

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**VÍZOLDHATÓ KAROTINOIDOK ÉS
KAROTINOID DENDRIMEREK
ELŐÁLLÍTÁSA**

Háda Magdolna

Témavezető: **Dr. Agócs Attila**

Programvezető: **Dr. Deli József**

Intézetigazgató: **Dr. Sümegi Balázs**



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2013

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Köszönöm Prof. Deli Józsefnek, hogy kísérleteimet támogatta a karotin kémiai kutatócsoportban.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Agócs Attila egyetemi docensnek, hogy munkámat állandó figyelemmel kísérte és mindenben segítette.

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

Köszönetet mondok Dr. Takátsy Anikónak, Dr. Szabó Zoltánnak és Dr. Böddi Katalinnak a tömegspektrométerrel végzett mérésekért, valamint Turcsi Erika egyetemi tanársegédnek és Götz Zsuzsanna vegyésztechnikusnak az elvégzett HPLC mérésekért, illetve Gulyás Gergely egyetemi tanársegédnek az NMR-spektrumok felvételéért.

Köszönöm Götz Norbert és Rigó Judit vegyésztechnikusoknak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségét.

I. Bevezetés

A természetben megtalálható tetraterpének nemcsak feltűnő színeik miatt érdemelték ki a figyelmet, hanem számos más oka is van annak, hogy napjainkban az analitikai, biokémiai és orvosi kémiai kutatások középpontjába kerültek. A zöldségfélék és gyümölcsök jótékony hatásukat elsősorban a bennük lévő karotinoidoknak és vitaminoknak köszönhetik. Napjainkban közel 700 féle, természetes forrásból izolált karotinoid ismeretes. Ezek közül közelebbről főleg a β -karotint, luteint, zeaxantint, likopint vizsgálták.

A karotinoidok számos jótékony hatása ismert. Ezek a természetes pigmentek antioxidáns aktivitást mutatnak, mely tulajdonságuk szorosan összefügg a konjugált kettőskötéseket tartalmazó szénláncukkal, a kromofórral. Antioxidáns hatásukat a szervezetben kialakuló reaktív oxigén származékokkal (reactive oxygen species = ROS) reagálva a poliénlánc felhasadása, ill. oxidálódása révén fejtik ki. Az olyan kémiai folyamatok során, mint pl. a hidrogén-peroxid dezaktiválása, a karotinoidok intermedierekké alakulnak át, majd teljesen lebomlanak.

A karotinoidok egyes daganatos megbetegedések kezelésére, ill. megelőzésére is alkalmazhatók, antimutagén hatásuk is ismeretes. Csökkentik egyes szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának kockázatát. A zeaxantinnak és a luteinnek nagy szerepe van az időskori látásromlás (makula degeneráció) megelőzésében. A szubsztituátlan β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok a szervezetben az A-vitamin prekursorai.

Ebből is látható, hogy szervezetünknek szüksége van karotinoidokra, melyet megfelelő mennyiségű zöldség és gyümölcs elfogyasztásával teljes mértékben fedezhetünk. Felszívódásukat és hasznosulásukat a szervezetben viszont meghatározza a karotinoidoknak az a tulajdonsága, hogy zsírolldható vegyületek.

Napjainkban a különféle dendrimereket intenzíven tanulmányozzák. Több mint 50 féle dendrimercsaládot ismerünk, mindegyik egyedi tulajdonságokkal rendelkezik, felületük, belsejük és magjuk tetszés szerint alakítható a kívánt felhasználási módtól függően. Sok lehetséges alkalmazási mód kapcsolódik az egyedi molekuláris felépítésükhöz, multifunkcionális felszínükhöz és a belső üregek jelenlétéhez. Ezek a tulajdonságok teszik lehetővé, hogy a legmodernebb (nano)technológiákban használják fel őket. Rendkívüli az érdeklődés a gyógyászat területéről, de más iparágak is széleskörűen tudják hasznosítani ezeket a vegyületeket.

Karotinoid dendrimerekre korábban nem volt irodalmi példa, így érdekes alanyai lehetnek számos biológiai hatásvizsgálatnak is. Nagy eséllyel megváltozott élettani hatással rendelkezhetnek, például megnövekedhet a karotinoidok antioxidáns hatása, ahogy azt más bioaktív vegyületeknél is megfigyelték. Az oldhatósági tulajdonságaikon is változtathatunk, így hatékonyabbá tehetjük a szervezetben való hasznosulásukat.

Az emberi lét víz alapú, így a szervezetben sokkal jobban hasznosulnak azok a vegyületek, melyek vízben könnyen oldhatóak. A karotinoidok a hosszú apoláros szénlánc következtében hidrofóbok, ezért fiziológiai hasznosulásuk sokkal hatékonyabb lehet, ha javítunk a vízoldhatóságukon. Jobb felszívódást követően növekedhet az antioxidáns hatásuk is. Egyes hidrophil karotinoid-sók már mint kardioprotektív gyógyszerek is bevezetésre kerültek.

Napjainkban már nem igazán könnyű új karotinoidot találni, a múlt században azonban még fénykorát élte a karotinoidok szerkezetfelfedezése és leírása. Manapság ezeknek az izoprénvázas vegyületekkel kapcsolatos vizsgálódásoknak és kísérleteknek főleg táplálkozás-egészségügyi vonatkozásai vannak. A karotinoidok félszintetikus / szintetikus átalakítását az utóbbi években már csak világszerte 3-4 kutatócsoportban művelik több-kevesebb intenzitással, az újszerű reakciók bevezetésére a karotinoidkémiaiban alig akad példa. Ennek egyik oka, hogy a karotinoidok rendkívül érzékeny vegyületek, levegő, fény és savnyomok hatására könnyen elbomlanak, a velük való munka nagy odafigyelést és elővigyázatosságot kíván.

Munkám során azt a célt tűztük ki, hogy új típusú karotinoidszármazékokat, köztük vízoldható vegyületeket állítsunk elő, valamint, hogy új reakciótípusokat honosítsunk meg a karotinoidok kémiaiban.

II. Célkitűzések

1. Karotinoid dimerek és trimerek előállítása egyszerű, jól követhető reakcióban. Kísérleteinkben mind hetero-, mind homodimerek, illetve trimerek előállítását is terveztük, olyan egyszerű magokkal, melyek könnyen kezelhetőek és stabil végterméket eredményeznek.
2. Karotinoidok vízoldhatóbbá tétele. Kovalensen kötött PEG-karotinoid konjugátumok előállítása és a termékek vízoldhatóságának vizsgálata.
3. A click-reakció bevezetése a karotinoidkémiába. A megfelelő végcsoportok kialakítása a reakciópartnereken. Optimális reakciókörülmények kidolgozása.

III. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A vegyületek NMR-spektrumait Varian Unity Inova (400/100 MHz $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) spektrométeren, deuterált kloroformban (CDCl_3) vettük fel. A molekulatömegeket Bruker Daltonics Autoflex II MALDI berendezéssel határoztuk meg.

A vegyületek tisztaságát HPLC-készülékkel vizsgáltuk. A HPLC mérések Dionex P580 típusú gradiens keverő pumpán, Dionex PDA-100 típusú detektorral, Chromeleon 6.70 verziójú szoftverrel történtek.

A szintetizált anyagaink HPLC mérések alapján legalább 95% tisztaságúak, UV spektrumuk pedig megegyezik a megfelelő kiindulási karotinoidok spektrumával. Cisz izomerek képződését mérhető mértékben nem tapasztaltunk.

IV. Új tudományos eredmények

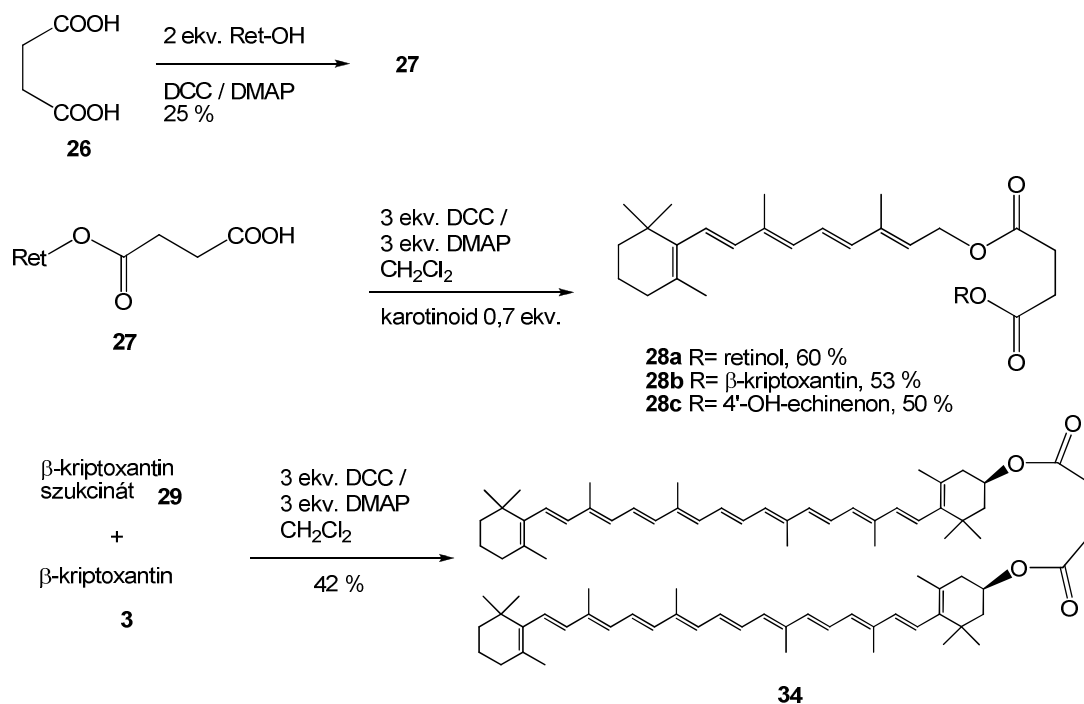
1. Karotinoid dimerek és trimerek előállítása

A kísérleteket alifás karbonsavakkal képzett dimerek előállításával kezdtük, amelyhez először különböző hidroxí-apokarotinoidokat savanhidridekkel reagáltattuk, majd az így kapott monoésztereket (ill. monokarbonsavakat) egy másik hidroxí-apokarotinoiddal észteressítve kaphatunk dimereket.

1. táblázat. Karotinoidok észteresítése disavanhidridekkel

Kar-OH v. OH-Kar-OH $\xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{DMAP}]{2, \text{ v. } 4 \text{ ekv. disavanhidrid}}$ monoészter v. diészter			
	Maleinsav - anhidrid	Borostyánkősav- anhidrid (26)	Ftálsav- anhidrid
retinol (8)	<i>elbomlott -70 °C-on is</i>	85 % (27, monoészter)	<i>elbomlott (piridinben is)</i>
izozeaxantin (25)	<i>elbomlott -70 °C-on is</i>	<i>instabil termék</i>	<i>elbomlott (piridinben is)</i>
β-kriptoxantin (3)	-----	78 % (29, monoészter)	-----
8'-β-apokarotinol (26)	-----	92 % (30, monoészter)	-----
4-hidroxi-echinenon (27)	-----	72% (31, monoészter)	-----
zeaxantin (4)	-----	84% (32, diészter)	-----
lutein (1)	-----	70% (33, diészter)	-----

Az előállított karotinoid-szukcinátokból hidroxilcsoportot tartalmazó karotinoidokkal Steglich-féle észterképzéssel diésztereket állítottunk elő. Ezekben a reakciókban sikerült jó kitermelést elérni. Mivel a karotinoidok nagyon érzékenyek, az 50%-os hozamot is sikerként könyvelhetjük el. A reakciót nemcsak apokarotinnal (pl. retinol (8)), végeztük el, hanem 40 szénatomot tartalmazó karotinoidokkal is (28b, 28c). Erre példa az előzőleg szintetizált β-kriptoxantin-szukcinát (29), melyet β-kriptoxantinnal (3) reagáltattuk, így egy homoésztert kaptunk (34). A reakció hozama 42% -os volt, ami jónak mondható.



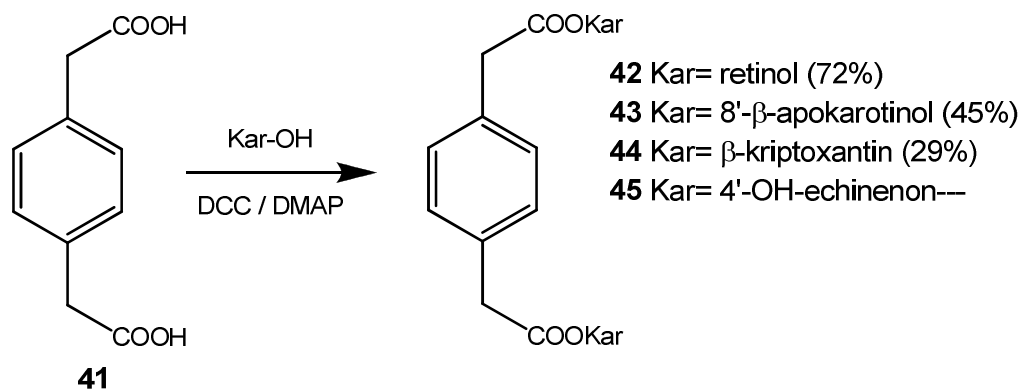
17. ábra. Homo-, és heterodimerek előállítása

Lehetséges a DCC/DMAP/disav reagenskombináció is karotinoid-felesleget alkalmazva. Kísérleteinkben retinol diésztert (**28a**) állítottunk elő borostyánkősavat (**26**) alkalmazva. A kitermelés szerényebb volt (25%), mint a kétlépes módszernél (51%), ezért más esetekben nem alkalmaztuk ezt az eljárást (17. ábra).

A diészterek szintézise után aromás karbonsavakkal és alkoholokkal kísérleteztünk dimerek és trimerek előállítása céljából. Ezek a molekulák már 1. generációs dendrimereknek tekinthetők, molekulatömegük az 1000-2000 Da nagyságrendbe esik.

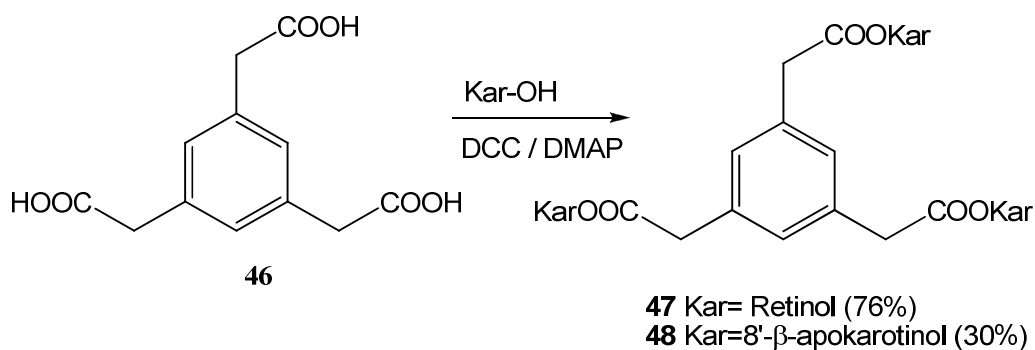
Terveztük aromás di-, és trikarbonsavak (19. ábra, **39**, **40**) magként való alkalmazását, a kísérletek viszont nem vezettek eredményes reakcióhoz. Ez valószínűleg sztereoelektronikus és/vagy szterikus okokra vezethető vissza. A kapcsolási kísérleteket ezekben az esetekben is DCC-vel végeztük, valamint a Mitsunobu-reakciót is kipróbáltuk, de azzal nem kaptunk jó eredményeket.

Aromás diecetsavak (20. ábra, **41**) használatával viszont már végbement a kívánt átalakulás. A retinollal (**8**) végzett reakciónál 72%-ban képződött homo-diészter (**42**), apokarotinollal (**43**) 45%-os és β -kriptoxantinnal (**44**) 29%-os kitermelést értünk el, a 4-hidroxi-echinenonnal (**45**) viszont nem keletkezett észter izolálható mennyiségben.



20. ábra. Kísérletek aromás dicetsavakkal

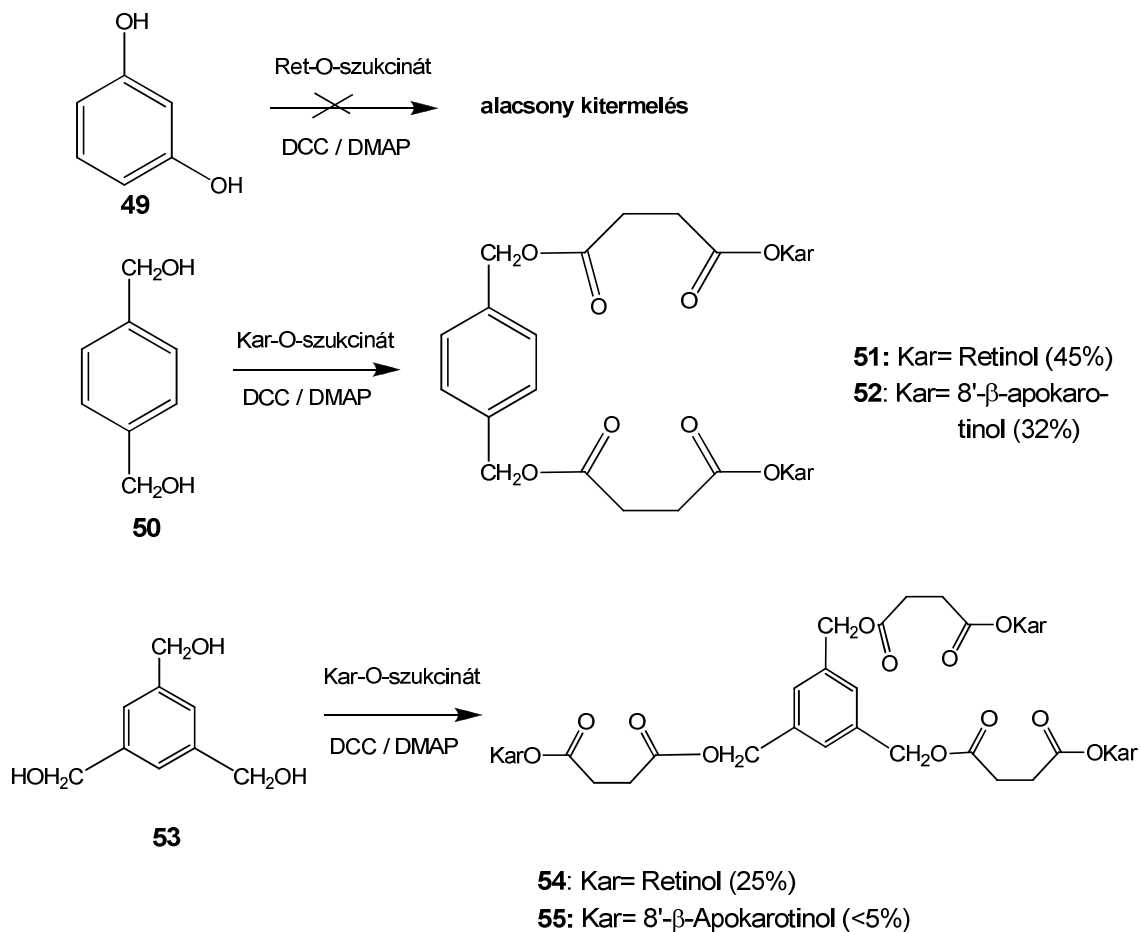
Triecetsavval (21. ábra, **46**) próbálkozva retinol ill. 8'-β-apokarotinol triésztert (**47**, **48**) állítottunk elő jó hozammal. A többi karotinoid esetében nem kaptunk értékelhető terméket.



21. ábra. Kísérletek aromás triecetsavakkal

Fenolos funkciós csoportot tartalmazó magokkal (22. ábra, **49**) reagáltatva a retinol-szukcinátot (**27**) csak nagyon alacsony kitermeléssel keletkezett termék. Viszont aromás alkoholokkal, mint az 1,4-diollal (**50**) jó hozamot tudtunk elérni retinol- (**51**), és 8'-β-apokarotinol-szukcináttal is (**52**). Érdekesség viszont, hogy az 1,3,5-triollal (**53**) (melyet 1,3,5-benzol trikarbonsavból állítottunk elő két lépésben) bár azonos körülményeket alkalmaztunk a hozam igen alacsony lett mind retinol- (**54**), mind β-apokarotinol-szukcináttal (**55**).

Teljes (C₄₀) karotinoidokat, vagy azok szukcinátjait feleslegben alkalmazva a fentiekhez hasonló reakciókban nem képződtek a termékek izolálható mennyiségben.



22. ábra. Kísérletek aromás alkoholokkal, fenolokkal

Az elvégzett kísérletek alapján megállapítható, hogy aromás magok esetén valószínűleg sztereoelektronikus okokból szükséges legalább egy metilén-csoport, mint összekötő, enélkül nem tapasztalható átalakulás, és a kitermelések több esetben meglehetősen szerények.

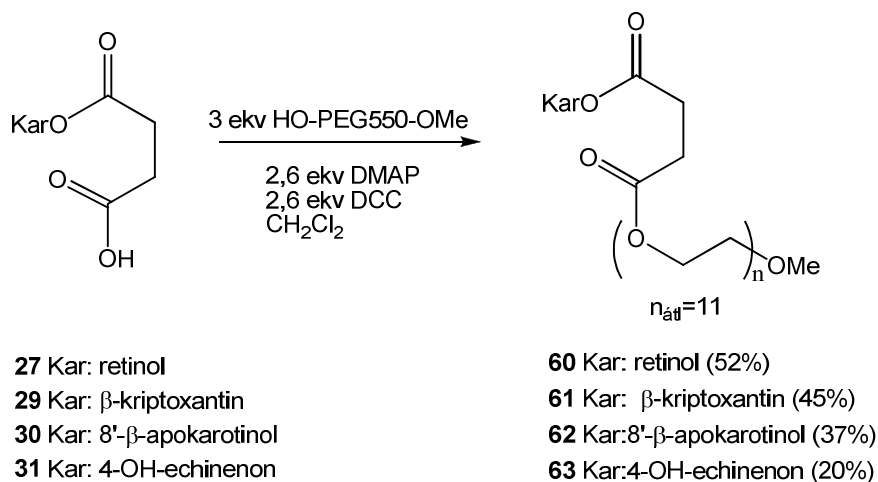
A dendrimerek előállítására irányuló kísérletek tehát az alábbi eredménnyel zárultak: apokarotinolokból sikerült 1. generációs dendrimereket előállítani, de ezek tovább már nem bővíthetők. A külső végükön szabad funkciós csoportot tartalmazó trimerek szintézise (dihidroxi-karotinoidokból) viszont nem járt eredménnyel.

2. Karotinoid-PEG konjugátumok előállítása

Számos biomolekulának (elsősorban peptidnek) állították már elő polietilén-glikollal (PEG) képzett konjugátumát, azonban kovalensen kötött PEG-karotinoid konjugátumokat korábban nem szintetizáltak. A PEG-konjugátumok kétségtelen előnye, hogy kevésbé

változtatják meg az ozmotikus homeosztázist, mint az ionos vegyületek, továbbá a PEG-konjugátumok vízoldhatósága nem pH-függő.

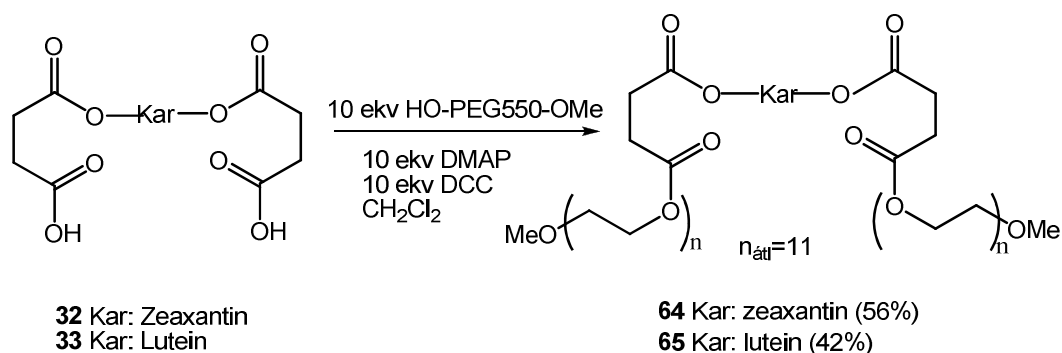
A feleslegben használt monofunkcionális polietilén-glikolt (PEG550-OMe, mPEG-550) észtereztük az előzőleg előállított karotinoid-szukcinátokkal (**27**, **29**, **30**, **31**) szobahőmérsékleten. A Steglich-féle eljárást alkalmazva, mint ahogy a dimereknél is tettük, dimetil-aminopiridint (DMAP) és diciklohexil-karbodiimidet (DCC) használtunk, így a kívánt termékeket elfogadható hozammal sikerült előállítani (24. ábra).



24. ábra. PEG-karotinoid konjugátumok előállítása

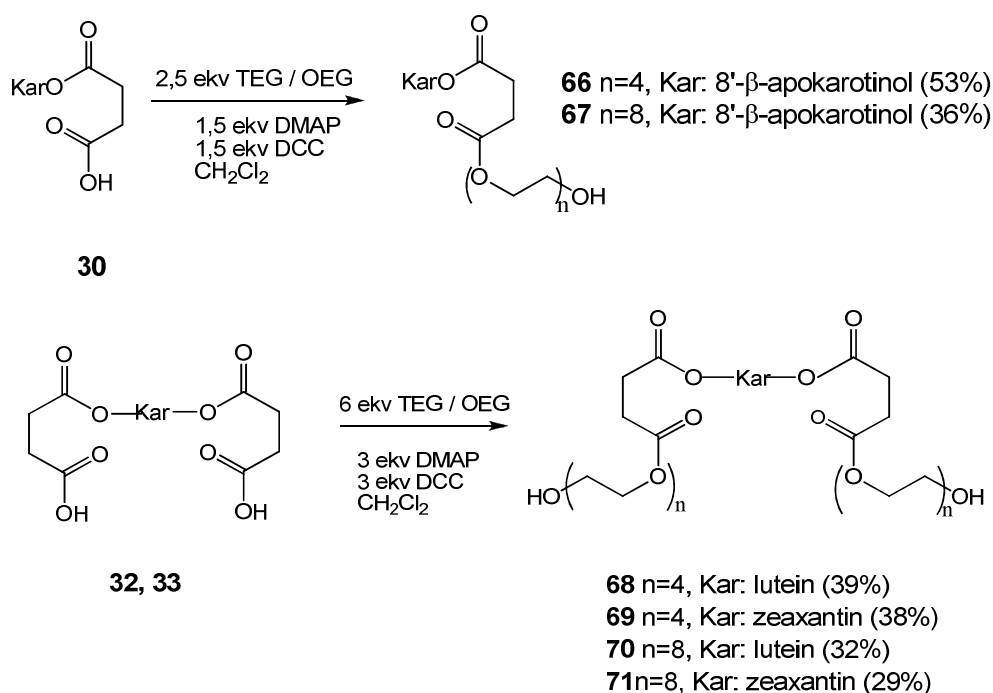
A termékeket a karotinoidok bomlása okozta melléktermékektől preparatív rétegekromatográfiával választottuk el. A **62**-as terméket előállítottuk mPEG550-szukcinát és 8'- β -apokarotinol reakciójával is, hasonló kitermeléssel, mint a fenti úton.

Karotinoid diszukcinátok esetén ugyanazon reakciókörülményeket alkalmazva a diszukcinát mindkét végéhez észterkötéssel tudtuk kapcsolni a mPEG550 polimert jó kitermeléssel (25. ábra, **64**, **65**).



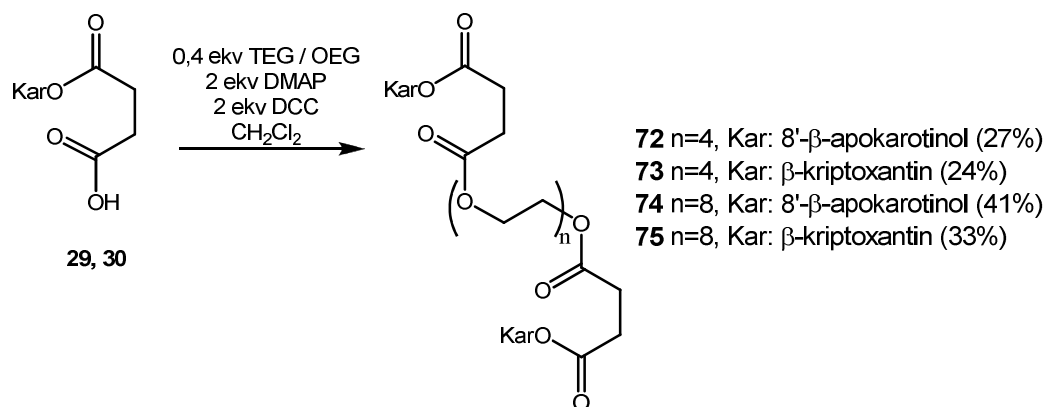
25. ábra. Bifunkciós karotinoidok mPEG550-el

Tetraetilén-glikollal és oktaetilén-glikollal is létrehoztuk a megfelelő karotinoidokkal alkotott konjugátumokat, észterestést alkalmazva (26. ábra). Akár karotinoid-szukcinát (**30**), akár diszukcinát volt a kiindulási anyag (**32, 33**), feleslegben a TEG-t, és az OEG-t alkalmaztuk, hogy a PEG-oknak csak az egyik vége reagáljon a szukcináttal (**66, 67, 68, 69, 70, 71**). Megfigyelhető, hogy a PEG-lánc hosszának növekedésével a kitermelés kismértékben csökken. Az így kapott termék előnye, hogy az egyik végén szabad hidroxil-csoportot tartalmaz, amely más molekulákhoz kapcsolható pl. észterestéssel.



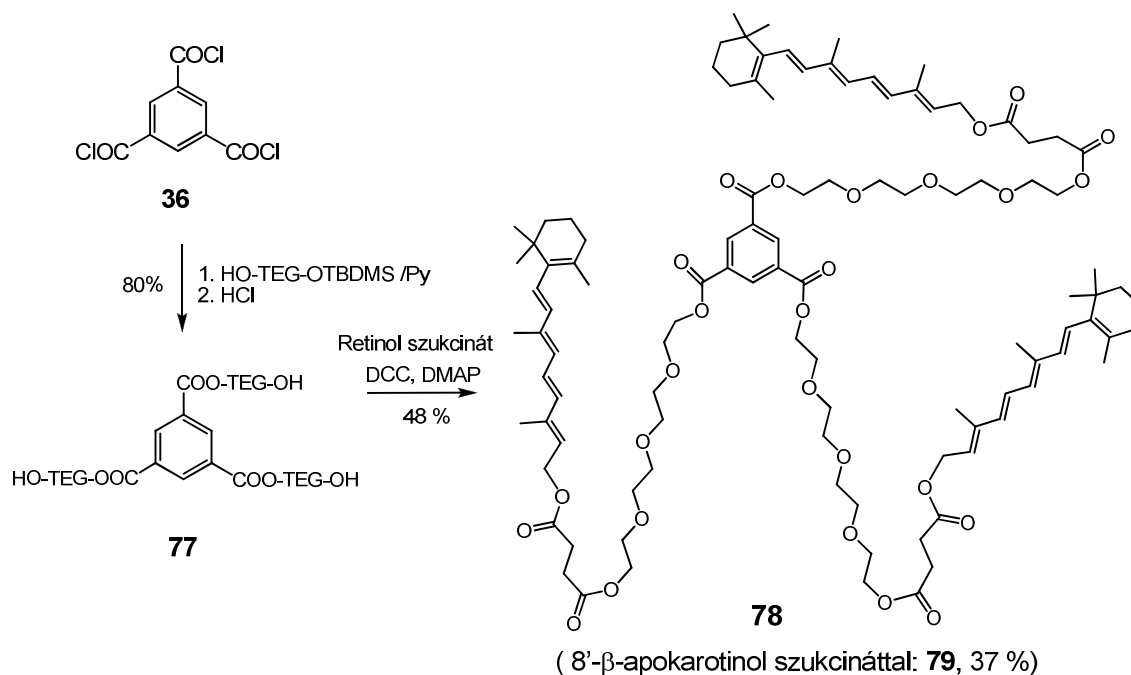
26. ábra. TEG- és OEG-karotinoid konjugátumok

A korábban használt módszerrel PEG láncsal összekapcsolt homodimereket is előállítottunk (27. ábra) karotinoid-szukcinátok feleslegben való alkalmazásával. A PEG-el képzett dimerek néhány melléktermék mellett keletkeztek, elfogadható hozammal. Ezeknek a vegyületeknek PEG-tartalma meglehetősen csekély, így jelentős vízdoldhatóságot nem várhatunk tőlük.



27.ábra. Karotinoid dimerek TEG- és OEG-el

Az aromás magot először TEG-al reagáltatva egy trifunkciós észtert állítottunk elő, majd azt reagáltattuk a megfelelő karotinoid szukcináttal. Ezzel a módszerrel egy trimert tudtunk előállítani (**78, 79**).



29.ábra. TEG tartalmú trimer előállítása

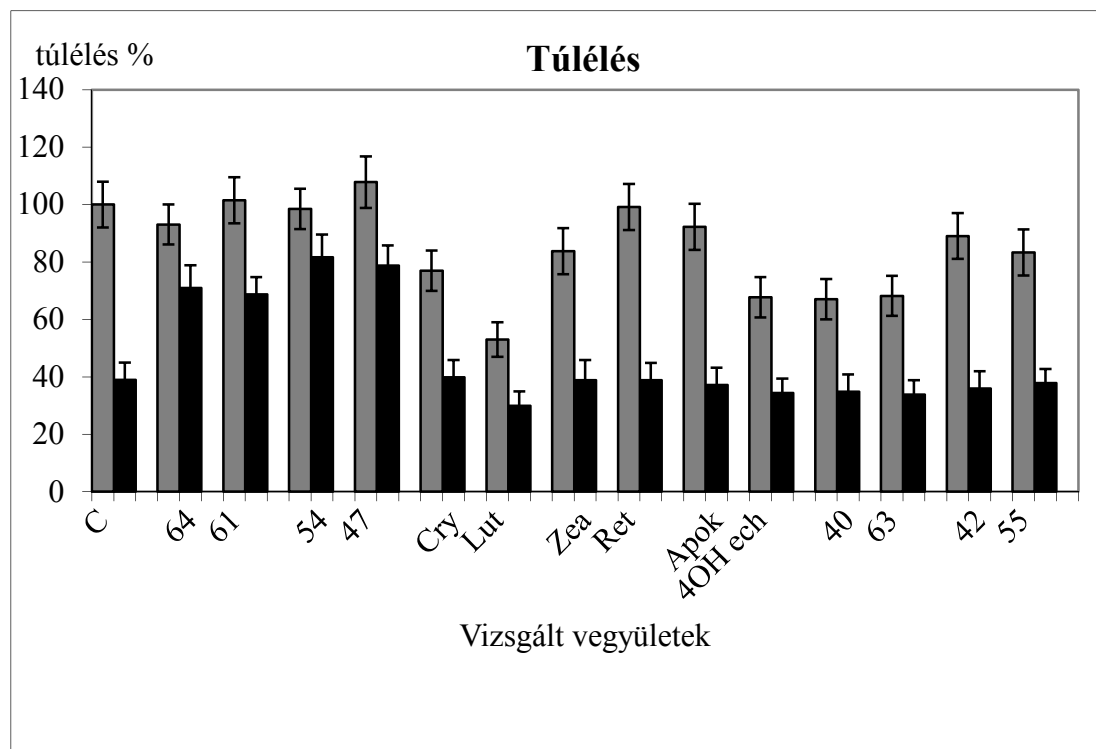
Néhány PEG-konjugátumnak megvizsgáltuk a vízdoldhatóságát és antioxidáns aktivitását. Az alábbi táblázat mutatja az eredményeket. A jobb oldali oszlopban 1 ml 96%-os etanolban a maximálisan feloldható anyag mennyisége található mg-ban. Ez az alkoholos oldat bármilyen arányban elegyedik vízzel anélkül, hogy zavarosodást és kicsapódást észlelnénk. Legnagyobb mennyiségben a zeaxantin-diszukcinát-mPEG550 konjugátum (**64**) oldódott etanolos vízben. Mint ahogy azt sejteni lehetett, a PEG-lánc számának és hosszának

csökkenésével az oldhatóság is csökken. A legrosszabb a dimerek esetében (72), ahol a PEG részaránya a molekulán belül igen kicsi.

2. Táblázat. Maximálisan feloldható anyag mennyisége 96% etanolban

Vegyület	mg/ml 96 % EtOH
61	37,5
63	3,34
64	66
66	2,7
71	2,67
72	0,375

Az antioxidáns vizsgálatokat emberi májsejtkultúrán végeztük. A sejteket az előállított hidrofíl karotinoidok vizes oldatával kezeltük, majd az oxidatív stressz kiváltására hidrogén-peroxidot használtunk. A sejtek túlélési arányát 1 nap múlva mértük. Az eredmények az alábbi diagramon láthatóak (30. ábra): a kontroll (C) a karotinoiddel nem kezelt állományt jelenti. A szürke oszlopok a hidrogén peroxidos kezelés nélküli túlélést a fekete oszlopok az oxidatív stressz utáni túlélést jelentik.



30. ábra. Májsejtek túlélési aránya oxidatív stressz után

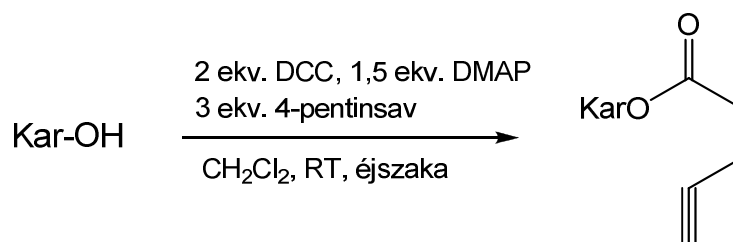
Mint látható, a kontroll és a hidrofób natív karotinoidokkal (*Lut (1)*, *Cry (3)*, *Zea (2)*, *Ret (8)*, *Apok (24)*) kezelt sejtek esetében megközelítőleg 40%-os az oxidatív stressz utáni túlélés. A PEG-konjugátumok (**64**, **61**, **63**) alkalmazása viszont jelentős túlélési arányt hozott, 80, 70, és 50% körüli értékekkel. A retinollal alkotott trimerek (**54**, **47**) mindegyike jó antioxidánsnak bizonyult a túlélési arány 80% körüli. Az ugyancsak retinollal alkotott dimer (**42**) hatása jóval gyengébb volt.

3. Karotinoidok click-reakciója

Végezetül célul tűztük ki a Click-reakció bevezetését a karotinoid kémiába.

A megfelelő azid és alkin funkciós csoportok kialakítására két megközelítés lehetséges. A karotinoid tartalmazhatja az azid-csoportot és a reaktáns az alkin-csoportot, vagy fordítva. A karotinoidokból egyszerűbb módon nyerhetünk alkinszármazékokat így elsősorban azok előállítására koncentráltunk.

4-pentinsav alkalmazásával karotinoid-pentinoátokat állítottunk elő jó hozammal. Ezeknek a vegyületeknek előnye, hogy jól kristályosíthatóak toluol/metanol/víz elegyből, mely még jobban megkönnyítette a velük való további munkát (39. ábra).



87 Kar: 8'-β-apokarotinol (75%, redukcióval)

88 Kar: β-kriptoxantin (90%)

89 Kar: zeaxantin (53%)

90 Kar: izozeaxantin (61%)

91 Kar: lutein (47%)

92 Kar: kapszantin (59%)

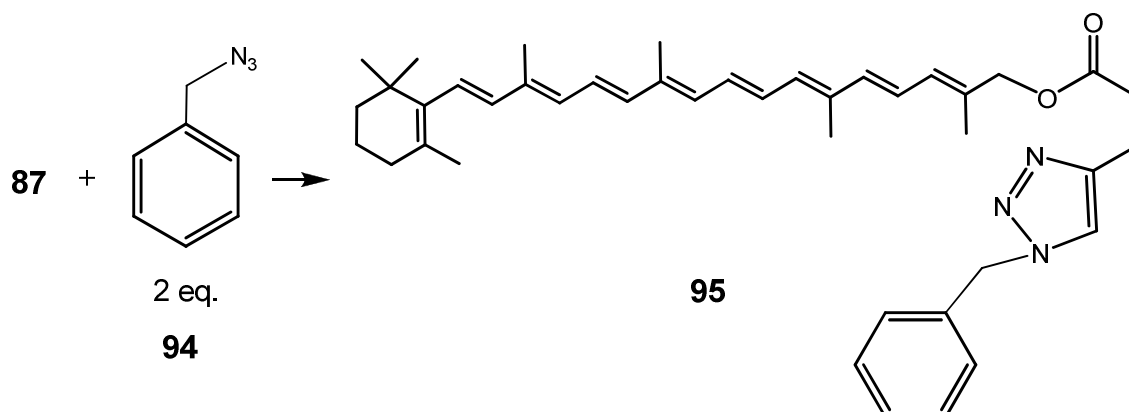
93 Kar: 4-hidroxi-echinenon (52%)

39. ábra. Karotinoid-pentinoátok képzése

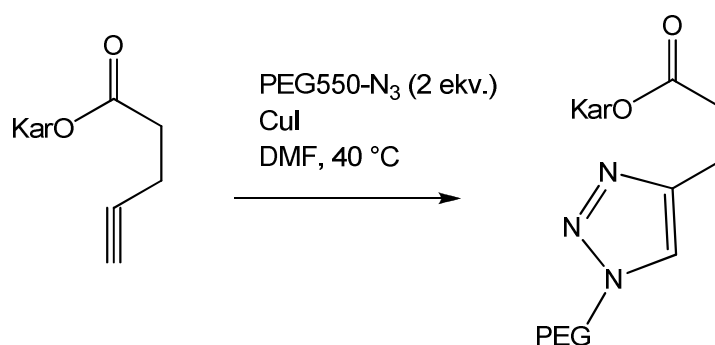
Az optimális reakciókörülmények megtalálásához az előzőleg szintetizált β-apokarotinol-pentinoátot reagáltattuk benzil-aziddal, mint modellvegyülettel, különböző feltételek mellett.

A réz(II)-szulfát/Na-aszkorbát alkalmazása, mint katalizátor nem bizonyult hatásosnak. A kísérletek alapján, a legjobb katalizátor/oldószer párosítás a CuI/DMF

kombináció, mind a reakcióidőt, mind a hőmérsékletet figyelembe véve. Ezek után az összes reakciót DMF-ben CuI-al végeztük el 40 °C-on.



Az előzőekben optimalizált reakciót PEG-karotinoid konjugátumok előállítására kívántuk felhasználni, így a korábban előállított PEG-karotinoid észterekkel analóg vegyületeket kaphatunk.



- 96 Kar: 8'-β-apokarotinol (52%)
- 97 Kar: β-kriptoxantin (47%)
- 98 Kar: zeaxantin (44%)
- 99 Kar: izozeaxantin (33%)
- 100 Kar: lutein (43%)
- 101 Kar: kapszantin (33%)
- 102 Kar: 4-hidroxi-echinenon (<3%)

40. ábra. Karotinoid-pentinoátok reakciója PEG-aziddal

A PEG-azid kiindulási anyagot monofunkciós mPEG550 tozilálásával vagy mezilálásával, majd NaN₃-al való szubsztitúciójával állítottuk elő, oldószerként DMF-et használtunk. A reakció szobahőmérsékleten egy éjszaka alatt lejátszódik. Az éteres icsapással tisztított terméket feleslegben reagáltattuk az előzőleg előállított különböző karotinoid-pentinoátokkal, click-reakcióban (40. ábra).

A reakciók többnyire jó kitermeléssel, rövid idő alatt lejátszódtak, így valószínűleg a click-reakció általánosan is alkalmazható lesz a karotinoidok körében.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

1. Magdolna Háda, Veronika Nagy, Anikó Takátsy, József Deli, Attila Agócs
Dicarotenoid esters of bivalent acids
Tetrahedron Letters, 49 (2008), 3524-3526. I.F: 2.54
2. Magdolna Háda, Veronika Nagy, Gergely Gulyás-Fekete, József Deli, Attila Agócs
Towards Carotenoid Dendrimers: Carotenoid diesters and triesters with aromatic cores
Helvetica Chimica Acta, (2010), 1149-1155, I.F. 1.28
3. Magdolna Háda, Dóra Petrovics, Veronika Nagy, Böddi Katalin, József Deli, Attila Agócs
First synthesis of PEG-carotenoid conjugates
Tetrahedron Letters, (2011), 3195-3197, I.F. 2.68.
4. Magdolna Háda, Veronika Nagy, Anikó Takátsy, József Deli, Jan Hait, Attila Agócs
Introduction of click chemistry to carotenoids
Tetrahedron Letters (2012), 2480-2482, I.F. 2.68 (2011)
5. Magdolna Háda, Veronika Nagy, József Deli and Attila Agócs
Hydrophilic Carotenoids: Recent Progress
Molecules (2012), 17, 5003-5012, invited review, I.F. 2.39 (2011)
6. Háda Magdolna, Nagy Veronika, Deli József, Agócs Attila
Hidrofíl karotinoidok
Magyar Kémiai Folyóirat (2013), 119, 115-119