

Ph.D. értekezés tézisei

**KAROTINOIDOK MEGHATÁROZÁSA
BIOLÓGIAI MINTÁKBÓL HPLC MÓDSZERREL**

Matus Zoltán

Készült
A Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Karának
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében

Doktori Iskola vezető: Dr. Hideg Kálmán
Programvezető: Dr. Hideg Kálmán
Témavezető: Dr. Tóth Gyula

Pécs, 2004

I. BEVEZETÉS

A karotinoidoknak már számos biológiai funkciója, illetve közvetett, még nem teljesen tisztázott biológiai hatása ismeretes. A legrégebben ismert A-provitamin hatás mellett ma már többféle védőhatást is tulajdonítanak ennek a vegyületcsoportnak. Fő forrásaink a növények, amelyek szintetizálják a karotinoidokat, és természetesen az ezen növényeket fogyasztó állatokból készült táplálékaink is.

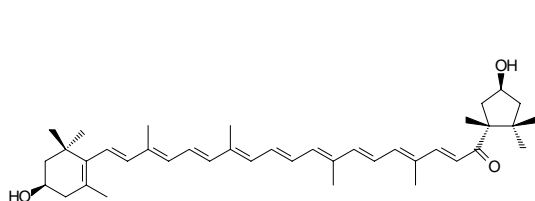
Intézetünkben, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán, körülbelül 80 éve folyik a karotinoidok kutatása Zechmeister László, Cholnoky László, Szabolcs József, majd Tóth Gyula vezetésével.

A karotinoidforrások felderítéséhez, 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.

Ma 600-nál több természetben előforduló karotinoidot ismerünk. A különböző növényi és állati mintákban sok, igen kis mennyiségben előforduló, ismeretlen szerkezetű karotinoid lehetséges, amelyek szerkezetének pontos megismerése segíthet tisztázni a karotinoidok bioszintézisét. Ezeknek a minor komponenseknek a minél pontosabb megismerése - különösen a bonyolult, sokkomponensű rendszerekből - csak az előbb említett módszerek kombinációjával lehetséges, amelyek között fontos szerepet játszik a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) is.

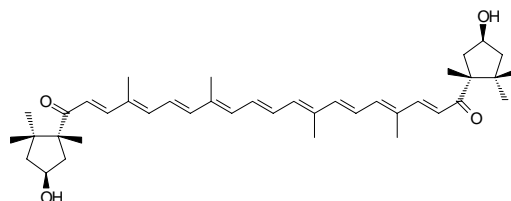
Az 1950-es években Cholnoky és munkatársai a piros paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) és a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme flavum*) érett és éretlen termésének karotinoidjait vizsgálták.

1960-ban, több mint harminc évvel a felfedezése után tisztázódott a paprika fő karotinoidjának a kapszantinnak, valamint a kapszorubin és a kriptokapszin κ -végcsoportjának szerkezete. A kapszantin és kapszorubin szerkezetbizonyító szintézisét 1983-ban végezték el.



Kapszantin (1)

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



Kapszorubin (2)

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

Az 1970-es években többen is vizsgálták a különböző paprikafajták karotinoid-összetételét, jelentősebb, részletesebb eredményt azonban nem értek el.

Az 1970-es évek közepétől, második felétől a nagynyomású folyadékkromatográfia fejlődésével ez a módszer is egyre nagyobb szerepet kapott a karotinoidok analízisében. A műszeres kromatográfiai módszerek (pl. a HPLC) és ezek detektálási módjainak fejlődése lehetővé tette a korábban nem kimutatható, kis mennyiségben jelenlévő komponensek kimutatását is. Ebben az időben kezdődött intézetünkben a HPLC töltetek fejlesztése, ami nagyban hozzájárult a módszer hazai fejlődéséhez, elterjedéséhez, és lehetővé tette, hogy a HPLC technikát alkalmazzuk a karotinoidok kutatásában is.

A töltetek (leggyakoribb a szilikagél-alapú) nagy fajlagos felületű (kb. $10\text{-}500\text{ m}^2 \times \text{g}^{-1}$) és pórustérfogatú anyagok. A szilikagél töltetek adszorpciós tulajdonságait és szelektivitását elsősorban a felületi szilanolszoportok és környezetük határozza meg. A szilikagélt a nagyhatásosságú folyadékkromatográfiában közvetlenül viszonylag ritkán alkalmazzák. Leggyakrabban a preparatív és processz kromatográfiában használnak nem modifikált szilikagél adszorbenst, itt is általában csak kompromisszumként, mivel a felületükön modifikált töltetek ára – a szükséges nagy tételekben – magas.

A HPLC technikában a legtöbb analitikai elválasztást fordított fázisú tölteteken végzik. A fordított fázisú töltetek olyan szilikagélek, melyek felületét kémiai reakcióval hidrofóbbá tették. A szilanolszoportok kémiaiilag átalakíthatók és így a szorbens kromatográfiai tulajdonságai megváltoztathatók. Gyakran alkalmazzák a C_{18} (oktadecil), vagy C_8 (oktil) láncokkal borított tölteteket, de más lánc hosszúságú alkilcsoportokkal (C_1 -től C_{30} -ig) borított szilikagélekkel is eredményesen végeznek speciális elválasztásokat. Porózus adszorbenseket hosszú láncú alkilcsoportokkal tökéletesen borítani (az összes felületi szilanolszoportot elreagáltatni), azok helyigénye miatt nem lehet. Ezért az ilyen tölteteket célszerű egy következő reakcióban kis helyigényű szilánnal ismét reagáltatni (metil-, etil-, izopropil-, tercier-butyl-szilil csoportok a szokásosak), így az első lépésben el nem reagált szilanolszoportok száma jelentősen csökkenthető.

A töltetek borítottságát a legegyszerűbben a töltet százalékos széntartalmával ($\text{C}_\%$) ellenőrizhetjük. Az előállított, nem utánszilanzált C_{18} töltetek széntartalma jól korrelál a fajlagos felületükkel. Töltetek maradék szilanol aktivitását célszerűen bázikus minták elválasztásával lehet ellenőrizni. E módszer eredményei kromatográfiai szempontból mindenképp értékesebbek, mint a más fizikai-kémiai eljárással nyert eredmények, mivel a mindennapi kromatográfiai gyakorlattal megegyező, vagy ahhoz nagyon közelálló viszonyok között méri a maradék szilanol aktivitást.

II. CÉLKITŰZÉSEK, KÉRDÉSFELTEVÉSEK

II.1. Célul tűztük ki olyan kromatográfias töltetek előállítását, amelyekből stabil oszlopok tölthetők és reprodukálható módon alkalmasak a karotinoidokkal kapcsolatos analitikai feladatok ellátására.

a) Megfelelő porozitású szilikagél előállítása 9-15 nm átlagos pórusátmérővel, 300-400 m²/g fajlagos felülettel.

b) A szilanol csoportok kémiai átalakításával különböző fordított fázisú töltetek előállítása. Különböző borítottság és különböző utánszilanizáltsági fok elérése.

II.2. Tisztázni kívántuk, hogy a különböző borítottságú és utánszilanizáltságú töltetek közül, melyek alkalmasak a karotinoidok meghatározására. Milyen hatással van a maradék szilanolcsoportok jelenléte, koncentrációja a karotinoidok egyes csoportjainak retenciójára, elválasztására. Például az *össz-transz* vegyületek elválasztása *cisz*-izomerjeiktől, valamint az α - és β -végcsoportokkal rendelkező vegyületek elválasztása egymástól.

II.3. Célul tűztük ki a bonyolult sokkomponensű karotinoid elegyek kromatogramjaiban előforduló lehető legtöbb komponens azonosítását. Ez a kromatográfiában szokásos módon, tehát standard anyagok használatával csak kis százalékban lehetséges, ezért olyan módszer kidolgozása szükséges, ami karotinoidokon belül bizonyos vegyületcsoportokra specifikus módon teszi lehetővé az azonosítást. Például oxo-karotinoidok, epoxi-karotinoidok, *cisz*-karotinoidok.

II.4. Olyan HPLC módszert kívántunk kidolgozni, ami alkalmas a növényekben, elsősorban a paprikában előforduló karotinoidok teljes polaritástartományát átfogva minél több vegyület külön csúcsban történő egyidejű analizésére. Ezen kívül több esetben fontos a *cisz*-izomerek és diasztereomerek, valamint az α - és β -végcsoportú karotinoidok elválasztása. Ehhez szükséges a megfelelő HPLC töltet és gradiens elúciós program kidolgozása.

II.5. Módszerünkkel különböző paprikafajták karotinoid-összetételét kívántuk megvizsgálni, összehasonlítani, illetve kimérni a karotinoid tartalom változását és a karotinoid összetétel alakulását az érési folyamat során. Tisztázni kívántuk a karotinoidként eddig nem ismert komponensek szerkezetét. Ehhez kapcsolódóan más növényekben előforduló karotinoidok

szerkezetazonosítását is el kívántuk végezni. Az eredmények birtokában az eddig felvázolt bioszintézis útvonalak módosítására, pontosítására törekedtünk.

II.6. Magyarországon és világszerte is a paprika mellett a legfontosabb karotinoid források közé tartoznak a tökfélék. Termésük és néhány belőlük készült termék karotinoid tartalmát terveztük meghatározni illetve a korábbi mérések eredményeit finomítani.

II.7. Célul tűztük ki állati és emberi eredetű minták analízisét, azok karotinoid tartalmának meghatározását, ezzel hozzájárulni a karotinoidok biológiai funkcióinak pontosabb megismeréséhez. A jól ismert A-provitamin hatás mellett más, például antioxidáns és egyéb preventív effektusok tisztázásához megfelelő módszer szükséges. Kérdésként merült fel, hogy lehetséges-e egy mintából az A-vitamin és karotinoidok egymás melletti meghatározása, tekintettel az igen eltérő fényelnyelésükre. Rutin méréssorozatokra is alkalmas, tehát viszonylag rövid analízisidővel működő HPLC módszer kidolgozására van szükség.

III. EREDMÉNYEK

III.1. Kromatográfias töltetek előállítása

a) Hidrotermális reakcióval a kommersz 5-6 nm pórusátmérőjű szilikagélből kromatográfias célra alkalmas 10 nm körüli pórusátmérővel rendelkező szilikagéleket készítettünk. Megállapítottuk, hogy autoklávban, magas hőmérsékleten és nyomáson vízgőz hatására a szilikagélek pórusai a nagyobb méretek felé eltolódnak és egyéb jellemzőik (pórus térfogat, fajlagos felület) is ezzel együtt változnak. A reakció (a pórusméret növekedése) legjelentősebben a hőmérséklettől függ. A pórusméret és a fajlagos felület egymással ellentétesen változik. Az eljárással elérhető legnagyobb pórusméret kb. 40 nm, melyhez kb. 20 m² grammonkénti fajlagos felület tartozik. A pórusméret-eloszlás a hidrotermális reakció során alig változik. Sem a különböző idejű, sem a különböző hőmérsékleten kezelt szilikagélek relatív pórusméret-eloszlása nem változott jelentősen.

b) Többféle módszerrel fordított fázisú tölteteket állítottunk elő. Egyrészt klasszikus oldószeres lombikreakcióval, másrészt ún. szilárd fázisú reakcióval. Ez utóbbi kísérletsorozatban megállapítottuk, hogy a felületi borítottság – kémhatás összefüggés minimumgörbe összefüggés szerint változik. A legalacsonyabb borítottságot – és ezzel együtt a legalacsonyabb retenciákat – a semleges pH körüli tartományban kaptuk. Amíg egy 1,7-es pH-ra beállított szilikagélre közel 4 μmol×m⁻² oktilsoprotot lehetett felvinni, 5,5-ös pH-n már csak kb. 2,3 μmol×m⁻²-t. Lúgos tartományban a felületi borítottság a várakozásnak megfelelően ismét nőtt. Itt azonban a kísérleteknek határt szab a szilikagélek mérsékelt lúgállósága. Az alkoxiszilánok szilárdfázisú reakciója esetén ezért a reakció bázikus közegben történő kivitelezése nem célszerű.

A maradék szilanol csoportok blokkolására háromféle utánszilanzálási eljárást dolgoztunk ki, ezzel különböző maradék szilanolcsoport koncentrációval rendelkező tölteteket állítottunk elő.

III.2. A borítottság és a szilanolcsoportok hatása az elválasztásra

C₁₈-as töltetek esetében megvizsgáltuk a maradék szilanolcsoportok különböző mennyiségének hatását az elválasztásokra, különös tekintettel a karotinoidek viselkedésére.

Tölteteink jellemzésére az „Engelhardt-tesztet” alkalmaztuk. Semleges és savas mintavegyületeink retenciója – a várakozásoknak megfelelően – a fázis hidrofób jellegének fokozódásával (a javuló utánszilanizálással, a széntartalom enyhe emelkedésével) növekedett. Ellenkezően változott viszont a bázikus anyagok retenciója: az utánszilanizálás növekvő mértékével az „Engelhardt-teszt” bázikus mintavegyületeinek retenciója jelentősen csökkent.

A poláris karotinoidok retenciója a nem utánszilanizált tölteteken volt a legnagyobb, míg az apoláris karotin vegyületek (karotin szénhidrogének) retenciója a jól utánszilanizált tölteteken volt magasabb. A mintavegyület π elektronrendszere és a töltet szilanofil kölcsönhatására utal egyes karotinoidok eltérő retenciója is, melyekben a kettőskötések helyzete eltérő (például lutein epoxid és anteraxantin, lutein és zeaxantin). E vegyületpárosokat jól utánszilanizált tölteteken nem sikerült elválasztani, ugyanakkor a nem utánszilanizált tölteteken jó elválasztásokat értünk el.

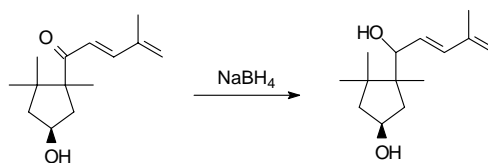
Általánosságban elmondható, hogy nem utánszilanizált fázisokon a poláris karotinoidok retenciója magasabb, mint a jól utánszilanizált fázison, viszont a jól utánszilanizált tölteten az apoláris karotinok retenciója nagyobb, mint a nem utánszilanizált fázison. A gyengén utánszilanizált töltet sem a poláris, sem az apoláris karotinok elválasztására nem optimális.

Megállapítottuk, hogy a jól utánszilanizált töltet nagyobb mértékben „széthúzza” a karotinoidokat polaritásuk szerint, jobb az elválasztás a teljes elegyre és cisz-izomerekre, de nem képes az α - és β -végcsoportú karotinoidok szétválasztására. Ugyanakkor a nem utánszilanizált töltetek alkalmasak az α - és β -végcsoportú karotinoidok egymás melletti analizálására.

III.3. Bonyolult sokkomponensű elegy azonosítása

Az egyes csúcsok azonosítása a kromatográfias módszereknél elsődlegesen a retenciós viselkedés alapján történik. Pontos ismert standardokkal való azonosítás azonban sokszor nem lehetséges, különösen bonyolult, sokkomponensű extraktumok esetén. Nem áll rendelkezésre annyi standard anyag, mint amennyire szükség lenne. Ez a helyzet a karotinoid elegyek esetén is. Ezért származékképzésekkel, a kémiai viselkedés segítségével lehet több csúcs valószínű azonosítását elvégezni. Ehhez járul a spektrális tulajdonságok kihasználása UV/Vis detektor alkalmazásával. Több irányú származékképzési módszerrel sok csúcs valószínű azonosítását tudtuk elvégezni.

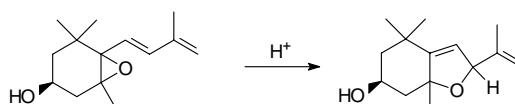
A nátrium-bórhidrid a polién aldehideket és ketonokat a megfelelő alkoholokká redukálja standard körülmények között.



A κ -végcsoport redukciója

A redukciós termékeket rendszerint könnyű megkülönböztetni az anyavegyülettől az eltérő polaritásuk miatt. Ha a karbonil csoportok konjugációban vannak a poliénlánccal, a redukciót hipszokrom eltolódás kíséri (7-28 nm) a karbonil csoport pozíciójától függően.

Az 5,6-epoxidok és diepoxidok híg savval kezelve furanoid oxiddá alakulnak.



5,6-Epoxidok átrendeződése 5,8-epoxidokká

Ez a gyors átrendeződés lényeges hipszokrom eltolódást és fokozott polaritást eredményez.

Spektrális viselkedés alapján difuranoid-oxidok és *cisz*-karotinoidok azonosíthatók. A difuranoid-oxidokat a karotinoidok többségétől a rövid abszorpciós maximum alapján lehet megkülönböztetni. Így a difuranoid-oxidok nem mutatnak elnyelést 480 nm-nél, melyet általában a karotinoidok meghatározásánál használnak, viszont magas elnyelési értéket mutatnak 380 nm-nél. 13-*cisz*, 15-*cisz* és néhány di-*cisz* karotinoid ultraibolya spektrumában az úgynevezett *cisz*-peak jelenik meg 300-350 nm-es tartományban. A távolság a *cisz*-peak és az all-*transz* vegyület leghosszabb λ_{\max} helyzete között 140-150 nm. A *cisz*-peak intenzitása ($E_{\text{cisz-peak}}$) 50-60%-al alacsonyabb mint $E_{480\text{nm}}$.

Ezzel a kombinált származékképzési módszerrel jelentősen lecsökkent a bonyolult kromatogramban a nem azonosított csúcsok száma.

III.4. A teljes karotinoid elegy HPLC analízise.

Az utánszilanzált C₁₈-as töltetet találtuk a leginkább használhatónak sorozatmérések végrehajtására. Egy olyan gradiens programot dolgoztunk ki, amellyel a karotinoidok teljes polaritás tartományát a viszonylag poláris, több funkciós csoportot tartalmazó vegyületektől a teljesen apoláris szénhidrogén karotinoidokig sikerült átfogni, és ezzel együtt kellően finom felbontást elérni. Az utánszilanzált töltettel nem tudtuk a zeaxantin és lutein szétválasztását megoldani, ezért ezek elválasztására egy másik típusú, ún. nem utánszilanzált töltetet alkalmaztunk.

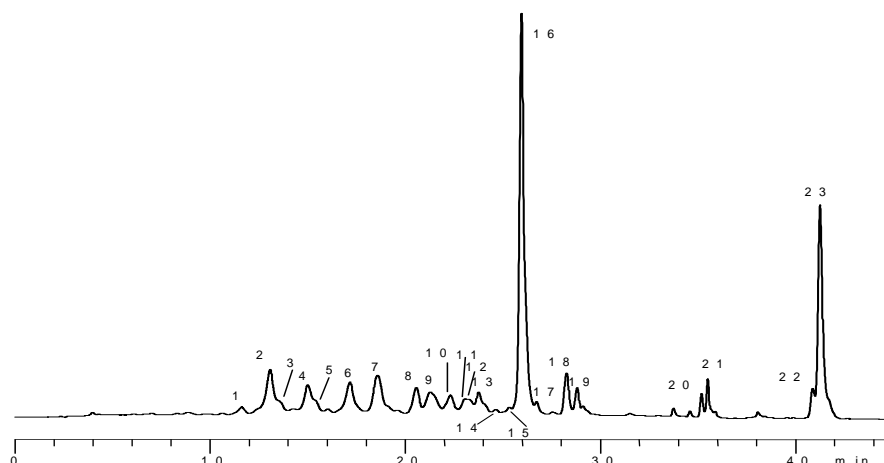
A módszer érdekessége, hogy vizes és nemvizes gradiens-szakasz is szerepel benne. Így több, mint 50 karotinoid csúcsot tudunk kijelölni egy kromatogramon belül.

Az elmúlt 10 évben sok közlemény jelent meg, amely különböző paprikafajták karotinoidanalízisével foglalkozott. Megállapítható, hogy egyetlen kromatográfias rendszer sem közelítette meg az általunk elért elválasztást.

III.5. Különböző paprikafajták karotinoid analízise.

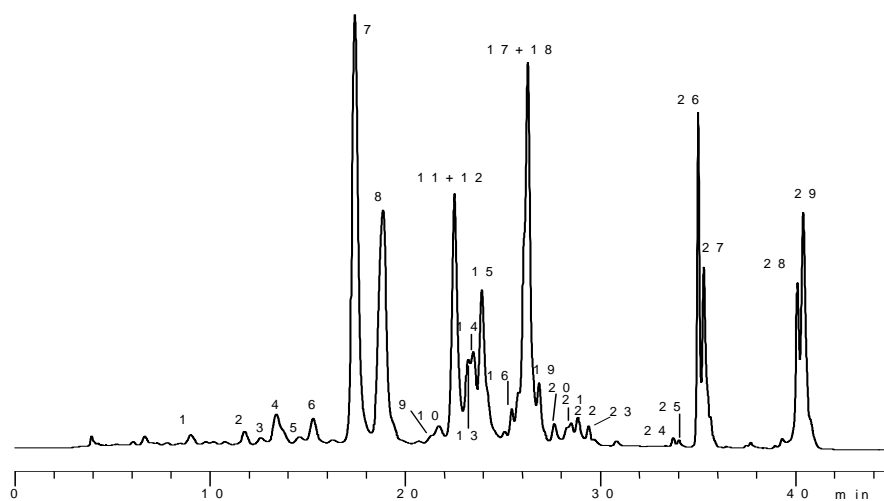
Módszerünkkel megvizsgáltuk a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*), a fekete fűszerpaprika (*C.a.* var. *longum nigrum*), a piros paradicsompaprika (*C.a.* var. *lycopersiceforme rubrum*), valamint a Szentesi Kosszarvú (*C.a.* var. *longum ceratoides*) és Bovet-4 jelű paprika (*C.a.* var. *abbreviatum pendens*) karotinoid-összetételének változását az érés során, és következtetéseket vontunk le a paprikakarotinoidok bioszintézisének mechanizmusára. Minden esetben hat érési fokozatban, hat különböző színű paprikát dolgoztunk fel.

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



Zöld (éretlen) paprika extraktumának kromatogramja

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; **13:** mutatoxantin-epimer; **16:** lutein; **18:** 9(9')-*cisz*-lutein; **19:** 13(13')-*cisz*-lutein; **20:** α-kriptoxantin; **21:** β-kriptoxantin; **22:** α-karotin; **23:** β-karotin.



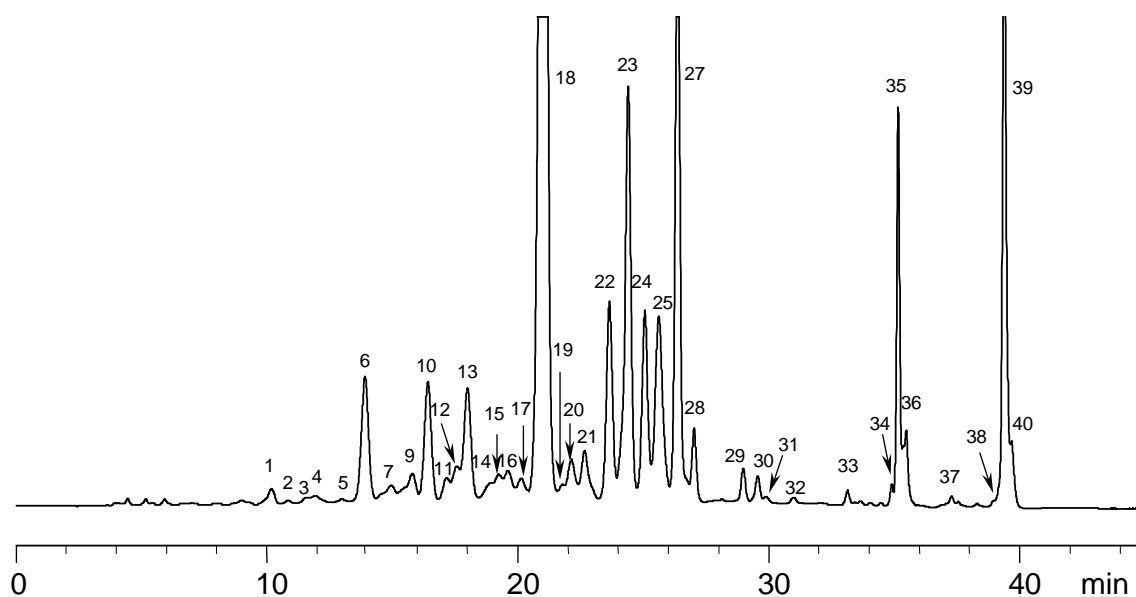
Érett sárga kaliforniai paprika extraktumának kromatogramja

Azonosított csúcsok: **4:** neoxantin; **6:** 9-*cisz*-neoxantin; **7:** violaxantin; **8:** luteoxantin; **9:** auroxantin-epimer; **10:** auroxantin-epimer; **12:** anteraxantin; **14:** mutatoxantin-epimer; **15:** mutatoxantin-epimer; **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 sárga paradicsompaprikában az 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.

A pirosra érő paprikák, a fekete fűszerpaprika (*C.a. var. longum nigrum*) és a piros paradicsompaprika (*C.a. var. lycopersiceforme rubrum*) karotinoid-összetételét fajtától függetlenül hasonlóan találtuk, a karotinoid-tartalom és a karotinoidok egymáshoz viszonyított aránya természetesen eltérést mutatott.



Érett piros fűszerpaprika extraktumának kromatogramja

Csúcsok: **1:** 5,6-diepikapszokarboxantin; **2:** 5,6-diepilatoxantin; **6:** kapszorubin; **7:** 6-epikarboxantin; **8:** neoxantin; **9:** kapszantin-5,6-epoxid; **10:** 5,7-diepikarboxantin; **11a:** yellow mixt.; **12:** violaxantin; **13:** kapszantin-3,6-epoxid; **14:** luteoxantin 2^c; **15:** luteoxantin 1^c; **16:** kukurbitaxantin-B; **17:** kukurbitakróm; **18:** kapszantin; **19:** kapszanton; **20:** anteraxantin; **21:** 8*S*-mutatoxantin; **22:** 8*R*-mutatoxantin; **23:** kukurbitaxantin-A; **24:** 9(9')-cisz-kapszantin; **25:** 13(13')-cisz-kapszantin; **26:** lutein; **27:** zeaxantin; **28:** nigroxantin; **29:** 9-cisz-zeaxantin; **30:** 13-cisz-zeaxantin; **31:** 15-cisz-zeaxantin; **33:** kriptokapszin; **34:** α -kriptoxantin; **35:** β -kriptoxantin; **36:** cisz-kriptoxantin; **38:** α -karotin; **39:** β -karotin; **40:** cisz- β -karotin

Az érett piros paprikákban a fő komponens kapszantin mellett nagyobb mennyiségben található zeaxantin, β -kriptoxantin, β -karotin és kukurbitaxantin 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.

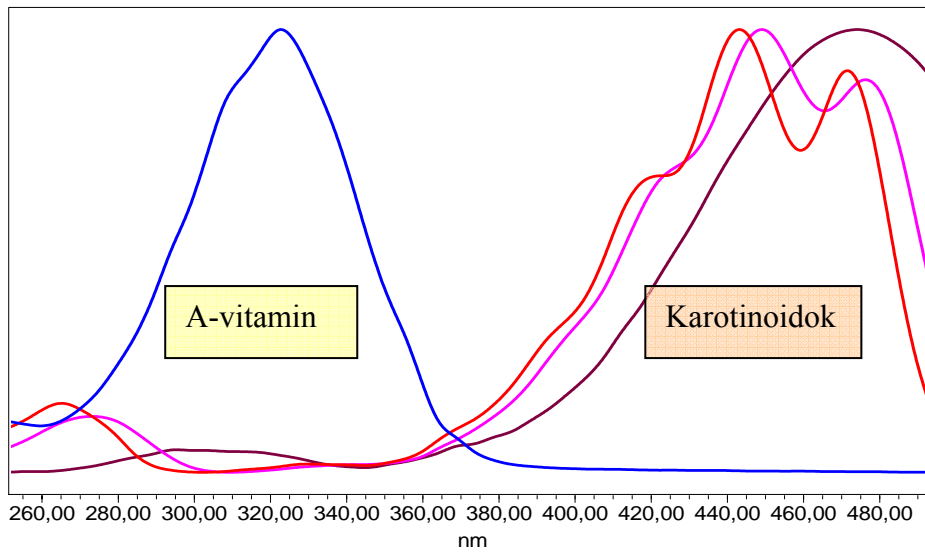
Célunk volt a paprikában kis mennyiségben jelenlévő, eddig még nem azonosított karotinoidok izolálása és pontosabb szerkezetazonosítása. Elvégeztük a β -kriptoxantin epoxid, 3,6-epoxi végcsoportú karotinoidok (kukurbitaxantin-A, kukurbitaxantin-B, kapszantin-3,6-epoxid), 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok (latoxantin, karboxantin, epikarboxantin) szerkezetazonosítását, és igazoltuk a paprikában való jelenlétüket. További új vegyületként egy γ -végcsoportú karotinoidot (nigroxantin) mutattunk ki és izoláltunk. A 3,6-epoxi- és 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok szerkezetazonosítása, természetben való előfordulásuk igazolása érdekében néhány más növényi forrást (tigrisliliom, vadgesztenyevirág, asparagus) is megvizsgáltunk.

III.6. Tökök HPLC mérése

Elvégeztük az olajtök és a sütőtök analízisét preparatív oszlopkromatográfia és HPLC kombinált módszerével. 22 csúcsot észleltünk a karotinoidokra jellemző hullámhosszon. Ezek közül különösen az olajtök esetében sok (8) valószínűleg a feldolgozás közben keletkezett műtermék. Megállapítottuk, hogy a korábbi vizsgálatokkal egyezően a fő komponensek a lutein és a β -karotin, amelyek még az olajtök présmaradékában is fellelhetők. Vizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak a csíráztatás körülményei a sziklevélben lejátszódó karotinoid-szintézisre. Megállapítottuk, hogy jelentős arány-eltolódások tapasztalhatók a csíráztatás fényviszonyaitól függően. A fotooxidáció védelmében a fő szerepet a lutein játssza.

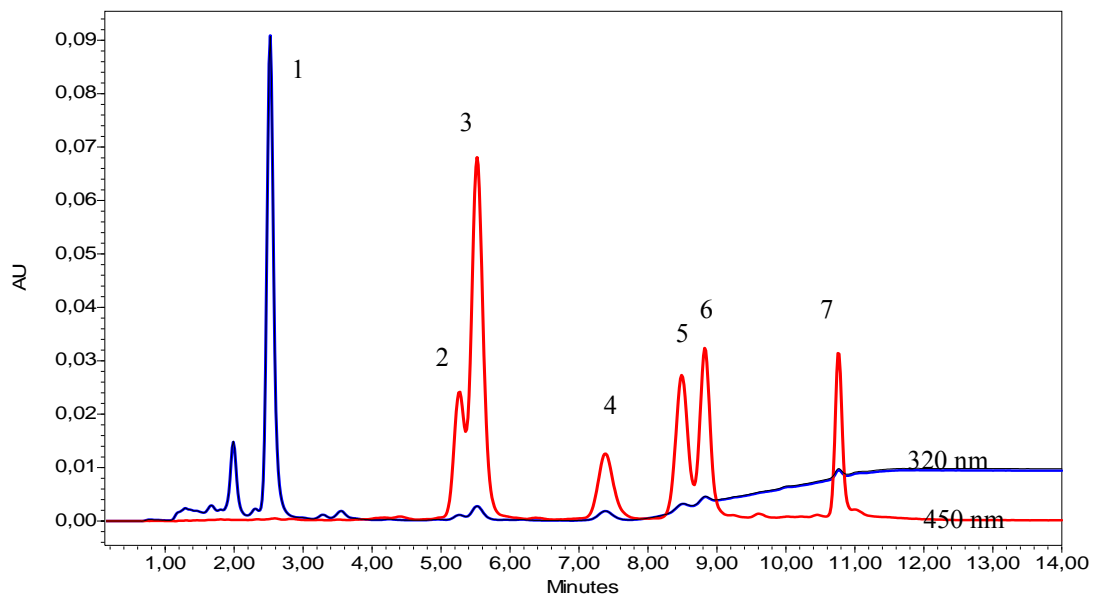
III.7. Állati és emberi eredetű minták karotinoidtartalmának meghatározása

Viszonylag rövid analízisidővel (12 perc) működő, az állati és emberi mintákban előforduló karotinoidok polaritástartományát (a dihidroxi-karotinoidoktól a szénhidrogénekig) átfogó, reprodukálható, sorozatmérések végzésére is alkalmas gradiens-elúciós módszert dolgoztunk ki. Az α - és β - végcsoportú komponensek elválasztására (lutein-zeaxantin) ún. non-endcapped C_{18} -as töltetet használtunk ebben az esetben is. Fontos nem csak a prekursor karotinoidok, hanem a ténylegesen jelen levő A-vitamin szint mérése is. Ennek a vegyületnek a karotinoidokkal egy kromatogramból történő meghatározása egy újabb problémát vet föl. Az A-vitamin spektruma (λ -max ~ 325 nm) ugyanis jelentősen eltér a karotinoidokétól (λ -max ~ 450 nm).



A-vitamin és karotinoidok spektruma

Ezért olyan gradiens-elúciós eljárást kellett kidolgozni, amikor az A-vitamin nem szuperponálódik egyetlen karotinoid csúcsával sem, és ezzel lehetővé válik programozható hullámhosszokon dolgozó UV-Vis spektrofotometriás detektor alkalmazása. Ezzel mindegyik vegyületcsoportot a saját elnyelési maximumán, vagy annak közvetlen közelében lehet detektálni.



A-vitamin, és karotinoid elegy kromatogramja 450 és 325 nm-en detektálva

Csúcsok számozása: 1: A-vitamin, 2: lutein, 3: zeaxantin, 4: kantaxantin, 5: α -kriptoxantin, 6: β -kriptoxantin, 7: β -karotin

Az általunk kidolgozott HPLC módszerrel vérszérumból és különböző szövetmintákból (máj, gyomor, tojás stb) több méréssorozatot végeztünk el állatkísérletekben, és humán beteganyagokból is. Vizsgáltuk előfordulásukat, koncentrációikat, és változásukat néhány szövetben, illetve néhány betegségben. Ezek a felderítő munkák reményeink szerint hozzájárultak a karotinoidok és az antioxidáns státusban szerepet játszó A-vitamin esetében a különböző nekik tulajdonított hatások, biológiai funkcióik pontosabb megismeréséhez.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

A szilikagél alapanyag ellenőrzése után reprodukálható fordított fázisú tölteteket állítottunk elő, amelyek tesztelésére több kromatográfias módszert alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy a polaritáskülönbségeken alapuló elválasztásokra és a bázikus anyagokra az úgynevezett utánszilanzált, tökéletesen borított szilikagél alapú töltetek a legalkalmasabbak, míg speciális esetekben (például α - és β - végcsoportú karotinoidok, poliaromás szénhidrogének analízise) a vegyes mechanizmusú kromatográfia, a szilanofil kölcsönhatások lehetőségét is biztosító nem utánszilanzált töltetek adják a megfelelő elválasztást.

A stabil töltetekre támaszkodva gradiens elúciós módszert dolgoztunk ki karotinoidok bonyolult, sokkomponensű elegyének kvalitatív és kvantitatív analízisére. Származékképzési reakciók alkalmazásával módszerünkkel a kromatogramok sok csúcsát tudtuk azonosítani ismert karotinoidvegyületeként, illetve támpontokat tudunk adni a későbbi szerkezetmeghatározáshoz. Ezekre a módszerekre támaszkodva több paprikafajta és más fontos karotinoidforrásként szóba jöhető növény vizsgálata során több új karotinoidot izoláltunk, tisztáztuk szerkezetét.

Vizsgáltuk a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annum* 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. Ezek eredményeként a következő vegyületeket sikerült elsőként azonosítani, illetve izolálni, és szerkezetüket igazolni:

Sárga paradicsompaprikában β -kriptoxantin-5,6-epoxidot

Piros paprikából 3,6-epoxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidokat:

cikloviolaxantin, *kukurbitaxantin-A*, *kukurbitaxantin-B*, *kapszantin-3,6-epoxid*,
kukurbitakróm epimerek

Piros paprikából négy új, 3,5,6-trihidroxi- β végcsoportot tartalmazó karotinoidot:

5,6-diepikarpoxantint, *5,6-diepilatoxantint*, *5,6-diepikapszo-karpoxantint*, és *6-epikarpoxantint*

Tigris liliom szirmából *6-diepikapszokarpoxantint*, *6-epikarpoxantint* és

kapszantin-5,6-epoxidot

Asparagus falcatus bogyójából 5,6-diepikarboxantint és kapszoneoxantint

Vadgesztenyefajták szirmából egy új karotinoidot az *aesculaxantint*

Piros paprikából további két, újszerű végcsoportot - 6-hidroxi- γ -végcsoportot –
tartalmazó karotinoidot *nigroxantint* és *prenigroxantint*

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

A módszerünk segítségével felderített karotinoidok reményeink szerint hozzájárulnak a
karotinoidok bioszintézisének pontosabb megismeréséhez, és megkönnyítik az egyéb növények,
növényi részek vizsgálatát.

HPLC módszert dolgoztunk ki A-vitamin és karotinoidok egymás melletti, egyetlen
mintából történő mérésére. Vérszérumból és többféle szövetmintából (máj, gyomor, tojás) több
méréssorozatot végeztünk el állatkísérletekben, és különböző betegcsoportoknál is. Vizsgáltuk az
A-vitamin és az egyes karotinoidok előfordulását, koncentrációváltozását. Ma már ezt a
módszert diagnosztikai mérésként is használjuk speciális esetekben. Ezek a munkák reményeink
szerint hozzájárultak ezen vegyületek élő szervezetekben játszott szerepének pontosabb
tisztázásához.

V. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:

- [1] Ohmacht R., Matus Z.: Hydrothermal Treatment of Silica Gel. *Chromatographia* **19**, 473 (1984)
- [2] Ohmacht R., Matus Z.: Chromatographic Packings Made by Solide Phase Synthesis. *Chromatographia* **23**, 254 (1987)
- [3] Ohmacht R., Matus Z.: Chemically bonded stationary phases for chromatography *Hung. Pat.* **190**, 682 (1988)
- [4] Matus Z., Ohmacht, R.: Selectivity of Some Aromatic Hydrocarbons and Carotenoids on C₁₈ Packings Made with Different Endcapping Procedure. *Chromatographia* **30**, 318 (1990)
- [5] Matus, Z., Baranyai, M., Tóth G., Szabolcs, J.: Identification of oxo, epoxy and some *cis*-carotenoids in high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **14**, 337 (1981)
- [6] Matus, Z., Deli, J., Szabolcs, J.: Carotenoid Composition of Yellow Pepper during Ripening: Isolation of β -Cryptoxanthin 5,6-Epoxyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 1907-1914 (1991)
- [7] 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)
- [8] 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)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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)

- [12] 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)
- [13] 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)
- [14] 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)
- [15] 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)
- [16] Molnár, P., Deli, J., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of Karboxanthins and Cucurbitaxanthin A Epimers. *Helvetica Chimica Acta* **82**, 1994-2002 (1999)
- [17] 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)
- [18] 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)
- [19] 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)
- [20] 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)
- [21] 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)
- [22] 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)

- [23] Deli, J., Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of *Asparagus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2793-2796 (2000)
- [24] Matus Z., Molnár P., Szabó L. Gy.: *Acta Pharmaceut. Hung.* 63, 247-256, 1993
- [25] Matus Z., Ohmacht R., Tóth Gy.: Szérum-karotinoidok és A-vitamin meghatározás. *XVI. Kromatográfiás Vándorgyűlés, Balatonaliga, 1991.*, P19
- [26] Király Á., Matus Z., Sütő G., Vincze Á., Mózsik Gy.: Correlation between the β -carotene induced gastric cytoprotective effect and its gastric mucosal level in indomethacin-treated rats. *Acta Physiol. Hung.*, **80**, 215-220 (1992)
- [27] Rumi Gy jr, Kovács K, Vincze Á, Matus Z, Tóth Gy, Mózsik Gy: Changes of serum retinoid levels in patients with malignant gastrointestinal disease. *Z. Gastroenterol.* 32, 95, (1994).
- [28] Rumi Gy Jr, Matus Z, Tóth Gy, Vincze Á, Mózsik Gy: Changes of serum carotenoid levels in patients with malignant disease. *Dig. Dis. Sci* 41, 437 (1996)
- [29] Rumi Gy. jr, Szabó I, Matus Z, Vincze Á, Tóth Gy, Mózsik Gy: Serum carotenoids in patients with precancerous colorectal diseases and with colorectal adenocarcinoma. *Digestion* **59**, 531 (1998).
- [30] Rumi Gy jr, Szabó I, Matus Z, Vincze Á, Tóth Gy, Rumi Gy, Mózsik Gy: Carotenoids status in crohn's disease. *Z. Gastroenterol* **36**, 442 (1998)
- [31] Rumi Gy. jr, Szabó I, Matus Z, Vincze Á, Tóth Gy, Rumi Gy, Mózsik Gy: Decrease in serum levels of vitamin A and zeaxanthin in patients with colorectal polyp. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 305-308 (1999)
- [32] Matus Z., Tóth Gy.: Retinol, tokoferol és karotinoidok mérése vérszérumból. *Elvázlástudományi Vándorgyűlés, 1998, Lillafüred, P36*
- [33] Ohmacht R., Matus Z.: "*Chromsil*", a New Family of Chromatographic Packings New Approches in Liquid Chromatography. Ed.: H. Kalász Elsevier, 1982, P.71-84
- [35] Szabó L. Gy., Matus Z., Molnár P.: A sütőtök (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) sziklevelének karotinoid összetétele. *Olaj szappan kozmetika*, **48**, 169 (1999)

