinoid-észterek hidrolízise heterogén fázisban 30%-os KOH metanolos oldatával történt.

A vegyületek izolálására, tisztítására a klasszikus (Zechmeister-i) oszlopkromatográfiát alkalmaztuk. Adsorbensként leggyakrabban kalcium-karbonátot, ritkábban magnézium-oxid - celit (1 : 1) keverékét használtuk, fejlesztőszerként benzol, benzol-hexán, benzol-aceton, hexán-aceton szolgált. A kifejlesztés után a töltetet a csőből kitoltuk, majd a festékeket színük alapján kivágtuk. Az eluálásra metanolt használtunk, melyből benzolba, vagy benzol-hexán elegybe vittük át a karotinoidokat. A benzolos oldatokat -20°C -on N_2 alatt tartottuk a következő feldolgozási lépésig. A poláros (hipofázisos) karotinoidokat benzolból hexánnal, míg az apoláros (epifázikus) vegyületeket benzolból metanollal kristályosítottuk. A kristályos anyagokat nitrogén atmoszférában üveg ampullában tároltuk.

A származékképzési reakciók (savazás (9. ábra), redukció (10. ábra), acetilezés, szililezés) a karotinoidkémiaiában jól ismert módszerekkel történt [72]. Az alkalmazott reakciók lefolyását UV-VIS spektroszkópiával, HPLC-vel vagy vékonyréteg-kromatográfiával (szilikagél, benzol – metanol - etil-acetát) követtük nyomon [26*].

HPLC elválasztáshoz fordított fázisú tölteteket (250 x 4,6 mm, Chromsil C_{18} , 6 μm , utánszilanzált és nem utánszilanzált) használtunk. Terner gradiens eluens rendszert alkalmaztunk: I. rendszer: A eluens 12 % H_2O MeOH-ban, B eluens MeOH, C eluens 30

% CH₂Cl₂ MeOH-ban (korábban 50% aceton MeOH-ban); II rendszer: A eluens 10 % H₂O MeOH-ban, B eluens MeOH, C eluens 30 % CH₂Cl₂ MeOH-ban (korábban 50% aceton MeOH-ban). Gradiens program: 0-2 min: 100% A; -10 min: 80% A/20 % B-re; -18 min: 50% A/50 % B-re; -25 min: 100% B-re; -27 min: 100 % B; -34 min: 100 % C-re; -41 min: 100% C (lineáris lépések).

A detektálás minden esetben UV-VIS (Beckman, házilag átépített UV-VIS detektor; HP 1050; HP ChemStation program; detektálási hullámhosszak: 380, 410, 430, 450 és 480 nm-en), illetve diódasoros detektorral (Waters 991; 300-500 nm között) történt.

Az izolált vegyületek szerkezetazonosítását NMR- (¹H, H,H-COSY, T-ROESY, NOE, ¹³C, DEPT-135, HMBC, inverz HMQC, HSQC stb.) és CD-spektroszkópiával valamint tömegspektrometriával végeztük.

A műszeres mérések a következő helyeken és műszerekkel történtek:

NMR: Veszprémi Egyetem NMR laboratóriuma (Varian Unity 300; *Dr. Szalontai Gábor*), POTE NMR laboratóriuma (Varian Unity-Inova-400-WB; *Dr. Ősz Erzsébet*), Zürichi Egyetem Szerves Kémia Intézet (Bruker WM-400-FT, Bruker AMX 600; *Prof. C.H.Eugster*), Berni Egyetem Szerves Kémia Intézet (Bruker AC 300, Bruker AM 400, Bruker DRX 400, *Prof. H. Pfander és Dr. A. Steck*);

CD: ELTE CD laboratóriuma (Jobin-Yvon Dichrograf-6; *Dr. Kajtár Márton*), F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Jobin-Yvon Dichrograf-6; *Dr. F. Muller, J. Koehler*), KKKI (Jasco J-715/150S; *Dr. Zsila Ferenc*);

MS: MÁFKI tömegspektroszkópiás laboratóriuma (Jeol-JMS-01-SG-2; *Dr. Décsy Zoltán*), Berni Egyetem Szerves Kémia Intézet, F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Varian MA-CH 7A).

Az enzimes vizsgálatokat Prof. B. Camara munkacsoportja végezte a Strassbourgi Egyetem Molekuláris Biológia Intézetében.

Az analízisek, az izolálási folyamatok, a kémiai reakciók körülményeinek részletes leírása, valamint az izolált vagy felszintézissel előállított vegyületek spektroszkópiai adatai a mellékletként megadott közleményekben találhatók.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgáltuk a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*), a fekete fűszerpaprika (*C.a.* var. *longum nigrum*), a piros paradicsompaprika (*C.a.* var. *lycopersiceforme rubrum*), valamint a Szentesi Kosszarvú (*C.a.* var. *longum ceratoides*) és Bovet-4 jelű paprika (*C.a.* var. *abbreviatum pendens*) karotinoid-összetételének változását az érés során. Elvégeztük az ún. „kaliforniai paprika” (*C.a.* var. *grossum* cv. Kaliforniai wonder) különböző színű változatainak a karotinoidanalízisét is.

Az analízis adatokra támaszkodva 40 karotinoidot izoláltunk, vagy állítottunk elő félszintézisekkel, és végeztük el szerkezet- és konfigurációmeghatározásukat NMR- és CD-spektroszkópia valamint tömegspektrometria segítségével.

Sárga paradicsompaprikában kimutattuk a ***β*-kriptoxantin-5,6-epoxid** (I), a kriptokapszin prekursorát, melyet kis mennyisége miatt nem tudtunk kristályosan izolálni. Így *β*-kriptoxantin epoxidálásával előállítottuk a szemisztetikus ***β*-kriptoxantin-5,6-epoxidokat** (I-III) és ***-5,6,5',6'-diepoxidokat*** (IV-V). Igazoltuk, hogy a sárga paprikában előforduló *β*-kriptoxantin-5,6-epoxid (3*S*,5*R*,6*S*)-konfigurációjú.

Piros paprikából hat, 3,6-epoxi-*β*-végcsoportot tartalmazó karotinoidot (***cikloviolaxantin*** (VI), ***cucurbitaxantin A*** (VIII), ***cucurbitaxantin B*** (VII), ***kapszantin-3,6-epoxid*** (IX), ***cucurbitakróm epimerek*** (X-XI)) izoláltunk, melyek közül a ***cikloviolaxantint*** és a két ***cucurbitakróm epimert*** elsőként izoláltuk természetes forrásból. Javaslatot tettünk a 3,6-epoxi-végcsoport bioszintézisének mechanizmusára. ***Cucurbitaxantin A*** (VIII) epoxidálásával előállítottuk a szemisztetikus ***cucurbitaxantin B***-t (VII) és epimerjét az ***5',6'-diepicucurbitaxantin B***-t (XIII).

Ugyancsak piros paprikából négy új, 3,5,6-trihidroxi-*β* végcsoportot tartalmazó karotinoidot (***5,6-diepikarpoxantint*** (XIV), ***5,6-diepilatoxantint*** (XVI), ***5,6-diepikapszokarpoxantint*** (XVII), és ***6-epikarpoxantint*** (XV)) izoláltunk. Az 5,6-diepivegyületekhez a (3*S*,5*S*,6*S*)-, míg a 6-epikarpoxantinhoz a (3*S*,5*R*,6*S*)-konfigurációt rendeltük hozzá.

A 3,5,6-trihidroxi-*β*-végcsoport konfigurációs viszonyainak tisztázására *anti*- és *szün*-***kapszantin-5,6-epoxid*** (XVIII-XIX), valamint *anti*- és *szün*-anteraxantin savkatalizált gyűrűnyitásával előállítottuk a további három-három lehetséges

szemisztetikus *kapszokarpoxantin*- (XX-XXII) és *karpoxantin-epimert* (XV, XXVIII, XXXI). Izoláltuk és elvégeztük a szerkezetvizsgálatát az összes, főtermékként keletkező karotinoid-5,8-epoxidnak (*kapszokróm*- (XXIII-XXVI) és *mutatoxantin-epimerek* (XXIX, XXX, XXXII, XXXIII)) is. Az *anti*-anteraxantinból keletkező két *mutatoxantin-epimert* (XXIX, XXX) piros fűszerpaprikából is izoláltuk és elvégeztük szerkezet- és konfiguráció-meghatározásukat.

Megállapítottuk, hogy a gyűrűnyitás termékeinek konfigurációja csak az 5,6-epoxi-végcsoport konfigurációjától függ, és független a másik végcsoport szerkezetétől. A paprikában előforduló 5,6-diepi-vegyületek ((3*S*,5*S*,6*S*)-konfigurációval) ilyen körülmények között nem keletkeznek. Javallatot tettünk a karotinoid-5,6-epoxidok savkatalizált gyűrűnyitásának mechanizmusára. A savkatalizált reakció során az 5-ös szénatom konfigurációja változatlan marad, míg a 6-os szénatomon vagy megváltozik a konfiguráció, vagy nem.

Elsőként izoláltunk a reakcióelegyből szemisztetikus 3,6-epoxi-karotinoidokat (*kapszantin-3,6-epoxid* (IX, XXVII), *cucurbitaxantin A* és *epimerjeik* (VIII, XXXIV)).

Megállapítottuk, hogy a piros paprikában a 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok a kapszantin-kapszorubin-szintáz enzim katalizálta folyamatban keletkeznek és képződésük összefüggésben van az 5,6-epoxi-karotinoidok ún. pinakolin átrendeződésével. Javallatot tettünk az enzimkatalizált reakció mechanizmusára, mely szerint a gyűrűnyitás során a 6-os szénatomon nem változik meg a hidroxilcsoport konfigurációja, míg az 5-ös szénatomon megváltozhat. Francia kutatókkal együttműködve bizonyítottuk a kapszantin-kapszorubin-szintáz enzim szerepét az 5,6-diepi-vegyületek kialakulásában.

Tigris liliom szirmából *5,6-diepikarpoxantint* (XIV), *5,6-diepikapszokarpoxantint* (XVII), és *6-epikarpoxantint* (XV), *Asparagus falcatus* bogyójából *5,6-diepikarpoxantint* (XIV) izoláltunk. Eredményeink azt mutatják, hogy azokban a növényekben (növényi szervekben) amelyek tartalmazznak κ -végcsoportú karotinoidokat a bioszintézis azonos úton játszódik le.

Tigris liliom szirmából *kapszantin-5,6-epoxidot* (XVIII), az *Asparagus falcatus* bogyójából pedig egy eddig ismeretlen, új szerkezetű karotinoidot, *kapszoneoxantint* (XL) izoláltunk és határoztuk meg szerkezetüket.

Elvégeztük a spárga (*asparagus officinalis*) bogyójának karotinoidanalízisét is. Bár κ -végcsoportú karotinoidokat kimutattunk, 3,5,6-trihidroxi-vegyületet nem sikerült detektálnunk.

Különböző vadgesztenyefajták (*Aesculus*) szirmának és porzójának analízisével igazoltuk, hogy nem tartalmaznak κ -végcsoportú karotinoidokat, mint azt eddig az irodalomban állították. A fő komponens egy új, eddig nem ismert 6'-apo-karotin-al az ***aesculaxantin*** (XXXVIII), melynek izolálását és szerkezetazonosítását elvégeztük. Az *aesculaxantin*ből redukcióval előállítottuk az ***aesculaxantolt*** (XXXIX) amelynek természetes előfordulását eddig nem tudtuk igazolni.

Elsőként izoláltunk piros paprikából további két, újszerű végcsoportot - 6-hidroxi- γ -végcsoportot - tartalmazó karotinoidot ***nigroxantint*** (XXXV) és ***prenigroxantint*** (XXXVI). Javaslatot tettünk keletkezésük mechanizmusára és ennek alapján a 6-hidroxil-csoport konfigurációjára.

Piros fűszerpaprikából a kapszantin oxidált származékát a ***kapszantont*** (XXXVII) is izoláltuk és elvégeztük szerkezet- és konfigurációmeghatározását. Jelenlétét az *asparagus falcatus* bogyójában is kimutattuk.

Az elvégzett munka, az izolált minor komponensek szerkezetének és konfigurációjának a tisztázása reményeink szerint hozzájárul a karotinoidok bioszintézisének pontosabb megismeréséhez, és megkönnyíti az egyéb növények, növényi részek vizsgálatát.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *MTA Matematikai és Természettudományi Értesítője* **44**, 404-419 (1927)
2. Braconnot, H.: *Ann. de chim. et. de phys.* **6**, 122 (1817)
3. Stromer, F.: *Chem. Zentral. bl.* 577 (1884)
4. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **454**, 54 (1927)
5. Cholnoky, L.: *Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Értesítője* **5**, 1 (1933)
6. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **509**, 269 (1934)
7. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **455**, 70 (1927)
8. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **465**, 288 (1928)
9. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **478**, 95 (1930)
10. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **487**, 197 (1931)
11. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **489**, 1 (1931)
12. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **516**, 30 (1935)
13. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **523**, 101 (1936)
14. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **530**, 291 (1937)
15. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **543**, 248 (1940)
16. Karrer, P.: *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **5**, 1 (1948)
17. Karrer, P., Krause-Voith E.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 802 (1948)
18. Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *MTA Kém. Oszt. Közl.* **5**, 419 (1955)
19. Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *Acta Chim. Hung.* **6**, 143 (1955)
20. Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *MTA Kém. Oszt. Közl.* **10**, 23 (1958)
21. Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *Acta Chim. Hung.* **16**, 227 (1958)
22. Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *Nature* **178**, 410 (1956)
23. Cholnoky, L., Szabolcs, J., Nagy, E.: *MTA Kém. Oszt. Közl.* **11**, 57 (1959)
24. Cholnoky, L., Szabolcs, J., Nagy, E.: *Liebigs Ann. Chem.* **616**, 207 (1958)
25. Cholnoky, L., Szabolcs, J., Cooper, R. D. G., Weedon, B. C. L.: *Tetrahedron Letters* **19**, 1257 (1963)

26. Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *MTA Matematikai és Természettudományi Értesítője* **639** (1928)
27. Zechmeister, L., Tuzson, P.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **70**, 1966 (1937)
28. Karrer, P., Rüegger, A., Solmssen, V.: *Helv. Chim. Acta* **21**, 448 (1938)
29. Cholnoky, L., Szabó, D., Szabolcs, J.: *MTA Kém. Oszt. Közl.* **9**, 179 (1957)
30. Cholnoky, L., Szabó, D., Szabolcs, J.: *Liebigs Ann. Chem.* **606**, 194 (1957)
31. Entschel, R., Eugster, C.H., Karrer, P.: *Helv. Chim. Acta* **39**, 1263 (1956)
32. Cholnoky, L., Szabolcs, J.: *Naturwissenschaften* **44**, 513 (1957)
33. Entschel, R., Karrer, P.: *Helv. Chim. Acta* **43**, 89 (1960)
34. Barber, M. S., Jackman, L. M., Warren, C. K., Weedon, B. C. L.: *Proc. Chem. Soc.* **1960**, 19.
35. Cholnoky, L., Szabolcs, J.: *Experientia* **16**, 483 (1960)
36. Faigle, H., Karrer, P.: *Helv. Chim. Acta* **44**, 1257 (1961)
37. Faigle, H., Karrer, P.: *Helv. Chim. Acta* **44**, 1904 (1961)
38. Ueda, I., Nowacki, W.: *Z. Kristallographie* **140**, 190 (1974)
39. Bowden, R. D., Cooper, R. D. G., Harris, C. J., Moss, G. P., Weedon, B. C. L., Jackman, L. M.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* **1983**, 1465
40. Rüttimann, A., Englert, G., Mayer, H., Moss, G. P., Weedon, B. C. L.: *Helv. Chim. Acta* **66**, 1939 (1983)
41. Curl, A. L.: *J. Agric. Food Chem.* **12**, 522 (1964)
42. Curl, A. L.: *J. Agric. Food Chem.* **10**, 504 (1962)
43. Minguez-Mosquera, M. I., Hornero-Mendez, D.: *J. Agric. Food Chem.* **42**, 38 (1994)
44. Almela, L., Lopez-Roca, J., Candela, M. E., Alcazar, M. D.: *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1606 (1991)
45. Davies, B. H., Matthews, S., Kirk, J. T. O.: *Phytochemistry* **9**, 797 (1970)
46. Yamamoto, H., Chichester, C. O.: *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 303 (1965)
47. Cholnoky, L., Györgyfy, K., Rónai, Á., Szabolcs, J., Galaskó, G., Mallams, A. K., Waight, E. S., Weedon, B. C. L.: *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 1256
48. Valadon, L. R. G., Mummery, R. S.: *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **82**, 407 (1977)
49. Buckle, K., Rahman, F.: *J. Chromatography* **171**, 385 (1979)
50. Camara, B., Moneger, R.: *Phytochemistry* **17**, 91 (1978)
51. Camara, B.: *FEBS Letters*, **118**, 2 (1980)
52. Camara, B.: *Pure Appl. Chem.* **57**, 675 (1985)

53. Baranyai, M., Matus, Z., Szabolcs, J.: *Acta Alimentaria* **11**, 309 (1982)
54. Matus, Z., Baranyai, M., Tóth G., Szabolcs, J.: *Chromatographia* **14**, 337 (1981)
55. Parkes K. E. B., Pattenden G., Baranyai M., Molnár P., Szabolcs J., Tóth G.: *Tetrahedron Letters* **27**, 2535 (1986)
56. Matsuno, T., Tani, Y., Maoka, T., Mautso, K., Komori, T.: *Phytochemistry* **25**, 2837 (1986)
57. Eugster, C. H.: *Pure Appl. Chem.* **57**, 639 (1985)
58. Schiedt, K.; Liaaen-Jensen, S.: Isolation and Analysis. In *Carotenoids Vol. 1A. Isolation and Analysis*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995. pp. 81-108.
59. Maoka, T. Fujivara, Y., Hashimoto, K., Akimoto, N.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1601 (2001)
60. Almela, L., Lopez-Roca, J., Candela, M. E., Alcazar, M. D.: *J. Chromatography* **502**, 95 (1990)
61. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernandez, J.: *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 1190 (1994)
62. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernandez, J.: *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 2260 (1994)
63. Howard, L. R., Smith, R. T., Wagner, A. B., Villalon, B., Burns, E. E.: *J. Food Sci.* **59**, 362 (1994)
64. Levy, A., Harel, S., Palevitch, D., Akiri, B., Menagem, E., Kanner, J.: *J. Agric. Food Chem.* **43**, 362 (1995)
65. Márkus, F., Daood, H. G., Kapitány, J., Biacs, P. A.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 100 (1999)
66. Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H., Villalon, B.: *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 1713 (2000)
67. Breithaupt, D. E., Schwack, W.: *Eur. Food. Res. Technol.* **211**, 52-55 (2000)
68. Hornero-Mendez, D., Mínguez-Mosquera, M. I.: *J. Agric. Food. Chem.* **46**, 4087 (1998)
69. Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Akimoto N.: *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 3965 (2001)
70. Liaaen-Jensen, S.: Combined Approach: Identification and Structure Elucidation of Carotenoids. In *Carotenoids Vol. 1B. Spectroscopy*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995. pp. 343-354.

71. Buchecker, R., Noack, K.: Circular Dichroism. In *Carotenoids Vol. 1B. Spectroscopy*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995. pp. 63-116.
72. Eugster, C. H.: Chemical Derivatization: Microscale Tests for the Presence of Common Functional Groups. In *Carotenoids Vol. 1A. Isolation and Analysis*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995. pp 71-80.
73. Isler, O.: *Carotenoids* Birkhäuser Verlag, Basel 1971.
74. Eschenmoser, W., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **61**, 822 (1978)
75. Acemoglu, M., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **67**, 184 (1984)
76. Fiksdahl, A., Bjørnland, T., Liaaen-Jensen, S.: *Phytochemistry* **23**, 649 (1984)
77. Liaaen-Jensen, S.: *Pure Appl. Chem.* **57**, 649 (1985)
78. Bjørnland, T., Borch, G., Liaaen-Jensen, S.: *Phytochemistry* **25**, 201 (1986)
79. Gmünder, M.R., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **73**, 1954 (1990)
80. Gross, J., Carmon, M., Lifshitz, A., Sklarz B.: *Phytochemistry* **14**, 249 (1975)
81. Buchecker, R., Liaaen-Jensen, S.: *Phytochemistry* **16**, 729 (1977)
82. Marki-Fischer, E., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **68**, 1704 (1985)
83. Marki-Fischer, E., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **68**, 1708 (1985)
84. Marki-Fischer, E., Buchecker, R., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **67**, 2143 (1984)
85. Marki-Fischer, E., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **73**, 1637 (1990)
86. Buchecker, R., Marti, U., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **67**, 2043 (1984)
87. Bouvier, F., Huguney, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M., Camara, B.: *Plant J.* **6**, 45 (1994)
88. Huguney, P., Badillo, A., Chen, H., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., Kuntz, M.: *Plant J.* **8**, 417 (1995)
89. Molnár, P., Deli, J., Matus, Z., Tóth, Gy.: *Gyógyszerészet* **45**, 146 (2001)
90. Baranyai, M., Radics, L., Kajtár, M., Kajtár, J., Szabolcs, J.: *Acta Chim. Hung.* **116**, 153 (1984)
91. Englert, G.: NMR Spectroscopy. In: *Carotenoids Vol. 1B. Spectroscopy*; Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995. pp 147-280.
92. Goodwin, T. W., Mercer, E. I.: *Introduction to Plant Biochemistry*, 2nd Ed. Pergamon Press, Oxford, 1983. p. 455.

93. Neamtu, G., Salajan, G., Bilaus, C., László, T., Simpson, K. I.: *Rev. Roum. Biochim.* **13**, 209, (1976)
94. Neamtu, G., László, T., Bilaus, C.: *Stud. Cercet. Biochim.* **22**, 39 (1979)
95. Szabolcs, J.: A piros paprika polién-ke-tonjainak vizsgálata. Kandidátusi értekezés, Pécs, 1964
96. Simpson, D. J., Baqar, M. R., Lee, T. H.: *Ann. Bot.* **41**, 1101 (1977)
97. Bartlett, L., Klyne, W., Mose, W. P., Scopes, G. M., Galasko, G., Mallams, A. K., Weedon, B. C. L., Szabolcs, J., Tóth, G.: *J. Chem. Soc. C* 1969, 2527
98. Baumeler, A., Eugster, C.H.: *Helv. Chim. Acta* **75**, 773-790 (1992)
99. Haugan, J.A., Liaaen-Jensen, S.: *Tetrahedron Letters* **35**, 2245-2248 (1994)
100. Strand, A., Liaaen-Jensen, S.: *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2000**, 595
101. Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann, V., Pecker, I.: *Pure Appl. Chem.* **69**, 2151 (1997)
103. Sandmann, G.: *Eur. J. Biochem.* **223**, 7 (1994)
103. Bouvier, F., d'Harlingue, A., Camara B.: *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 53 (1997)
104. Pogson, B., McDonald, K. A., Truong, M., Britton, G., DellaPenna, D.: *Plant Cell* **8**, 1627 (1996)
105. Sun, Z. R., Gantt, E., Cunningham, F. X. Jr.: *J. Biol. Chem.* **271**, 24349 (1996)
106. Bouvier, F., Keller, Y., d'Harlingue, A., Camara, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1391**, 320 (1998)
107. Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A., Camara, B.: *J. Biol. Chem.* **271**, 28861 (1996)
108. Bouvier, F., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kumagai, M. H., Camara, B.: *Eur. J. Biochem.* **267**, 6346 (2000)
109. Zechmeister, L.: *Carotinoide*. Springer, Berlin (1934)
110. Karrer, P., Jucker, E.: *Carotinoide*. Birkhäuser, Basel (1948)
111. Straub, O.: *Key to Carotenoids*. 2nd Ed. (ed. H. Pfander), Birkhäuser, Basel (1987)

IX. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1*. Matus, Z., **Deli, J.**, Szabolcs, J.: Carotenoid Composition of Yellow Pepper during Ripening: Isolation of β -Cryptoxanthin 5,6-Epoxy
Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**, 1907-1914 (1991)
- 2*. **Deli, J.**, Matus, Z., Szabolcs, J.: Carotenoid Composition in the Fruits of Black Paprika (*Capsicum annuum* Variety *longum nigrum*) during Ripening
Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**, 2072-2076 (1992)
- 3*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of Red Paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during Ripening; Biosynthesis of Carotenoids in Red Paprika
Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**, 1517-1523 (2001)
- 4*. **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Szentesi Kosszarvú during Ripening
Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**, 711-716 (1996)
- 5*. **Deli, J.**, Tóth, G.: Carotenoid Composition of the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Bovet 4 during Ripening
Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung A **205**, 388-391 (1997)
- 6*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G.: Separation and Identification of Carotenoids from Different Coloured Paprika (*Capsicum annuum*) by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography
European Food Research and Technology **213**, 301-305 (2001)
- 7*. Molnár, P., **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth, G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of the Mono- and Diepoxides of β -Cryptoxanthin
Helvetica Chimica Acta **80**, 221-229 (1997)
- 8*. **Deli, J.**, Molnár, P., Tóth, G., Baumeler, A., Eugster, C. H.: Cycloviolaxanthin (=3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-3,6:3',6'-Diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro- β,β -carotin-5,5'-diol), ein neues Carotinoid aus Paprika (*Capsicum annuum*)
Helvetica Chimica Acta **74**, 819-824 (1991)
- 9*. **Deli, J.**, Molnár P., Matus, Z., Tóth, G. Steck, A: Reisolation of Carotenoid 3,6-Epoxides from Red Paprika (*Capsicum annuum*)
Helvetica Chimica Acta **79**, 1435-1443 (1996)

- 10*. **Deli, J.**, Matus, Z., Molnár, P., Tóth, G., Décsy, Z., Eugster, C. H.: Epoxidierung von Cucurbitaxanthin A: Herstellung von Cucurbitaxanthin B und seines 5',6'-Epimeren
Helvetica Chimica Acta **76**, 952-956 (1993)
- 11*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Isolation of Carotenoids with 3,5,6-Trihydroxy-5,6-dihydro- β -end Groups from Red Paprika (*Capsicum annuum*)
Helvetica Chimica Acta **81**, 1233-1241 (1998)
- 12*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of Capsokarboxanthins and 3,6-Epoxycapsanthins
Helvetica Chimica Acta **81**, 1242-1253 (1998)
- 13*. Molnár, P., **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of Karpoxanthins and Cucurbitaxanthin A Epimers
Helvetica Chimica Acta **82**, 1994-2002 (1999)
- 14*. Molnár, P., **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth, G., Steck A., Pfander H.: Isolation and Characterization of Mutatoxanthin-epimers from Red Paprika (*Capsicum annuum*)
European Food Research and Technology **211**, 396-399 (2000)
- 15*. **Deli, J.**, Matus, Z., Molnár, P., Tóth, G., Szalontai, G., Steck, A., Pfander, H.: Nigroxanthin (3',4'-Didehydro- β,γ -carotene-3,6'-diol), a New Carotenoid Isolated from Paprika (*Capsicum annuum* var. *longum nigrum*)
Chimia **48**, 102-104 (1994)
- 16*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G., Traber, B., Pfander, H.: „Prenigroxanthin” [(all-*E*,3*R*,3'*S*,6'*S*)- β,γ -Carotene-3,3'6'-triol], a Novel Carotenoid from Red Paprika (*Capsicum annuum*)
Tetrahedron Letters **42**, 1395-1397 (2001)
- 17*. **Deli, J.**, Matus, Z., Molnár, P., Tóth, G., Steck, A., Pfander, H.: Isolation of Capsanthone ((all-*E*,3*R*,5'*R*)-3-Hydroxy- β,κ -carotene-3',6'-dione) from Paprika (*Capsicum annuum*)
Chimia **49**, 69-71 (1995)
- 18*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Isolation and Characterization of 3,5,6-Trihydroxy-Carotenoids from Petals of *Lilium tigrinum*
Chromatographia **48**, 27-31 (1998)

- 19*. **Deli, J.**, Molnár, P., Pfander, H., Tóth, G.: Isolation of Capsanthin 5,6-Epoxyde from *Lilium tigrinum*
Acta Botanica Hungarica **42**, 105-110 (1999/2000)
- 20*. **Deli, J.**, Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Niggli, U. A., Pfander, H.: Aesculaxanthin, a New Carotenoid Isolated from Pollens of *Aesculus hippocastanum*
Helvetica Chimica Acta **81**, 1815-1820 (1998)
- 21*. **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth, G.: Comparative Study on the Carotenoid Composition in the Buds and Flowers of Different *Aesculus* species
Chromatographia **51**, S179-182 (2000)
- 22*. **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of *Asparagus officinalis*
Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**, 2793-2796 (2000)
- 23*. **Deli, J.**, Molnár, P., Ösz, E., Tóth, G.: Analysis of Carotenoids in the Fruits of *Asparagus falcatus*: Isolation of 5,6-Diepikarpoxanthin
Chromatographia **51**, S183-187 (2000)
- 24*. **Deli, J.**, Molnár P., Ösz E., Tóth, G.: Capsoneoxanthin, a New Carotenoid Isolated from the Fruits of *Asparagus falcatus*
Tetrahedron Letters **41**, 8153-8155 (2000)
- 25*. **Deli, J.**: Paprikakarotinoidok bioszintézise
Biokémia **24**, 84-87 (2000)
- 26*. **Deli, J.**: Thin-Layer Chromatography of Carotenoids
Journal of Planar Chromatography - Modern TLC **11**, 311-312 (1998)
- 27*. **Deli, J.**, Molnár P: Paprika Carotenoids: Analysis, Isolation, Structure Elucidation
Current Organic Chemistry (közlésre elfogadva)

X. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ, DE ABBAN NEM SZEREPLŐ KÖZLEMÉNYEK

- 1#. **Deli, J.**, Molnár, P., Tóth, G., Szabolcs, J., Radics, L.: Determination of the Geometrical Configuration of Naturally Occuring Mono-*cis*-lutein Epoxides
Phytochemistry **27**, 547-549 (1988)
- 2#. Molnár, P., **Deli, J.**, Matus, Z., Tóth, G., Steck, A.: Isomerisierung von (all-*E*)-Cycloviolaxanthin Herstellung und Characterisierung von 9Z- und 13Z-Cycloviolaxanthin
Helvetica Chimica Acta **79**, 1444-1450 (1996)
- 3#. Molnár, P., **Deli, J.**, Tóth G., Renneberg D., Pfander, H.: Isomerization of Cucurbitaxanthin A
Helvetica Chimica Acta **83**, 1535-1541 (2000)
- 4#. **Deli, J.**, Ósz, E., Visy, J., Zsila, F., Simonyi, M., Tóth, G.: Stereoselective Reduction of Capsanthol-3'-ones by Complex Hydrides
Helvetica Chimica Acta **84**, 263-270 (2001)
- 5#. Zsila, F., Bikádi, Zs., **Deli, J.**, Simonyi, M.: Configuration of a Single Centre Determines Chirality of Supramolecular Carotenoid Self-assembly
Tetrahedron Letters **42**, 2561-2563 (2001)
- 6#. Zsila, F., **Deli, J.**, Bikádi, Zs., Simonyi M.: Chiral Detection of Carotenoid Assemblies
Chirality **13**, 446-453 (2001)
- 7#. Zsila, F., **Deli, J.**, Simonyi M.: Color and Chirality: Carotenoid Self-assemblies in Flower Petals
Planta **213**, 937-942 (2001)
- 8#. Zsila, F., Bikádi, Z., Keresztes, Z., **Deli, J.**, Simonyi, M.: Investigation of the Self-Organization of Lutein and Lutein Diacetate by Electronic Absorption, Circular Dichroism Spectroscopy and Atomic Force Microscopy
Journal of Physical Chemistry B **105**, 9413-9421 (2001)
- 9#. Molnár, P., Deli, J., Tóth G., Haberli, A., Pfander, H., Bernhard, K.: (9Z)-Capsanthin 5,6-epoxide, a New Carotenoid from the fruits of *Asparagus falcatus*
Journal of Natural Products **64**, 1254-1255 (2001)

- 10#. Zsila, F., **Deli, J.**, Bikádi, Zs., Simonyi M.: Supramolecular Assemblies of Carotenoids
Chirality **13**, 739-744 (2001)
- 11#. Kukui, Cs., **Deli, J.**, Tóth, Gy.: Gyógyteafüvek karotinoid tartalmának vizsgálata
Acta Pharmaceutica Hungarica **71**, 314-317 (2001)
- 12#. **Deli, J.**, Molnár, P., Ósz, E., Zsila, F., Simonyi, M., Tóth, G.: Reduction of Capsorubin and Cryptocapsin
Helvetica Chimica Acta **84**, 3810-3817 (2001)
- 13#. **Deli, J.**, Pfander, H., Tóth G.: Investigation of the Carotenoid Composition of Paprika Paste
Chromatographia (megjelenés alatt)
- 14#. Bakó, E., **Deli, J.**, Tóth, G.: HPLC Study on the Carotenoid Composition of *Calendula* Products
Journal of Biochemical and Biophysical Methods (közlésre elfogadva)
- 15#. Lóránd, T., Molnár, P., **Deli, J.**, Tóth G.: FT-IR Study of Some Apo- and Secocarotenoids
Journal of Biochemical and Biophysical Methods (közlésre elfogadva)
- 16#. Bikádi, Z., Zsila, F., **Deli, J.**, Mády, G., Simonyi, M.: The Supramolecular Structure of Self-assembly Formed by Capsanthin Derivatives
Enantiomer (közlésre elfogadva)
- 17#. Molnár, P., **Deli, J.**, Tóth G., Haberli, A., Pfander, H.: Isomerization of 5,6-Diepikarpoxanthin
Helvetica Chimica Acta (közlésre beküldve)
- 18#. Lóránd, T., Molnár, P., **Deli, J.**, Tóth, G.: FT-IR Study of some Carotenoids
Helvetica Chimica Acta (közlésre beküldve)
- 19#. Molnár, P., Ósz, E., Zsila, F., Simonyi, M., **Deli, J.**: Preparation of Partially Acetylated Carotenoids
Helvetica Chimica Acta (közlésre beküldve)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dr. Szabolcs József és Dr. Tóth Gyula professzoroknak, a POTE (ma PTE ÁOK) Orvosi Kémiai Intézet és a karotinoidkémiai munkacsoport volt és jelenlegi vezetőjének köszönöm, hogy a karotinoidkémia rejtelseibe bevezettek és munkám elvégzését lehetővé tették.

Köszönöm *Dr. Hanspeter Pfander* professzornak (University of Bern) a műszeres mérések (NMR, CD, MS) elvégzéséhez és a közlemények megírásához nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Molnár Péter* docensnek az éveken át tartó odaadó segítségét, melynek révén számos vegyület izolálását és átalakítását végeztük el.

Köszönöm *Matus Zoltán* tanársegédnek a HPLC rendszer kidolgozását, az analízisek elvégzését.

Köszönöm *Dr. Hans Conrad Eugster* professzornak és *Dr. Andreas Baumelernek* (University of Zürich) a cikloviolaxantin és a cucurbitaxantin B epimerek szerkezetvizsgálatához nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Andrea Stecknek*, *Urs Nigglinek* és *Bruno Trabernek* (University of Bern), *Dr. Szalontai Gábornak* (VE) és *Dr. Ősz Erzsébetnek* az NMR mérések elvégzését.

Köszönöm *Dr. Décsy Zoltánnak* (MÁFKI) a cucurbitaxantin B epimerek és származékaik tömegspektroszkópiás vizsgálatát.

Köszönöm *Dr. Kajtár Márton* professzornak, *Dr. Franz Müllernek* és *Mrs. J. Koehlernek* (F. Hoffmann-La Roche, Basel), valamint *Dr. Zsila Ferencnek* a CD mérések elvégzését.

Köszönöm *Bilal Camara* professzornak (Strassbourg) a kapszantin-kapszorubin-szintáz enzimmal végzett kísérleteket.

Köszönöm *George Britton* professzornak (University of Liverpool) értékes tanácsait.

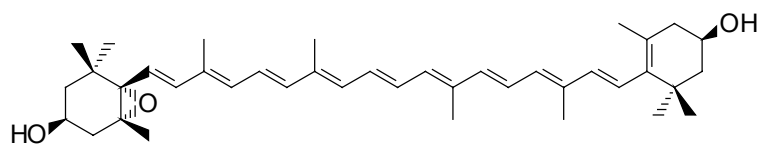
Köszönöm *Steiler Antalné*, *Stibi Eszter*, *Kriszt Jánosné*, *Szabó Ildikó*, *Hanzel Sarolta*, *Bognár Sándorné*, *Lakatos Zsuzsanna* és *Halászné Nyers Éva* technikai segítségét.

Köszönöm *Dr. Simonyi Miklós* és *Dr. Kollár László* professzorok bátorítását és munkám megírásához nyújtott segítségét.

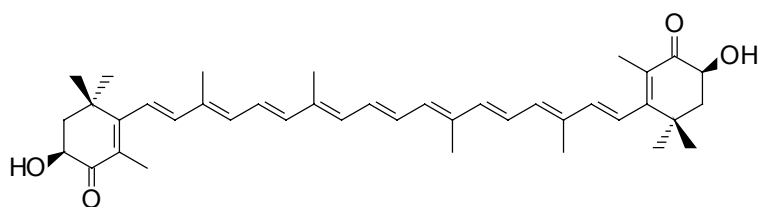
Köszönöm az OTKA (T-006034, T-023096, T-030271), az ETT (333/2000), az OMFB mecenatura, valamint a F. Hoffmann-La Roche és a Swiss National Science Foundation támogatását.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom megértő és szerető türelmét.

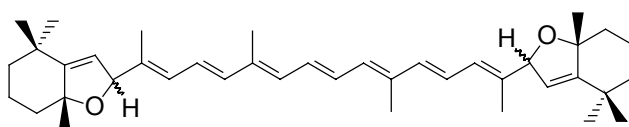
Függelék



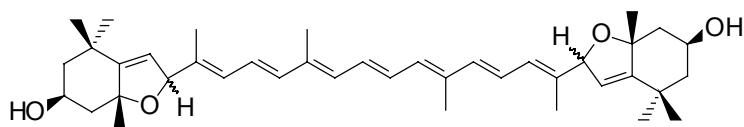
anteraxantin



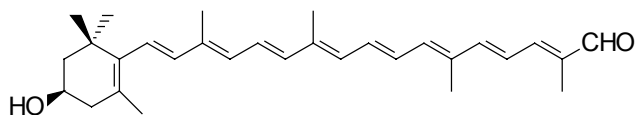
astaxantin



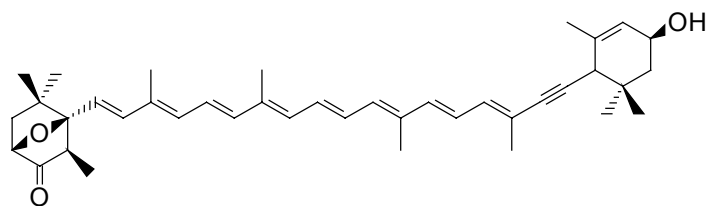
aurokróm



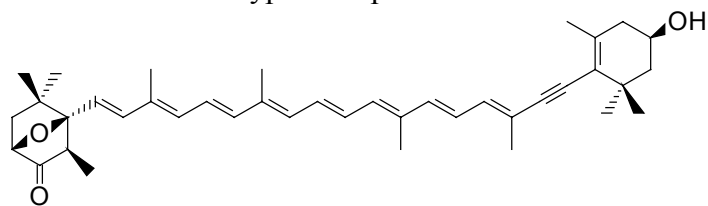
auroxantin



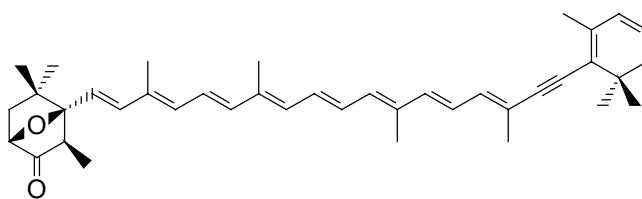
β -citraurin



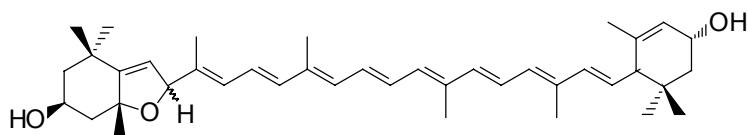
α -cryptoeutreptiellanone



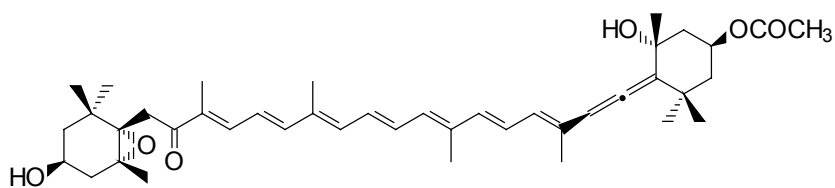
β -cryptoeutreptiellanone



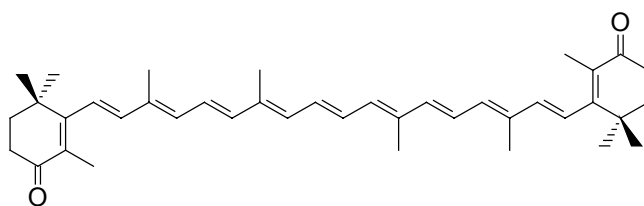
eutreptiellanone



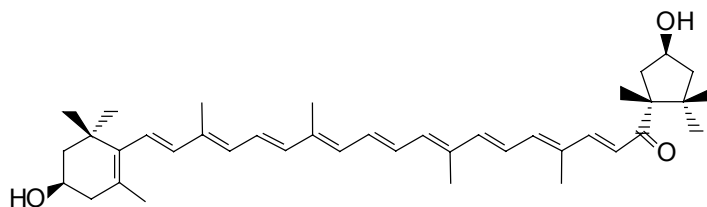
flavoxantin/krizantemaxantin



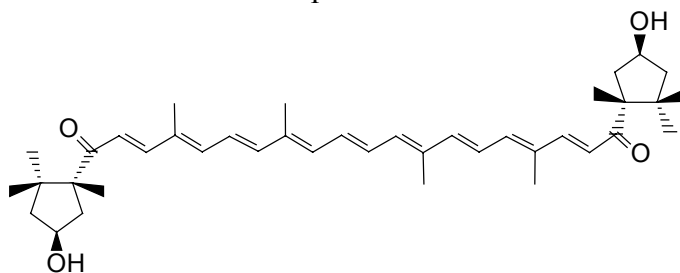
fukoxantin



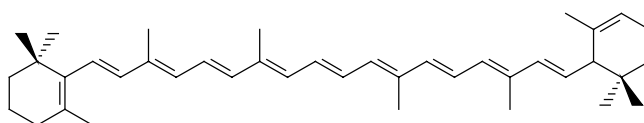
kantaxantin



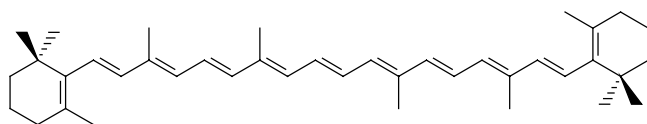
kapszantin



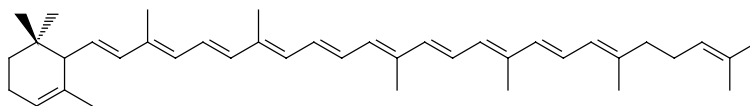
kapszorubin



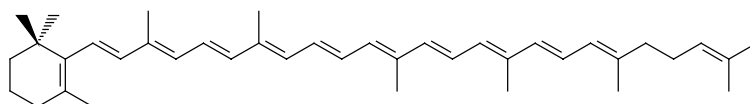
α -karotin



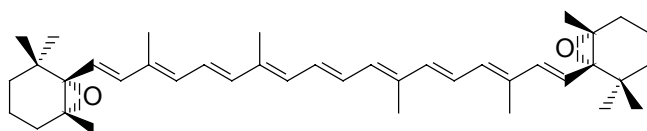
β-karotin



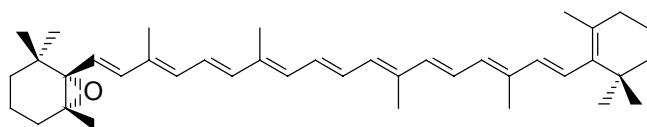
δ-karotin



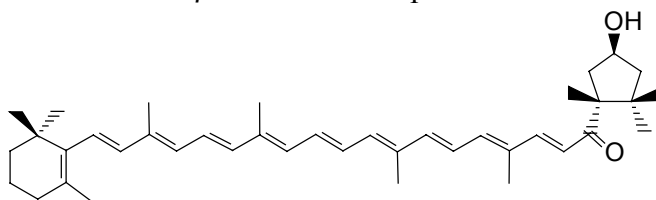
γ-karotin



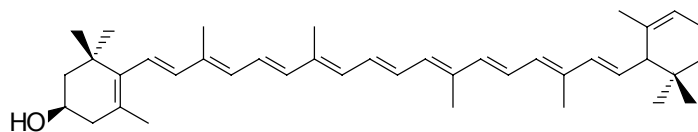
β-karotin-diepoxid



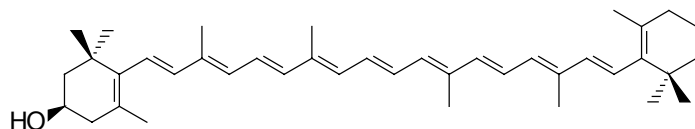
β-karotin-monoepoxid



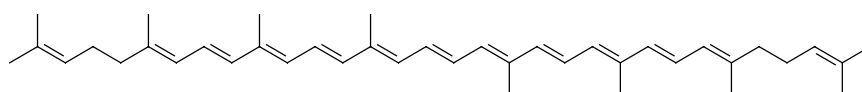
kriptokapszin



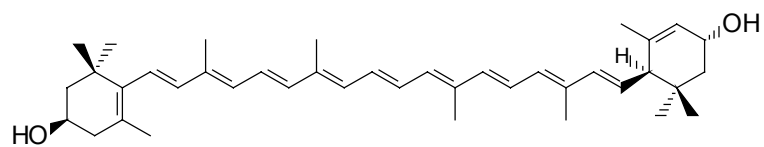
α-kriptoxantin



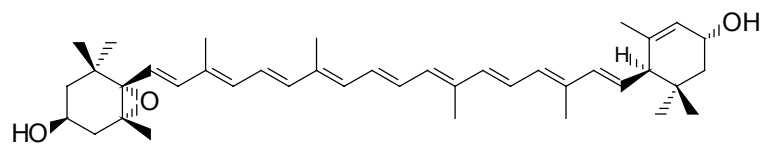
β-kriptoxantin



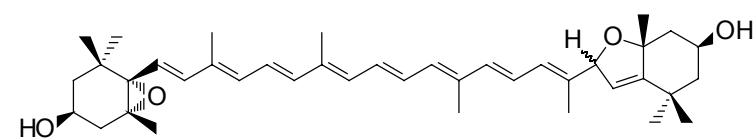
likopin



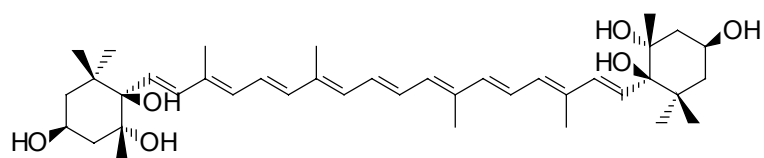
lutein (xantofill)



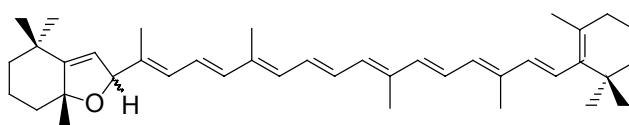
lutein-5,6-epoxid (xantofill-epoxid)



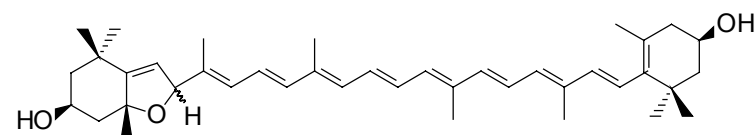
luteoxantin



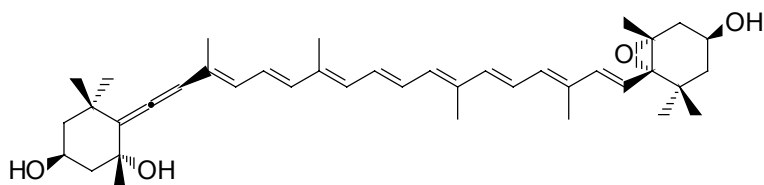
mactraxantin



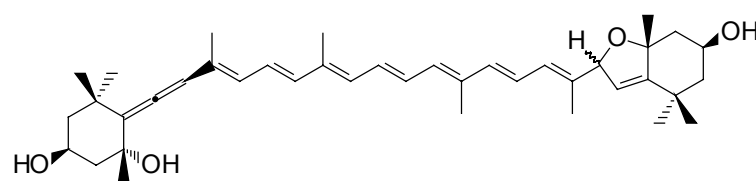
mutatokróm



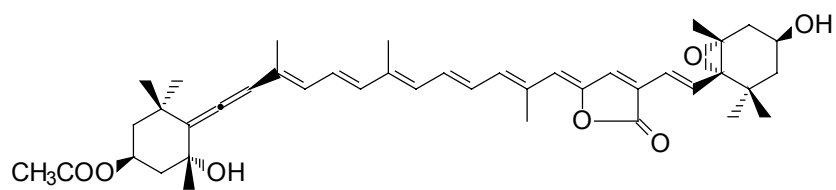
mutatoxantin



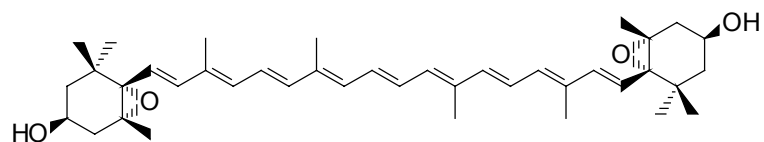
neoxantin (foliaxantin)



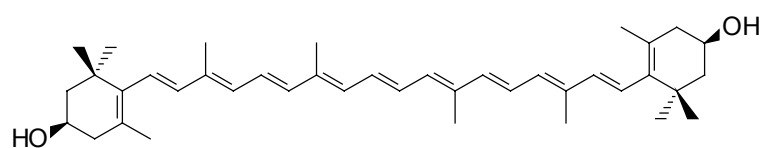
neokróm (foliakróm)



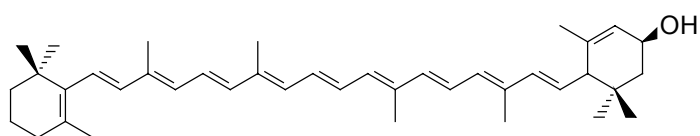
peridinin



violaxanthin



zeaxanthin

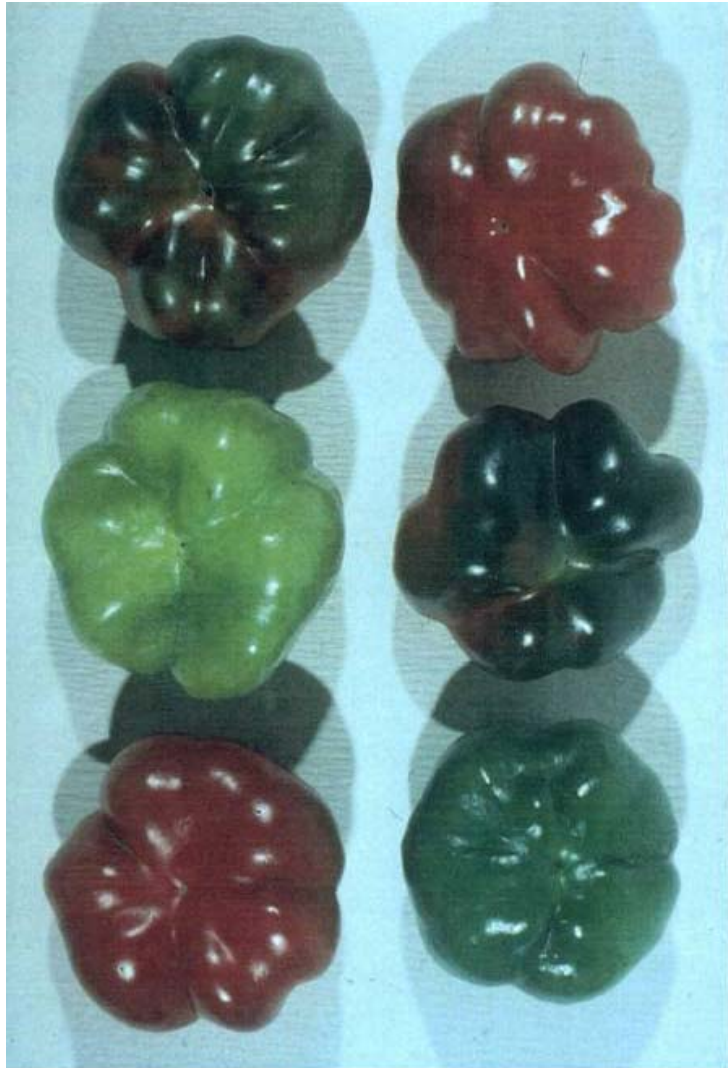


zeinoxanthin



Sárga paradicsompaprika

Capsicum annuum var. *lycopersiceforme flavum*



Piros paradicsompaprika

Capsicum annuum var. *lycopersiceforme rubrum*



Piros fűszerpaprika
Capsicum annuum var. *longum*



Szentesi Kosszarvú paprika
Capsicum annuum var. *longumceratoides*



Bovet 4 paprika

Capsicum annuum var. *abbreviatum pendens*



Kaliforniai paprika
Capsicum annuum var. *grossum*



Tigris liliom
Lilium tigrinum



Aesculus hippocastanum



Aesculus pavia