

Doktori (PhD) értekezés

**Természetes és félszintetikus karotinoidok
folyadékkromatográfiás minőségi analízise**

Turcsi Erika

Témavezető és programvezető: Dr. Deli József



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

2016

Tartalomjegyzék

I.	Rövidítések.....	4
II.	Bevezetés	5
III.	Irodalmi áttekintés	6
3.1.	A karotinoidok szerkezete, spektroszkópiai tulajdonságok	6
3.2.	A karotinoidok előfordulása, izolálása	8
3.3.	Karotinoidok a táplálkozásban és hatásuk az egészségre	10
3.4.	A karotinoidok minőségi analízise	12
IV.	Célkitűzések	24
V.	Kísérleti rész	25
VI.	Eredmények	28
6.1.	C ₁₈ és C ₃₀ -as állófázisok összehasonlítása ⁵¹	28
6.1.1.	Szénhidrogének elválasztása	28
6.1.2.	Poláros karotinoidok elválasztása	29
6.1.3.	κ-karotinoidok elválasztása	32
6.1.4.	ε és β végcsoportot tartalmazó karotinoidok elválasztása	33
6.1.5.	Sztereoizomerek elválasztása.....	34
6.1.6.	Epoxikarotinoidok elválasztása	36
6.1.7.	Geometria izomerek (Z/E) elválasztása	38
6.2.	Alkalmazások.....	41
6.2.1.	A kanadai aranyvessző (<i>Solidago Canadensis L.</i>) és a vérehulló fecskefű (<i>Chelidonium majus L.</i>) virágának analízise	41
6.2.2.	Különböző sütőtök fajták karotinoid analízise ⁷⁷	43
6.2.3.	κ-végcsoportot tartalmazó karotinoidok vizsgálata komplex rendszerekben	46
6.3.	A nem hidroxilált végcsoportot tartalmazó karotinoid epoxidok analízise ^{58, 83}	56
VII.	Összefoglalás	67
VIII.	Irodalomjegyzék	69
IX.	Függelék	78
9.1.	Táblázat: C ₁₈ és C ₃₀ -as állófázisokon mért retenciós idők (Kísérleti rész 2. táblázat, I. és II. módszer)	78
9.2.	Táblázat: Néhány karotinoid össz- <i>transz</i> és <i>cisz</i> izomerjének retenciós ideje C ₁₈ és C ₃₀ -as állófázisokon.....	84
9.3.	Szerkezetek.....	85

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

I. Rövidítések

BP: benzpirén

DAD: diódasoros UV/Vis detektor

DNS: dezoxiribonukleinsav

ECD: elektronikus cirkuláris dikroizmus

HPLC: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

HPLC-CD: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt cirkuláris dikroizmus detektálás

HPLC-MS: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriai detektálás

HPLC-OR: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt optikai forgatóképesség detektálás.

HPLC-UV: nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt ultraviola és látható tartományú spektroszkópiai detektálás

MS: tömegspektrometria

NMR: mágneses magrezonancia vizsgálat

ODS: oktadecil-szilán

PAH: poliaromás szénhidrogén

ROS: reaktív oxigén származék

Rt: retenció idő

SANS: kiszögű neutronsóráás vizsgálat

TBN: tetrabenzó-naftalin

TMS: trimetil-szilán

UPLC: ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

UV/Vis: ultraviola és látható tartományú spektroszkópia

II. Bevezetés

Az ember és természet sokféle kapcsolatában számunkra talán a legtöbb esztétikai örömet a természet csodálatos színvilága adja. Az élővilág színeit, bár származhatnak tisztán fizikai jelenségekből is, legtöbbször szerves pigmentek idézik elő. A pigmentek közös tulajdonsága, hogy a „színhordozó” szerkezeti részükben, a kromoforjukban delokalizált π -elektronok vannak, amelyek a látható fény (400-800 nm) fotonjai hatására gerjesztődnek, előidézve a színérzet kialakulását. Nincs ez másképp a karotinoid molekulák esetében sem. Ősszel, mikor a zöld klorofill lebomlik a levelekben, láthatóvá válik a karotinoidok sárgától egészen a sötét pirosig terjedő színvilága. A tudomány mai állása szerint azonban ismeretes, hogy a karotinoidok nem csupán esztétikai jelentőséggel bírnak, de antioxidáns hatásúak is, emiatt bizonyos betegségek megelőzésében is komoly szerepük van.

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

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

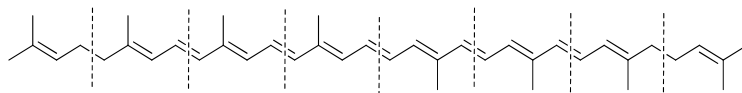
Mivel a karotinoidok analízise fontos mind a táplálkozástudomány, mind az egészségügy terén, *PhD.* munkámban célként tűztem ki, hogy elmélyedve a természetes karotinoidok minőségi analízisében, megtaláljam az adott feladatra leginkább alkalmas analitikai eljárást, és összehasonlítsam a karotinoidok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

A dolgozatban szereplő karotinoidok szerkezeti képletei megtalálhatók a **Függelékben** (9.2. Szerkezetek).

III. Irodalmi áttekintés

3.1. A karotinoidok szerkezete, spektroszkópai tulajdonságok

Több mint 600 különböző természetben előforduló karotinoid ismert, melyek szerkezete a 8 izoprénegységből álló C_{40} alapvázból vezethető le. Formailag az összes karotinoid a nyílt láncú $C_{40}H_{56}$ alapvegyületből, a likopinból (ψ,ψ -karotin) származtatható (**1. ábra**). Az alapszerkezet végcsoportjainak gyűrűvé záródása, az egyszerű oxigéntartalmú (hidroxil-, oxo-, karboxil-, éter-) funkciós csoportok megjelenése, a kettős kötések telítése, a hármas kötés vagy az aromás gyűrű kialakulása igen változatos szerkezeteket eredményez. A karotinoidok közé soroljuk a C_{40} -nél rövidebb, de hasonló felépítésű ún. apokarotinoidokat is, valamint az egy vagy két izoprén egységgel többet tartalmazó (C_{45} , C_{50}) származékokat is.



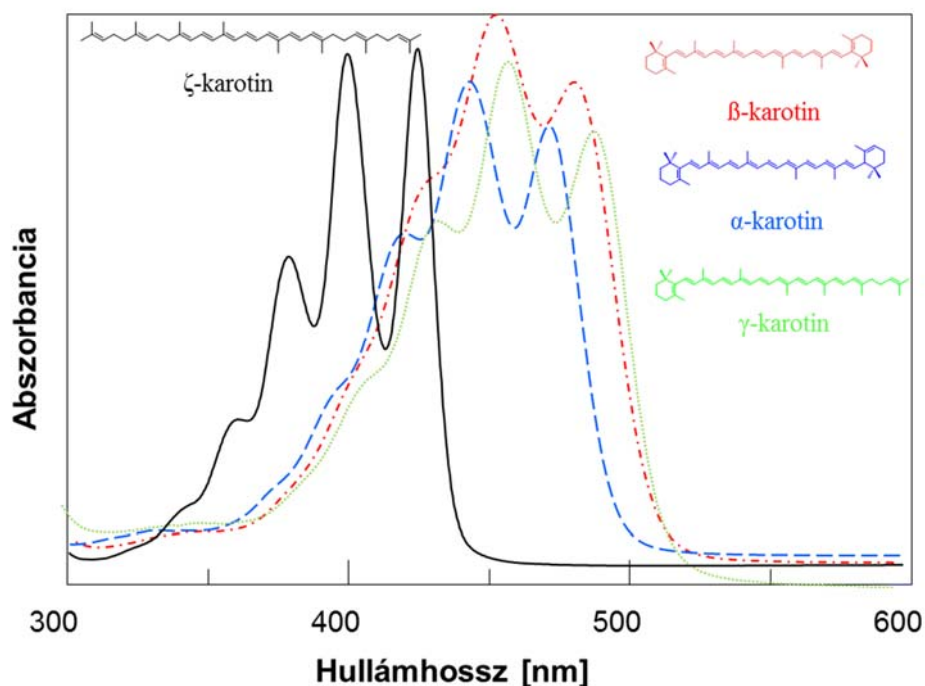
1. ábra. Izoprén egységek kapcsolódása a likopinban

Jellegzetes fényelnyelő képességük a konjugált kettős kötések alkotta hosszú kromofór, azaz a poliénlánc eredménye. A hét, vagy több kettős kötést tartalmazó kromofor fényelnyelése a látható tartományba esik (400-800 nm), így a karotinoidok többsége színes.

Az ultraibolya és látható tartományban mért spektrum (UV/Vis spektrum) az elsődleges eszköz a karotinoidok azonosítására. Az anyag abszorpciós maximuma (λ_{max} nm-ben) és a spektrum alakja (finomszerkezete) a kromoforra jellemző tulajdonságok. A legtöbb karotinoid három abszorpciós maximummal rendelkezik (**2. ábra**).

A konjugált kettős kötések számának növekedésével nőnek a λ_{max} értékek, azaz a szín mélyül. Így a leginkább telítetlen aciklikus karotinoid, a 11 konjugált kettős kötéssel rendelkező piros likopin abszorbeálja a legnagyobb hullámhosszú fényt (λ_{max} -ok 444, 471, 502 nm hexánban), míg a hét konjugált kettős kötést tartalmazó, szintén nyílt láncú ζ -karotin elnyelési maximumai lényegesen alacsonyabbak (λ_{max} -ok 379, 400, 426 nm hexánban), színe halvány sárga.

A végcsoportok ciklizációja a spektrumban hipszokróm eltolódást okoz, ez az elnyelési maximumok eltolódását jelenti alacsonyabb hullámhosszak felé.

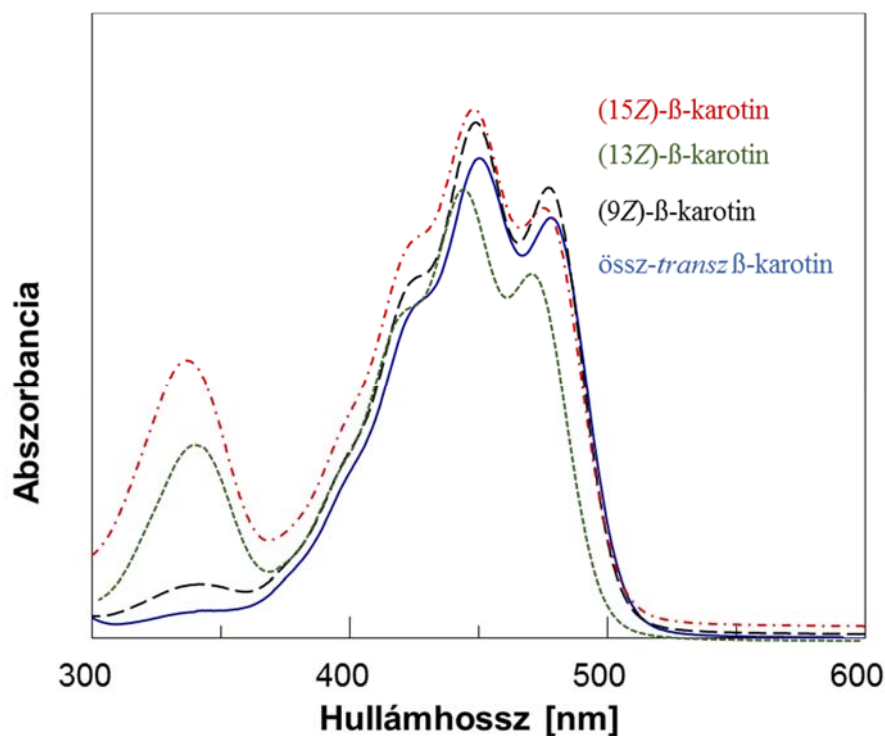


2. ábra. A ζ -karotin (379, 400, 426 nm), γ -karotin (437, 461, 492 nm), α -karotin (421, 445, 474nm) és a β -karotin (451, 478 nm) abszorpciós spektrumai hexán oldószerben.

A spektrumra a különböző funkciós csoportok is hatással vannak, például a karbonil csoport konjugációja batokróm hatású ($\lambda_{\max}$ -ok eltolódása a magasabb hullámhosszak felé), és a finomszerkezet is elvész.

A kettős kötések geometriai izomerizációja szintén változást okoz az *UV/Vis* spektrumban. A *cis* izomerizáció az *össz-transz* vegyület spektrumához képest kis hipszokróm eltolódást mutat (általában 2-6 nm csökkenés *mono-cis*zekre), valamint egy úgynevezett *cis* csúcs is megjelenik az ultraibolya tartományhoz közeli régióban (**3. ábra**). A *cis* geometriájú kettős kötés pozíciója a molekula közepe felé haladva növeli a spektrumban a *cis* csúcs intenzitását (**3. ábra**). A spektrum és a molekulaszervezet összefüggéseit részletesen tárgyalták Britton és Amaya.^{1, 2}

Szintén a poliénszerkezettel magyarázható, hogy a karotinoidok rendkívül érzékeny anyagok: könnyen oxidálódnak, fény, hő vagy sav hatására szerkezetük átrendeződik vagy elbomlanak.³



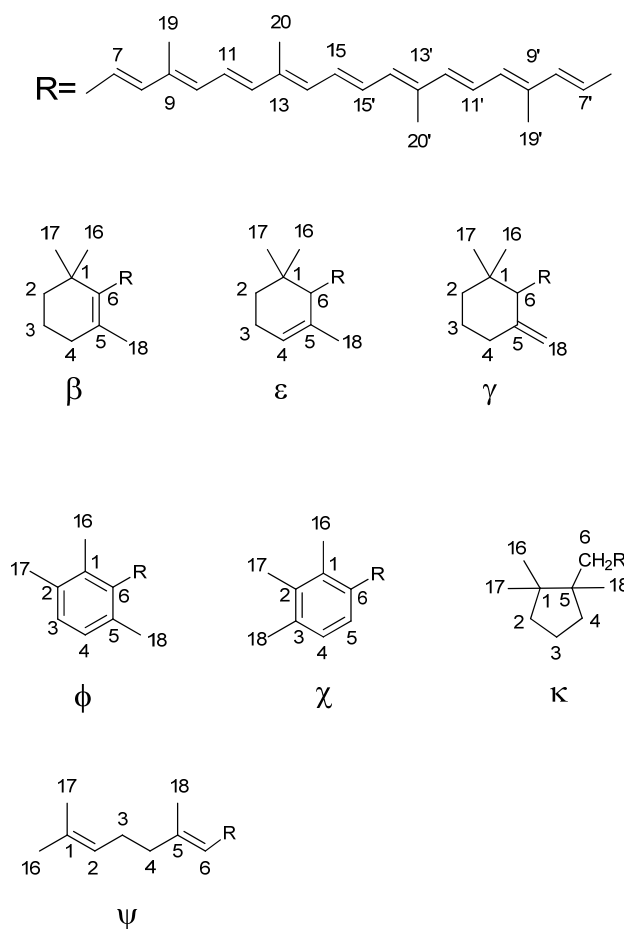
3. ábra. Az *össz-transz*-, (9*Z*)-, (13*Z*)- és (15*Z*)- β -karotin abszorpciós spektrumai hexánban.

3.2. A karotinoidok előfordulása, izolálása

A karotinoidok minden zöld növényben megtalálhatók, bár a klorofill lebomlásáig színük nem látható, hiszen a klorofill zöld színe elfedi a karotinoidokét. Legnagyobb mennyiségben karotinoidokat a magasabb rendű növények és az algák termelnek. A természetes évi karotinoid szintézis körülbelül 100 millió tonnára tehető, melynek fő komponense a barna tengeri moszat által termelt fukoxantin (**57**).⁴ A fototróp baktériumok sárga, narancs vagy piros színét szintén karotinoidok okozzák. A legszembetűnőbb természetes előfordulásuk a sárga-narancs színű virágoknál (pl. napraforgó, körömvirág) vagy a narancs-vörös gyümölcsöknél (pl. paradicsom vagy narancs) figyelhető meg. A sárgarépa, melynek fő komponense a β -karotin, latin nevéből (*Daucus carota*) eredeztethető a karotin elnevezés.

Az állati szervezet nem képes karotinoidokat szintetizálni, ennek ellenére sok állatnál szembetűnő a táplálékkal felvett színanyagok jelenléte (pl. az oxocsoportot tartalmazó asztaxantin (**65**) színe a flamingók rózsaszín tollában, vagy a lazac húzában). Gerinctelen tengeri állatoknál előfordul, hogy a karotinoidok (leggyakoribb az asztaxantin (**65**)) fehérjékkel kék vagy zöld komplexet képeznek, amely hő hatására elbomlik, és láthatóvá válik a karotinoid saját színe (pl. a homár élve kék, főzve piros, a denaturálódott fehérjéből felszabadult asztaxantin (**65**) miatt).

A karotinoidok jellemző alapszerkezetei a **4. ábrán** láthatók: a poliénlánchoz (R) változatos végcsoportok kapcsolódnak, melyek az egyes karotinoidokban különféle funkciókat hordozhatnak.



4. ábra. Jellegzetes végcsoportok.

A leggyakoribbak és legismertebbek a β - és az ϵ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok, kutatócsoportunkban azonban több évtizedes története van a κ -karotinoidok vizsgálatának is. Ezek a vegyületek a piros paprika jellegzetes pigmentjei ⁵⁻⁹, de előfordulnak egyéb, trópusi gyümölcsökben is.

A karotinoidok, kevés kivételtől eltekintve, alapvetően vízben igen rosszul oldódó, hidrofób vegyületek. Összetételük és polaritásuk alapján két nagy csoportra oszthatók:

1. Karotinok (szénhidrogének)
2. Xantofiliek (oxigént tartalmazó vegyületek).

Az oxigéntartalmú xantofiliek legtöbbször zsírsavval észterezett formában fordulnak elő a természetben, és néhány karotinoid-glikozid vagy glikozil-észter is ismert. Az izolálás során

az elroncsolt növényi szövetekből metanollal, majd éterrel extrahálják a pigmenteket. Az extraktumokat lúggal kezelve a szabad karotinoidok éterrel kivonhatók a reakcióelegyből, míg a keletkező egyéb termékek a lúgos-vizes elegyben maradnak. Az így kinyert karotinoid keveréket vizes metanol és hexán rendszerben megoszlatva igen hatékonyan szétválaszthatók az apoláros karotinok és hidroxikarotinoidok a polárosabb egyéb xantofilektől.¹⁰

3.3. Karotinoidok a táplálkozásban és hatásuk az egészségre

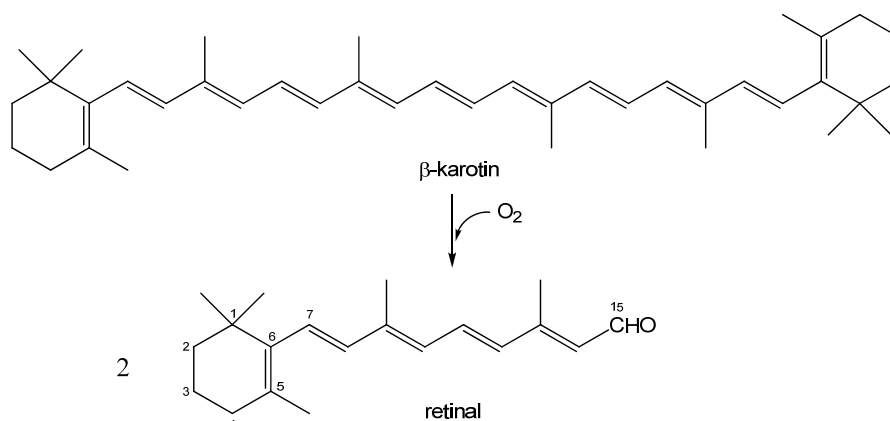
A karotinoidok az élő szervezetekben fontos szerepet töltenek be a fényabszorpció és a fényvédelem mechanizmusában. Antioxidáns hatásuk révén képesek a szabad gyökök megkötésére, így megakadályozzák a lipid peroxidációt, a DNS és más biomolekulák oxidatív károsodását.

Az élelmiszeriparban a karotinoidokat elsősorban természetes színező anyagokként használják. Néhány természetes extraktum már évszázadok óta használatos színyanyag, pl. az annatto (bixin **(101)**), a sáfrány (a krocin karotinoid alkotója a krocetin **(102)**), a paradicsom (likopin **(7)**) vagy a paprika (kapszantin **(71)**) kivonatai. Alacsony stabilitásuk miatt alkalmazásukat visszaszorították a mesterséges színezékek,¹¹ ám manapság egyre inkább újra előtérbe kerül a természetes színezékek használata.

Az emberi táplálékban alapvetően β -karotin **(1)**, α -karotin **(2)**, β -kriptoxantin **(10)**, likopin **(7)** és a lutein **(14)** fordulnak elő, ill. ezek a karotinoidok találhatóak meg a vérplazmában is. Ezen anyagok és a zeaxantin **(16)**, mely nem vagy kis mennyiségben fordul elő a táplálékban, mutatnak az egészséget pozitívan befolyásoló hatásokat.

A leggyakoribb karotinoid a táplálékban a β -karotin **(1)** (sárgarépa, sárgabarack, mangó stb.). A likopin **(7)** adja sok piros húsú gyümölcs és zöldség színyanyagát, például a paradicsomét, a görögdinnyéét vagy a piros grépfrútét. A biciklikus α -karotin **(2)** és monociklikus γ -karotin **(4)** legtöbbször a β -karotin **(1)** kísérői. A xantofiliek, úgymint a β -kriptoxantin **(10)**, a narancssárga húsú gyümölcsök fő színyanyaga, pl. barack, nektarin, narancs húsú papaya stb. A lutein **(14)** főként a levélben, zöld zöldségekben és sárga virágokban fordul elő nagyobb mennyiségben, a zeaxantin **(16)** a lutein **(14)** kísérője, de kisebb mennyiségben.² Az igen könnyen végbemenő degradációjuk miatt az epoxi- és hidroxikarotinoidok tényleges mennyisége kérdéses, mert az izolálás és analízis során szerkezeti változást szenvedhetnek. A ketokarotinoidok közül magyar vonatkozása miatt kell megemlíteni a pirospaprika színét adó kapszantint **(71)** és kapszorubint **(75)**.^{2, 9}

Közismert, hogy a β -karotin (**1**), az α -karotin (**2**) és a β -kriptoxantin (**10**) az A-vitamin előanyagai¹¹ (**5. ábra**). A-vitamin a szubsztituátlan β -jonon gyűrűt tartalmazó karotinoidok centrális oxidatív hasadásakor keletkezik, tehát a β -karotin (**1**) a leghatásosabb A-vitamin prekursor, hasításával két retinal molekula képződik. Az α -karotin (**2**) és β -kriptoxantin (**10**) A-vitamin aktivitása 50%-al alacsonyabb a β -karotinhoz képest, hiszen ezek egy β -jonon gyűrűt tartalmaznak.



5. ábra: A retinal képződése β -karotinból

A karotinoidok, függetlenül elővitamin jellegüktől, jótékony hatással vannak az emberi szervezetre, az egészségre: csökkentik a degeneratív betegségek kockázatát, úgymint a rákét¹²⁻¹⁴, a szív- és érrendszeri megbetegedéseket^{12, 15}, a szürkehályogét és a makuladegenerációét¹⁶. A karotinoidok betegségekkel szembeni jótékony hatását elsősorban antioxidáns tulajdonságuknak tulajdonítják¹⁷, semlegesítik a szingulet oxigént és a szabad gyököket. A szingulet oxigén kioltási képesség kapcsolatban áll a konjugált kettős kötés rendszerrel. A kilenc vagy több konjugált kettős kötést tartalmazó karotinoidokat találták a leghatásosabbnak ezen a területen. Antioxidáns hatásukat a szervezetben kialakuló reaktív oxigén származékokkal (ROS) reagálva a poliénlánc felhasadása, ill. oxidálódása révén fejtik ki.¹⁷ A nyílt láncú likopin (**7**) hatásosabb antioxidáns, mint a két gyűrűs végcsoportot tartalmazó β -karotin (**1**), annak ellenére, hogy mindkét molekula tizenegy konjugált kettős kötés tartalmaz.^{18, 19}

A lutein (**14**) és a zeaxantin (**16**) alkotják a szemben, a makulában a sárga pigmenteket.¹⁶ Szignifikánsan inverz összefüggést találtak ezen karotinoidok plazma koncentrációja, ill. napi bevitele, és a makuladegeneráció kockázata között, mely a leggyakoribb okozója az időskori vakságnak. A szürkehályog kialakulásának kockázata is csökkenthető folyamatos bevitelükkel.¹⁶

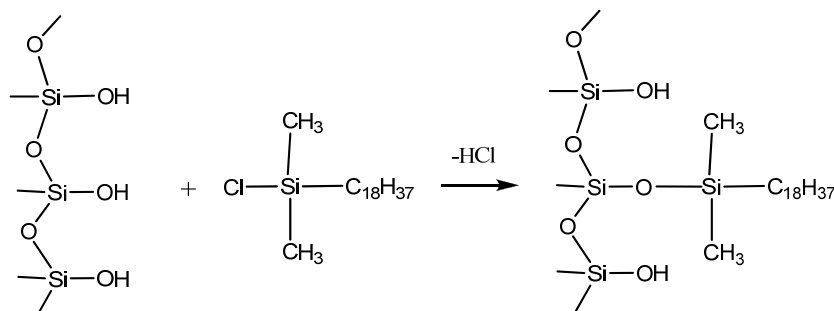
3.4. A karotinoidok minőségi analízise

Az 1920-as évek végén intézetünkben, az akkori Magyar Királyi Erzsébet Tudományegyetem Kémiai Intézetében Zechmeister László és kollégái kromatográfiás eljárást kezdtek el kidolgozni a karotinoidok elválasztására. Az általuk kifejlesztett eljárás hosszú ideig mind analitikai, mind preparatív méretben az egyedüli elválasztási módszer volt ezen molekulákra. A technológia fejlődésével mára a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia és ennek különböző fajtái váltak a karotinoid analízis leghatékonyabb eszközévé. A nagy érzékenységu HPLC berendezések és a hozzájuk kapcsolt diódasoros *UV/Vis* és MS detektorok lehetővé teszik akár a nyomokban előforduló karotinoid komponensek analízisét és az izomerek elválasztását.

A karotinoidkutatás terén első alkalommal egy 1971-ben közölt munkában írtak le folyadékkromatográfiás eljárást citromhéj extraktum analízisére.²⁰ Itt még kicsapott (precipitated) ZnCO_3 -t és MgO -t használtak adszorbensként/állófázisként acél oszlopba töltve, és 440 nm-en detektálták a komponenseket. Normál fázisú technikákkal kísérleteztek még a 80-as években is, többek között aluminium-oxid, Ca(OH)_2 és szilikagél állófázisokkal. A normál fázisú kromatográfiás oszlopokkal kapcsolatban azt tapasztalták, hogy karotin izomerek elválasztására alkalmasak (pl. kantaxantin (**63**) és β -karotin (**1**) *cisz*-izomerek elválasztása).²¹⁻

²³ A poláros állófázist és apolárosabb eluent tartalmazó, ún. normál fázisú HPLC-s eljárások legfőbb problémája a vízérzékenység. A normál állófázisok felületükön szabad hidroxilcsoportokat tartalmaznak, melyek már igen kis mennyiségű víz hatására is deaktiválódnak, a vízmolekulákkal kialakuló H-hidak miatt. A karotinoidok analízisekor legtöbbször növényi mintákból nyert extraktumokat vagy standardokat használunk, ahol nehéz tökéletesen kiküszöbölni a víz jelenlétét. A szilikagél kolonnák esetében a töltet savassága is problémát jelentett, hiszen a karotinoidok rendkívül érzékenyek savakra, mérés közben a kolonnán történő geometriai izomerizációt vagy egyéb átalakulást nem tudták kizárni. A normál fázisú rendszereket az analitika más területein is kiszorították a fordított fázisú HPLC-s eljárások, a normál fázis kis terhelhetősége (kis kapacitása), illetve heterogén adszorpciós tulajdonságai miatt. Az 1990-es évek elején már szilikagél alapú fordított fázisú folyadékkromatográfiás technikát alkalmaztak a karotinoidok analízisében.^{24, 25} A fordított fázisú rendszerek esetében a mozgófázis, azaz az eluens polárosabb, mint az állófázis. Az alkalmazott állófázisok nagy része valamilyen módosított szilikagél, amely 1000 bar nyomásig nagy mechanikai stabilitással bír, tehát a gyakorlati alkalmazásban nincs nyomáskorlát. A szilikagél gyakorlatilag polikovasav, felületét hidroxilcsoportok borítják, ezt az erősen poláros felületet módosítják szilanizálási

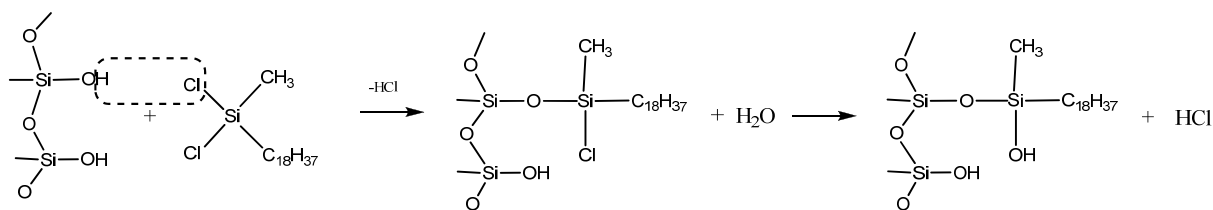
reakcióval. A módosítás során leggyakrabban alkil-klór-szilánokkal reagáltatják a hidroxilcsoportokat és apoláros szénláncokkal 'fedik le' a felületet (**6. ábra**). A szililezőszerrel felvitt szénlánc hossza leggyakrabban C₈, C₁₈, C₂₂ vagy C₃₀. Mára a leginkább elterjedt, nemcsak a karotin analízis területén használt, C₁₈-as szénlánccal módosított szilikagél alapú állófázis lett (ODS=octadecyl-silan). Ha az alkalmazott módosító szénlánc hossza kicsi, akkor a mintakomponensek az el nem reagált és hozzáférhető szilanol csoportokkal is kapcsolatba lépnek, emiatt a kinetikai hatékonyság romlik. Viszont ha a felvitt szénlánc túl hosszú, akkor a ligandumokból álló filmrétegben túl sok időt tölt el az analit molekula, szintén rontva a kinetikai hatékonyságot.²⁶ A rövidebb szénlánccal (C₈) módosított szilikagélek szelektivitása karotinoidokra és poliaromás szénhidrogénekre (PAH) is nagyságrendekkel rosszabb, mint a C₁₈-as állófázisoké.^{27, 28} A tizenhatszénatomos apoláros szénlánccal módosított állófázisok előnye még, hogy a legtöbb oldószerrel kompatibilisek, a karotinoidok teljes polaritás tartományában kiválóan használhatóak, kereskedelembe könnyen hozzáférhetőek és az árak is kedvező. Meg kell említenünk itt a mára „karotinoid fázis” néven elterjedté vált C₃₀-as állófázisok térhódítását is.



6. ábra. Szilanizálási reakció monoklór-trialkil-szilánnal (monomer fázis).

A szilanizálással módosított állófázisokat a keletkező szerkezetek alapján három csoportba soroljuk:

- monomer, illetve monomer módosítású fázis, ahol monofunkciós klór-szilánokat alkalmaznak a reakció során (**6. ábra**)
- átmeneti, illetve átmeneti módosítású fázis, ahol bifunkciós klór-szilánokat kapcsolnak a szilikagél felületére (**7. ábra**)
- polimer, illetve polimer módosítású fázis, ahol a triklór-szilánokat feleslegben alkalmazzák, és többszörösen elágazó szerkezetű alkil-szilikát felület keletkezik.

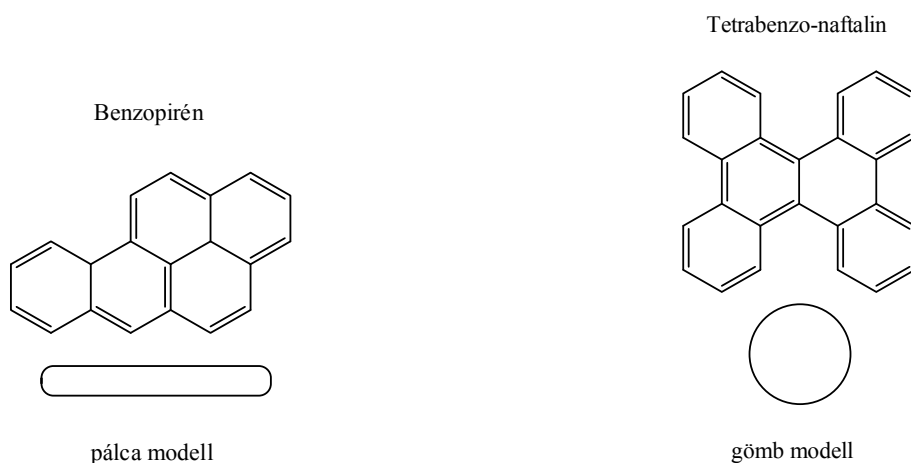


7. ábra: Szilanizálási reakció diklór-dialkil-szilánnal (átmeneti fázis).

Ezekkel a reakciókkal nem érhető el teljes borítottság a szilikagél felületén, mindhárom fajta módosítás után maradnak elreagálatlan, szabad vagy éppen árnyékolt szilanol (hidroxil-) csoportok, melyek hozzáférhetőek lehetnek az analitmolekulák számára. Ezek a poláros csoportok kölcsönhatásba léphetnek az analittal és így a kromatográfiás tulajdonságok töltetről töltetre, sarzsról sarzsra változnak. A szabad szilanol csoportok jelenléte miatt tehát az ilyen oszlopok tulajdonságai nem reprodukálhatóak, így ezeket a tölteteket idővel teljes egészében felváltották az utánszilanizált (endcapped) szilikagél alapú állófázisok. Ezenél a típusoknál a gyártás során a szilanizálási reakciót egy úgynevezett utánszilanizálás követi, mely során – általában trimetil-klór-szilánnal reagáltatva a módosított szilikagélt – csökkentik a hozzáférhető szilanol csoportok számát.

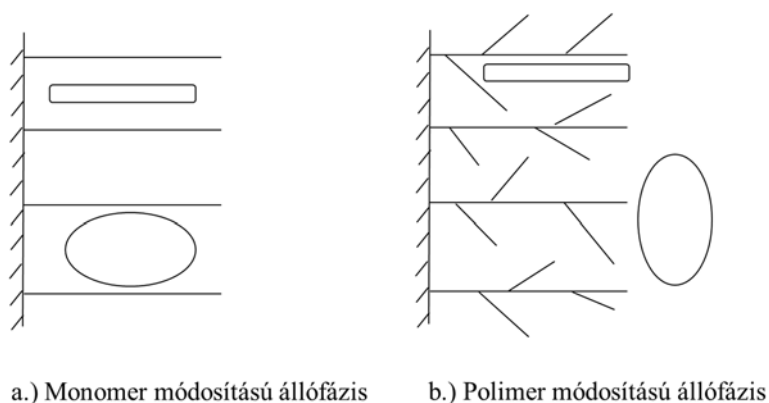
Az átmeneti módosításnál, (**7. ábra**) új hozzáférhető szilanol-csoportok jelennek meg a felületen, amelyek megváltoztatják a hidrofób/hidrofil felületarányt. Egymástól eltérő tulajdonságú állófázisokat kapunk, a töltetek minősége sarzsról sarzsra változhat.

A polimer-monomer fázis megkülönböztetésének egyik és legelterjedtebb módja, ha benzpirént (BP) és tetrabenzo-naftalint (TBN) (**8. ábra**) tartalmazó tesztelegyeket juttatunk a kolonnára, és vizsgáljuk a relatív retenciójukat. A két molekulának eltérő az alakja: a benzpirén hosszúkás pálcika alkatú, a tetrabenzo-naftalin pedig gömbszimmetriát mutat.



8. ábra. Az alakszelektivitás ellenőrzésére használt vegyületek (pálcika-gömb modell).

Ha azonos a vizsgálandó vegyületek hidrofób jellege, akkor a molekulák alakja szabja meg a retenciót, ezt hívják alakszelektivitásnak.²⁶ A monomer borítású szilikagélen a BP és a TBN hasonlóan férnek hozzá az állófázishoz, ott a mozgófázisban való oldhatóság szabja meg az elválasztást (**9a. ábra**). Minél nagyobb azonban polimerizáció foka, a TBN annál kevésbé tud behatolni a dendrimer szerkezetbe, ellenben a pálcika alakú BP kedvező kölcsönhatásokat alakít ki az elágazó szerkezettel (**9b. ábra**).



9. ábra. Monomer (**a.**) és polimer (**b.**) módosítású állófázisok hozzáférhetősége a minta molekulák számára, BP és TBN tesztmolekulákkal (pálcika-gömb modell) bemutatva.

A policiklusos aromás szénhidrogénekkal (PAH) modellezett rendszerrel előrevezethető, hogy karotinoidok esetén a polimer borítottságú állófázisok jobb elválást adnak: a hosszú szénláncú karotinok a pálcika alakú BP-hez hasonlóan viselkednek az állófázison.

A 80-as években még a monomer módosítású fázisok voltak az elterjedtebbek, mert előállításuk egyszerűbb volt. Hamar kiderült azonban, hogy a polimer módosítású állófázisok

hatékonysága sokkal nagyobb a hasonló szerkezetű anyagok elválasztása terén, ez bebizonyosodott a karotinoid izomerek analízise esetén is.²⁸⁻³⁰ Epler és társai hatvanöt féle, főként C₁₈-as monomer, oligomer és polimer módosítású fázist vizsgáltak hét karotinoid elválasztására és visszanyerésére.³¹ Szelektivitás (selectivity) szempontjából a polimer módosítású C₁₈-as szilikagélek bizonyultak a legmegfelelőbbnek. Monomer oszlopokkal a lutein (**14**) és zeaxantin (**16**) elválasztása nem volt megvalósítható, illetve megemlíti a geometriai izomerek elválasztásának hatékonyságát a polimer módosítású oszlopokon.³² A visszanyerés (recovery) vizsgálatánál nem függetleníthető az állófázis fajtája az alkalmazott eluenttól. Mind monomer mind polimer módosítású (illetve oligomer módosítású) állófázisnál a metanol és metanol alapú eluensek növelték a visszanyerési százalékot.³¹

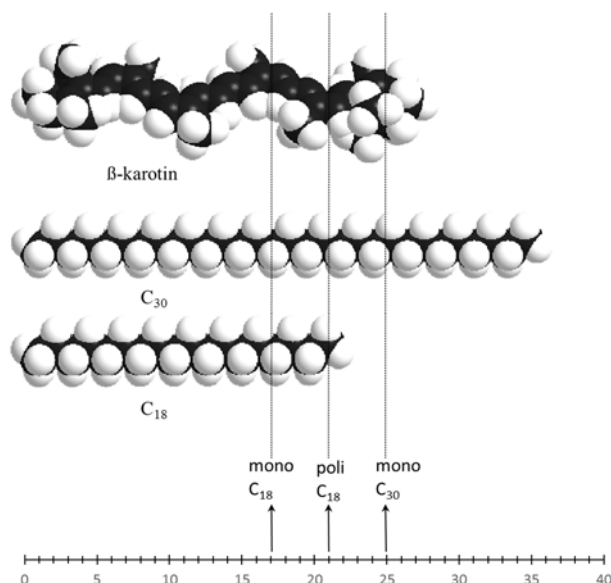
A felületi borítottságon (carbon load) kívül az állófázisok egyéb tulajdonságai is befolyásolják az elválasztás hatékonyságát, úgymint a szilikagél szemcsék mérete (szemcseméret), alakja vagy a szemcséken belüli pórusok mérete (pórusméret). A kromatográfusok a szemcseméret csökkentésével növelték az elválasztás hatékonyságát, mára szinte kizárólag az 5 és 3 µm-es vagy ennél kisebb szemcseméretű tölteteket alakalmazzák. A kis szemcseméret előnye, hogy növeli a hatékonyságot²⁶ és csökkenti az oldószer fogyasztást kisebb oszlopok használatával. Hátrányuk az oszlopok élettartamának rövidülése a megnövekedett háttérnyomás miatt, illetve a kis oszlopok, valamint a hozzájuk használt vékonyabb kapillárisok könnyen eldugulnak. A minták itt több előkészítést (szűrést, tisztítást) igényelnek. Ez a követelmény különösen hátrányos növényi mintákból extrahált karotinoidok esetében, ahol a karotinoidok érzékenysége miatt igyekszünk minimalizálni a mintaelőkészítési lépések számát. Az alaposabb mintaelőkészítés helyett, vagy mellett használhatók előtét oszlopok (guard column). Karotinoidanalízisben a 25 cm hosszú acél oszlopokba töltött 5 és 3 µm-es szemcseméretű fordított fázisú töltetek használata a legelterjedtebb. Az irreguláris szemcsealakot felváltotta a gömb alakú szilika szemcse, mellyel egységesíteni tudták az állófázis szemcseméretét és reprodukálható tulajdonságú oszlopokat gyárthattak. A kísérletek alapján a pórusméret csupán különböző hosszúságú karotinoidok esetén (pl. likopin (**7**) és β-karotin (**1**)) van hatással a szelektivitásra. Azonos méretű karotin szénlánc esetén ez a hatás nem érvényesül.³¹ Eltérő hosszúságú karotinoidok elválasztásakor a pórusméret növekedésével csökken a szelektivitás, tehát a kisebb pórusméret a kedvezőbb. A nagyon kis pórusméretek (15, 20, 30 Å) viszont – karotinoidok esetében – felvetik a méretkizárás problémáját. A pórusméret és a felületi borítottság nagymértékben összefüggő paraméterek. A felületi borítottság növelésének egyik módja az alap szilikagél felületének növelése kis pórusméretű szilika gyöngyök használatával. Manapság a leginkább használatosak a 100 Å pórusméretű

állófázisok, a felület borítottsága eltérő lehet, de a fent tárgyaltak alapján a polimer módosítású fázisok váltak elterjedté.

Elsőként Sander és munkatársai 1994-ben számoltak be a C₃₀-as állófázis fejlesztéséről, amikor harminc szénatomos triakontil-klórszilánnal végezték a szilanizálási reakciót.³³ Az itt kifejlesztett polimer utánszilanizált C₃₀-as töltet lényegesen jobb szelektivitást adott az összes vizsgált karotinoidra (asztaxantin (**65**), kapszantin (**71**), lutein (**14**), zeaxantin (**16**), kantaxantin (**63**), β -kriptoxantin (**10**), echinenon (**59**), 9-*cisz*-, 13-*cisz*-, 15-*cisz*- β -karotin, *transz*- β -karotin (**1**), α -karotin (**2**), δ -karotin (**6**) és likopin (**7**)). Látható, hogy igyekeztek lefedni az egész polaritási tartományt. Különösen nagy növekedést tapasztaltak a β -karotin izomerek elválasztásának hatékonyságában a polimer módosítású C₁₈-as oszloppal szemben. Sander és társai kisszögű neutronszereléssel (SANS) vizsgálták a különböző általuk előállított C₁₈ és C₃₀-as töltetek borítottságának vastagságát (azaz a szilikagélre kapcsolt tizenkilenc és harminc szénatomos alkilcsoport alkotta „héj” vastagságát) (**1. táblázat**).³⁴ A kisszögű neutronszerelés (small angle neutron scattering-SANS) egy anyagszerkezet vizsgálati módszer, amellyel nanométeres mérettartományban tárhatjuk fel a minta tulajdonságait. Neutronokkal sugározzák be a mintát, mely roncsolásmentesen halad át rajta és az áthaladás során szóródik, azaz az eredeti iránytól elhajolva halad tovább a mintából kilépve, a szórásképet vagy szórási sűrűséget a minta részecske mérete és alakja határozza meg. A vizsgálható mérettartomány 2-400 nm. Sanderék 1985-ben szilikagélt vizsgálva SANS módszerrel azt találták, hogy nemcsak a szilika részecskének de a bennük található pórusoknak is van szórási sűrűsége (amely üres pórusok esetén 0).³⁵ Később a pórusok neutronszerelésének elkerülése érdekében, és hogy a kromatográfiai körülményeket modellezzék, metanolban szuszpendálva vizsgálták az alkil láncsal borított tölteteket. Azt találták, hogy a szilika szemcsék felületét borító réteg vastagsága minden esetben kisebb, mint a megfelelő *s-transz* konformációjú szénlánc hossza. Tehát például C₁₈-as töltet esetében az oktadecán szénlánc hossza számítások alapján 23 Å, míg a polimer módosítású C₁₈-as szilikagél héj vastagsága a SANS mérések alapján csak 21 Å. Ennek oka, hogy oldószerben a szénláncok jelentős része hajlított, illetve rendezetlen állapotban van. Ugyanezt tapasztalták a C₃₀-as töltet és triakontán összehasonlításakor is. Azt a következtetést is levonták, hogy a polimer módosítású állófázisok vastagabbak, mint a monomer módosításúak. Az **10. ábrán** jól látható, hogy a monomer módosítású C₃₀-as állófázis vastagsága majdnem eléri a karotinoidok (30 Å) hosszát, míg a polimer C₁₈-as fázis lényegesen vékonyabb. Így könnyen elképzelhető, hogy a karotinoidok és a C₃₀-as állófázis között kialakuló kölcsönhatások lényegesen erősebbek, mint az oktadecil fázisoknál létrejövők, ez nagymértékben növeli az előbbi fázis szelektivitását karotinoidokra.

1. táblázat. Alkilláncsal módosított szilikagél héjvastagsága.³⁴

Állófázis típusa	vastagság (nm)
C ₁₈ monomer	1,7±0,3
C ₁₈ polimer	2,1±0,3
C ₃₀ monomer	2,5±0,4

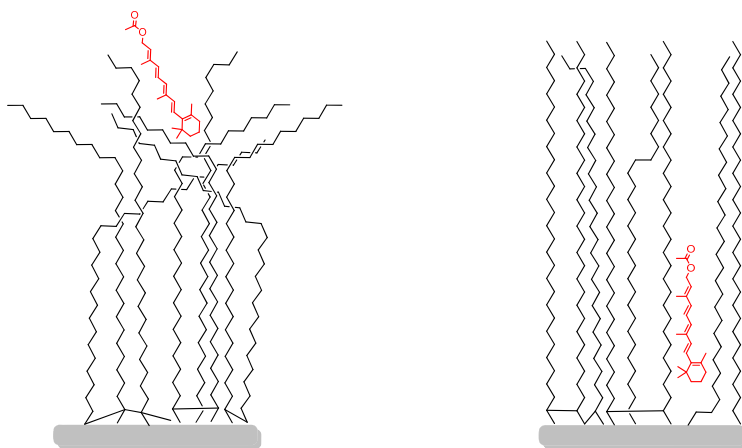


10. ábra. A β -karotin (1) és *s-transz* szénhidrogének kalottamodellje. A függőleges pontozott vonalak jelzik a különböző állófázisok vastagságát kisszögű neutronszórás (SANS) vizsgálattal kapott eredmények alapján.³³

Az állófázis minőségén kívül természetesen az alkalmazott eluens vagy eluensek is hatással vannak az elválasztásra. A karotinoidok gyakorlatilag vízben oldhatatlanok, így a víz mint eluens csak módosító adalékként használható. Az eluens fő komponense egy kis viszkozitású, poláros szerves oldószer, melyhez sokféle módosító komponens adható a megfelelő oldódás és retenciós idő beállítására. Ezen kritériumoknak leginkább a metanol és az acetonitril felel meg, ezek a legelterjedtebb eluensek a karotinoidanalízis területén. A metanol, vagy metanol alapú oldószerekkel nagyobb visszanyerés érhető el a karotinoidoknál C₁₈-as állófázison, mint acetonitril esetében.³¹ Hozzáadott módosítószerként korábban klórtartalmú oldószereket alkalmaztak (kloroform, diklórmétán) jó oldószer tulajdonságuk és a szelektivitásra gyakorolt kedvező hatásuk miatt. A modern HPLC-s gyakorlat már nem használja őket illékonyosságuk és a bomlás során keletkező sósavtartalmuk miatt, mely a karotinoidok izomerozációját és degradációját okozhatja. Az elúció lehet izokratikus vagy

gradiens elúciós módszer. Gradiens alkalmazásakor az elválasztás során változó összetételű eluenssel eluáljuk a minta komponenseit az állófázisról. A gradiens elúció előnye, hogy jóval nagyobb polaritási tartomány fedhető le vele és a szelektivitást is növeli. Hátránya viszont, hogy növeli a módszer komplexitását, így csökkenti a reprodukálhatóságot, valamint minden analízis után az oszlop mosását és újraekvilibrálnását igényli. Ha egy növényi minta extraktumát kell megvizsgálni, érdemes gradiens elúciót alkalmazni, hiszen ezzel a teljes karotin polaritási profil lefedhető. Gradiens elúció alkalmazásakor a víz, mint adalék oldószer gyakran előfordul a kezdő eluensben, pontosan a polaritás növelése miatt. C₃₀-as oszlopon, melynek elválasztási hatékonysága a legtöbb karotinoidra nagyságrendekkel jobb, mint a C₁₈-é, a víz teljes elhagyásával például a poláros β -kriptoxantin (**10**) és echinenon (**59**) nem válnak el, míg vizes eluenssel kezdve a gradienst, az elválasztás megoldható.³³

A hőmérsékletnek az elválasztás hatékonyságára gyakorolt hatásáról sem szabad megfeldkeznünk. Wheeler és munkatársai összefoglaló cikkében³⁶ írtak a szilika alapú fordított fázisú állófázisok „fázisátalakulásáról”, mely a hőmérséklet változásának hatására következik be. A hosszú szénláncú (> C₁₆) ligandumok olvadásszerű fázisátalakuláson esnek át, ez a folyamat monomer C₁₈-as állófázisoknál szobahőmérséklet körül (25 °C), polimer fázisoknál kicsit magasabb hőmérsékleten következik be. Alacsonyabb hőmérsékleten a szénláncok „megfagynak”, rögzülnek egy rendezetlen konformációban a szilikagél felületén, míg a hőmérséklet emelésével a láncok nagy amplitudóval mozogni kezdenek és folyadékszerű állapotba kerülnek. Hosszúkás molekulákra (PAH, karotinoidok) szobahőmérsékleten, vagy alacsonyabb hőmérsékleten kapjuk a legjobb szelektivitást polimer módosítású állófázison. Az analit molekulák ekkor be tudnak hatolni a rögzült láncok közé, így javítva a szelektivitást. Ezt a folyamatot más kutatók is leírták, Pursch és kutatócsoportja³⁷ C₃₀-as állófázisok A vitamin-acetáttal való vizsgálatakor hasonló eredményre jutottak. A hőmérséklet növelésével itt is növekszik a *gauche* konformáció mértéke az alkilláncok növekvő mobilitása miatt (**11. ábra**). A retenciós idő ugyan fordítottan arányos a hőmérséklettel, tehát az analízis idő rövidíthető a hőmérséklet emelésével, viszont számolnunk kell a szelektivitás romlásával.²⁶ Természetesen az alkalmazott oldószer is hat az alkilláncok konformációjára, növekvő vímentenységgel csökkenthető a szénláncok mobilitása, de a retenciós idő meghosszabbodik.³⁸



11. ábra. Modell az alakfelismerésre C₃₀-as állófázison magasabb hőmérsékleten (bal) és szobahőmérséklet alatt (jobb).³⁷

A HPLC technika fejlődésének egyik célja az analízis idő és a felhasznált oldószermennyiség csökkentése, az erre alkalmas rendszerek az ultra (nagy) hatékonyságú folyadékkromatográfiás berendezések (UPLC-ultra performance liquid chromatography, UHPLC-ultra high performance liquid chromatography), melyeket flash vagy gyors kromatográfiának is neveznek. Az itt alkalmazott oszlopok kisebb átmérőjűek (narrow bore, ~2,1 mm), a töltetek kisebb pórusméretűek (< 2 μ m), ebből fakadóan az oszlop háttérnyomása magasabb. Míg a normál HPLC berendezések általában 400 barig üzemeltethetők, az UHPLC-k átlagosan 1000-1200 barig. A nagyobb nyomás az elválasztásban is nagyobb hatékonyságot jelent. Ezen technikákhoz megjelentek a nagy mechanikai stabilitású szilikagél alapú állófázisok (HSS-high strength silica) és egyéb technológiai újítások. Ezek az oszlopok igen drágák és jóval kisebb az élettartamuk, mint a hagyományos állófázisoknak, növényi minták analízisének alapos mintaelőkészítést igényelnek. Az utóbbi időben számos közlemény jelent meg a karotinoidok UHPLC-vel vagy UPLC-vel történő vizsgálatáról is.³⁹⁻⁴³ Kiszámú és szerkezetileg eltérő molekulák esetén az elválasztás optimalizálható UPLC-s körülményekre és oszlopokra is³⁹, azonban ezek az oszlopok még nem igazán alkalmasak komplex növényi minták analízisére, ahol sok hasonló szerkezetű molekula (pl. izomerek) elválasztása a cél.⁴³

A HPLC technikákban használatos detektálási módszerek rendkívül sokfélék, itt csak a karotinoid analízisben használatos detektálási módokra térek ki.

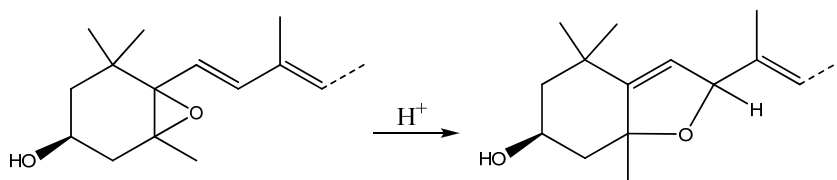
A leginkább elterjedt módszer az *UV/Vis* detektor használata. Ezek egyszerűbb változatai a változtatható hullámhosszú detektorok, ahol egyszerre egy hullámhosszon lehetett a fényelnyelést mérni. Az egyszerű spektrofotométereket és detektorokat felváltották az úgynevezett diódasoros (DAD, diode array detector) berendezések, melyek a teljes spektrum

felvételére képesek, az értékekből a retenciós idő függvényében három dimenziós kromatogramot rajzolnak. A karotinoidok speciális spektrofotometriai tulajdonságai miatt (elnyelés a látható tartományban és a spektrum alakja - több abszorpciós maximum a spektrumban) érthető, miért az *UV/Vis* detektorok váltak a leginkább kézenfekvő detektálási eszközzé.

A kapcsolt technikák folyadékkromatográfiás szempontból legjelentősebb képviselője a HPLC-MS, azaz a detektálás tömegspektrométerrel történik. Ma már a legtöbb karotinoid móltömeg- és fragmentációs adatai elérhetőek, az irodalomban nagy mennyiségű referencia áll rendelkezésre. A HPLC-DAD-MS(/MS) módszerrel egyszerre meghatározható a karotinoidra jellemző *UV/Vis* spektrum, a molekulatömeg, és esetleg a vegyületre jellemző fragmentáció is, így sokszor egy komplex növényi rendszer komponensei egy kromatogramból is azonosíthatók.

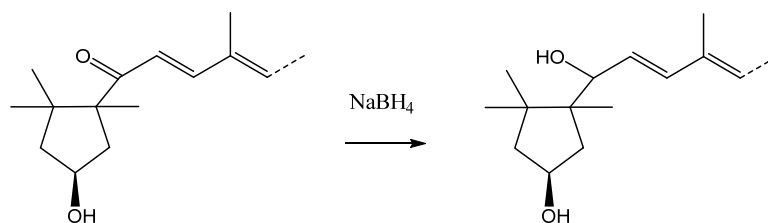
Az 1980-as évek elejétől a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia gyors ütemű fejlődésével e módszer is egyre nagyobb szerepet kapott a karotinoidkutatásban intézetünkben is.

Baranyai és munkatársai a pirospaprika karotinoidjainak analízisét dolgozták ki HPLC módszerrel.⁴⁴ 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 (**75**) az apoláros szénhidrogén β -karotinig (**1**). Az egyes csúcsok azonosítását különböző hullámhosszokon detektált mérésekkel, standard anyagokkal és specifikus származékképzési reakciókkal („savazás”, redukció) végezték el.⁴⁵ 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, spektrumuk alacsonyabb hullámhossz irányába tolódik el (**12. ábra**). Egy kettős kötés kiesése a konjugált rendszerből kb. 20 nm eltolódást jelent.



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

Hasonlóan, a konjugált ketocsoport redukciója is (**13. ábra**) az *UV/Vis* spektrum 20 nm-es hipszokróm eltolódását idézi elő, miközben polárosabb hidroxitermékek keletkeznek.



13. 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.⁴⁶ Így piros paprikából először sikerült kristályosan izolálni a kapszantin-5,6-epoxidot (**73**), az egyik kapszokróm epimert és a karpoxantint (**19**). A további két festék az addig csak kevésbé ismert szerkezetű biciklo-3,6-epoxi-5-hidroxi végcsoporttal rendelkező karotinoidnak bizonyult: kukurbitaxantin A (**46**) és kapszantin-3,6-epoxid (**103**).

Ezek az eredmények felbuzdulva kezdtek el Deli és munkatársai az 1980-as évek második felétől a paprika karotinoidok analízisével, egyes komponensek izolálásával és a bioszintetikus utak kutatásával foglalkozni. Az általuk 1991-ben publikált HPLC eljárás⁴ alkalmas növényi minták teljes karotin profiljának bemutatására. A LaborMIM által készített Chromsil C₁₈ 6 μ m-es pórusméretű állófázist alkalmaztak. Eluensként 12 v/v% víz-metanol (A), 50 v/v% aceton-metanol (B) és metanol (C) oldószerek keverékét használták gradiens elúcióban.⁵ A fent említett Chromsil szilikagél oszlopok egyike nem utánszilanizált (not endcapped) szilikagél töltetet tartalmazott. Összehasonlítva az analíziseket az utánszilanizált (endcapped) szilikagél alapú tölteteken mért mintákkal kiderült, hogy némely komponensek elválasztására alkalmasabb a nem utánszilanizált töltet (pl. lutein (**14**) és zeaxantin (**16**) elválasztása megvalósítható nem utánszilanizált C₁₈-as állófázissal míg utánszilanizálttal már nem).⁵ Hasonló eredményre jutott Sander és csoportja is,³³ miszerint az állófázisok szelektivitását a szilanol csoportok aktivitása csak abban az esetben befolyásolja, ha az analit poláros. PAH vagy apoláros karotinok (α - (**2**), β -karotin (**1**) vagy likopin (**7**)) esetében az utánszilanizálás nem változtat lényegileg a szelektivitáson. Lutein (**14**) és zeaxantin (**16**) mérésekor azonban a szabad szilanol csoportokkal kialakított kölcsönhatások nagymértékben rontják a minta komponensek elválását.

A műszeres analitikai módszerek (HPLC) és detektálási módjainak fejlődése lehetővé tette a korábban nem kimutatható, kis mennyiségben jelenlévő komponensek azonosítását, elválasztását is. A modern szerkezetvizsgáló módszerek elterjedésével pedig e kis mennyiségben jelenlévő komponensek pontos szerkezetének meghatározása is elvégezhető. Ennek eredményeként sikerült az ezt követő mintegy húsz évben közel 20 új, kismennyiségben előforduló karotinoidot izolálni piros paprikából, és szerkezetüket meghatározni.⁴⁷

IV. Célkitűzések

- A karotinoidok HPLC analitikájában használatos C₁₈-as és C₃₀-as állófázisokon végzett elválasztások összehasonlítása, részletesen kitérve a különböző fázisok hatékonyságára az eltérő szerkezetek esetén (úgy mint szénhidrogének, poláros csoportot tartalmazók, κ végcsoportot tartalmazók, ϵ és β végcsoportot tartalmazók, sztereoizomerek, epoxi-karotinoidok, geometriai izomerek analízise).
- A természetben előforduló karotinoidok minőségi analízisére leginkább alkalmas eljárás megtalálása, a növényi extraktumokban megtalálható nagyszámú és igen eltérő szerkezetű karotinoid molekulák esetén nemcsak a fő komponensek, de a minor vegyületek azonosítása is.
- Karotinoid 5,6-epoxidok konfigurációs izomerjeinek elválasztása, illetve a pontos konfiguráció meghatározása királis állófázist alkalmazva. A hidroxil csoport nélküli epoxid végcsoportot tartalmazó vegyületek sztereoizomerjeinek elválasztása.

V. Kísérleti rész

Reagensek és standardok

A folyadékkromatográfiás oldószereként (metanol, víz, aceton, *tert*-butil-metil-éter) a Scharlab Kft.-től vásárolt HPLC minőségű vegyszereket használtunk. A karotinoid minták egy része izolált vagy félszintetikus forrásból állt rendelkezésre. Az un. ritka karotinoidok izolálását kutatócsoportunk végezte korábban, szerkezetazonosításuk minden esetben MS, NMR és CD spektrumuk alapján történt (referenciákat lásd a **Függelék** 9.1. Táblázatában). Az izolálást és szintetikus módosításokat kutatócsoportunk végezte standard módszerek szerint.^{5, 9, 10} Néhány speciális anyagot támogatóunktól, a CaroteNature Gmbh-tól kaptunk.

Félszintetikus karotinoidok előállítása

A félszintetikus karotinoid 5,6-epoxidokat a megfelelő vegyület 5,6-os helyzetű kettős kötésének perftálsavval való epoxidálásával állítottuk elő.⁴⁸ Karotinoid 5,8-epoxidokat a megfelelő 5,6-epoxidok sósavas kezelésével állítottuk elő.⁴⁹ Az oxokarotinoidok nátrium-bórhidrides redukciójával készültek a hidroxiszármazékok.⁴⁹ A karotinoidok (*Z*)-izomerjeit jódkatalizált fotoizomerizációval állítottuk elő az össz-*transz* vegyületekből.⁵⁰ A származékképzéssel előállított karotinoidokat ha szükséges volt, klasszikus oszlopkromatográfiás módszerrel CaCO₃ oszlopon kromatografáltuk.

Mamey extrakció

A panamai piacról (Panama City, Panama) származó piros mamey gyümölcs húsát (500 g) porcelán mozsárban 50 g NaHCO₃-tal homogenizáltuk, majd acetonnal extraháltuk többször, míg az extraháló oldószer szintelen maradt. Az extraktumot Et₂O/n-hexán (1:1) elegyével hígítottuk és vizes mosással távolítottuk el az acetont, majd szárítás (Na₂SO₄) után bepárlás következett. A szilárd maradékot Et₂O-ban oldottuk és metanolos KOH-dal szappanosítottuk. Szappanosítás után az éteres oldatot vízzel mostuk lúgmentesre, szárítottuk, majd bepároltuk. A mintát felhasználásig benzolos oldatban -20°C-on tároltuk.

Készülékek:

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

A ¹H NMR (400 MHz) és ¹³C NMR (100 MHz) spektrumok Varian UNITY INOVA 400-WB spektrométerrel és Bruker DRX Avance II (500/125 MHz for ¹H/¹³C) spektrométerrel

készültek. A kémiai eltolódásokat belső TMS referenciához (^1H) vagy a maradékoldószer-jelhez (^{13}C) viszonyítottuk

Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (C_{18} , C_{30})

A HPLC analízisek Dionex P680 típusú kvaterner analitikai pumpa, Dionex PDA 100 UV/Vis detektor (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA), Dionex oszloptermosztát és Chromeleon 6.8 szoftver használatával készültek. A pontos HPLC rendszer leírása az alábbi **2. táblázatban** található.

2. táblázat: HPLC körülmények.

I. Módszer	250 x 4.6 mm	áramlás: 1.25 ml/perc	0-2 perc: 100 % A,
	oszlop,	eluensek:	2-10 perc: to 80% A/20%B,
	LiChrospher	A: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 12/88$ v/v%	10-18 perc to 50 % A/50% B,
	100 RP 18e	B: MeOH	18-25 perc to 100 % B,
	(Merck KGaA)	C: $\text{Aceton}/\text{MeOH} = 50/50$ v/v%	25-27 perc 100 % B,
II. Módszer	5 μm endcapped	22 °C	27-33 min to 100 % C,
		$\lambda=450$ nm	33-38 min 100 % C,
			38-40 min to 100 % B (lineáris lépésekben)
	250 x 4.6 mm	áramlás: 1.00 ml/perc	0-90 perc: 100% A/0% B-ről 100%
	oszlop,	eluensek:	B-re (lineáris lépésekben)
	YMC C_{30} (YMC	A: $\text{MeOH}/\text{TBME}/\text{H}_2\text{O} = 81/15/4$	
	Europe GmbH)	v/v%	
	3 μm endcapped	B: $\text{MeOH}/\text{TBME}/\text{H}_2\text{O} = 6/90/4$	
		v/v%	
		22 °C	
		$\lambda=450$ nm	

HPLC-MS analízis:

A HPLC-MS mérések egy Dionex P580 NDG pumpán, egy 250×4.6 mm belső átmérőjű YMC C_{30} , 3 μm szemcseméretű oszlopon történtek. A spektrumokat egy Finnigan AQA single quadrupole tömegspektrométer segítségével rögzítettük. A mérések APCI ionforrással, pozitív

módban történtek, splitting alkalmazása nélkül. A következő beállításokat alkalmaztuk: korona feszültség 4 kV, hőmérséklet 400 °C, full scan mód, adatgyűjtés 0.2 scans/s.

Királis HPLC-DAD analízis:

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

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

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

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

HPLC-CD analízis:

Az analízist Jasco HPLC rendszeren végezték, a HPLC-UV és -OR kromatogramokat Jasco MID-910 UV és OR-2090Plus királis detektorral határozták meg. A HPLC-ECD görbéke felvétele specifikus hullámhosszon Jasco J-810 CD spektropolariméterrel történt. Az alkalmazott oszlop típust és eluens rendszert a megfelelő ábránál tüntettem fel.

VI. Eredmények

6.1. C₁₈ és C₃₀-as állófázisok összehasonlítása⁵¹

Vizsgálatainkhoz a C₁₈-as állófázis esetén az intézetünkben korábban kidolgozott, és a paprika karotinoidok vizsgálatánál jól bevált rendszert alkalmaztuk (**Kísérleti rész 2. táblázat I. Módszer**).⁵ A karotinoidok elúciós sorrendje C₁₈ oszlopon követi a Krinsky által meghatározott polaritási sorrendet⁵²: a karotinok, keto- és epoxikarotinoidok jóval erősebben adszorbeálódnak, mint a hidroxivegyületek (**Függelék 9.1. Táblázat**).

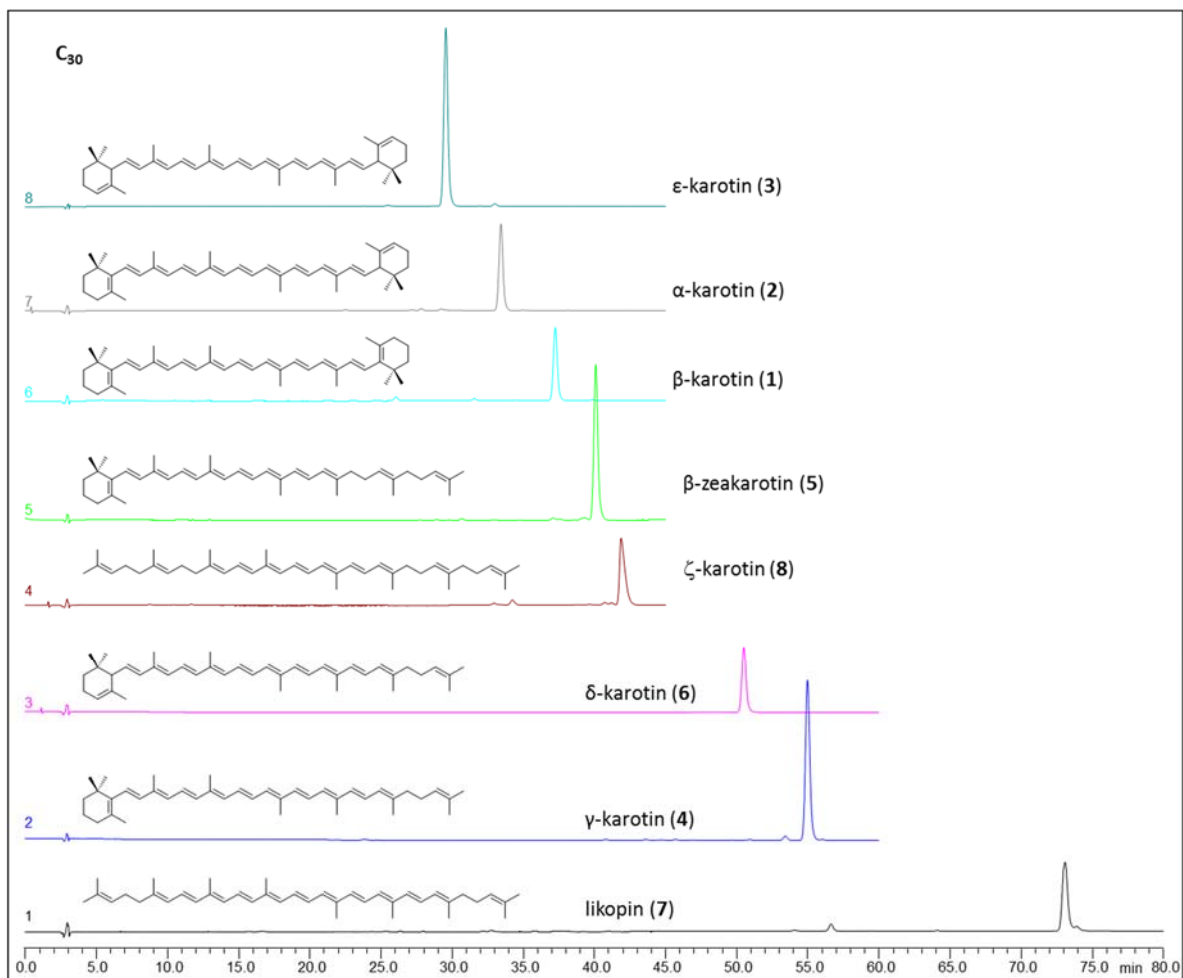
A C₃₀-as állófázisra alkalmazott módszer az irodalomban fellelhető módszerek továbbfejlesztett változata (**Kísérleti rész 2. táblázat II. Módszer**).^{53, 54} Az eluens polaritása itt is mérséklődik a gradiens program során, de az analit molekulák elúciós sorrendje ezen az állófázison nem minden esetben követi a polaritási sorrendet.

Apró különbségek a molekulaszervezetben szignifikáns különbségeket eredményeznek a retencióban mindkét állófázist tekintve. Ezeket az általános jelenségeket az alábbiakban néhány reprezentatív karotinoid példáján mutatom be.

6.1.1. Szénhidrogének elválasztása

Karotin szénhidrogének C₁₈ állófázison alig, C₃₀-on viszont kiválóan elválaszthatók. C₁₈-on az összes karotin kb. 2 perc retenciós idő különbséggel eluálódik: a nyílt láncú származékok a legkisebb retenciós idővel jelennek meg, ezeket követik az ε-, majd végül a β végcsoportot tartalmazó karotinok. Míg a szénhidrogének alapvonal elválasztása C₁₈-on nem megoldható, a retenciós idő különbségek C₃₀-on perces nagyságrendűek (**14. ábra**).

Az apoláros molekulák esetén a harminc szénatomos alkillánccal módosított szilika alapú fázis és a karotinok közötti intenzív kölcsönhatás^{33, 55} igazoltnak látszik. Nagyon kis eltérés a ciklohexén gyűrű szerkezetében, mint például a kettős kötés helyzete, komoly változást okoz a retencióban: az ε végcsoportot tartalmazó karotinoidok hamarabb eluálódnak, mint a β végcsoportúak: ε-karotin (**3**) < α-karotin (**2**) < β-karotin (**1**) vagy δ-karotin (**6**) < γ-karotin (**4**) (**14. ábra**). A nyílt láncú végcsoport (ψ) jelenléte jelentősen megnöveli a retenciós időt (δ-karotin (**6**) < γ-karotin (**4**) < likopin (**7**)). Ennek magyarázata, hogy a nyílt láncú molekulák, nyújtott konformációban nagyobb felületen képesek az állófázissal kölcsönhatásba lépni.

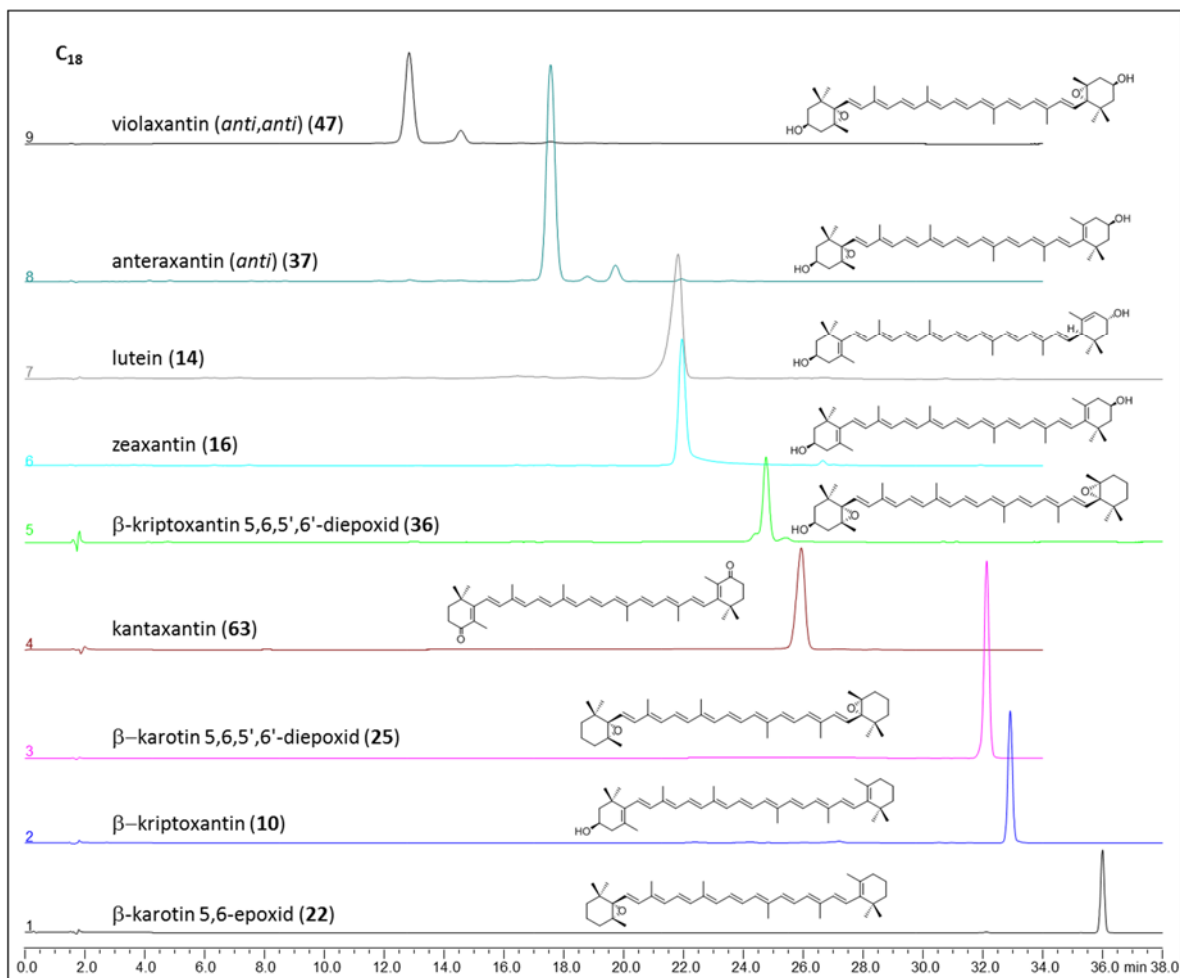


14. ábra: Karotinok retenciós ideje C_{30} -as állófázison.

A konjugált poliénlánc hossza szintén korrelál a retenciós paraméterekkel: több konjugált kettős kötés nagyobb retenciót eredményez C_{30} -as oszlopon (lásd. β -zeakarotin (5) < γ -karotin (4) < torulin (9), vagy ζ -karotin (8) < likopin (7)). A konjugált π kötések nagy elektronsűrűséget eredményeznek, mely erősebb másodlagos kölcsönhatásokat eredményez az állófázis szénláncáival.⁵⁶

6.1.2. Poláros karotinoidok elválasztása

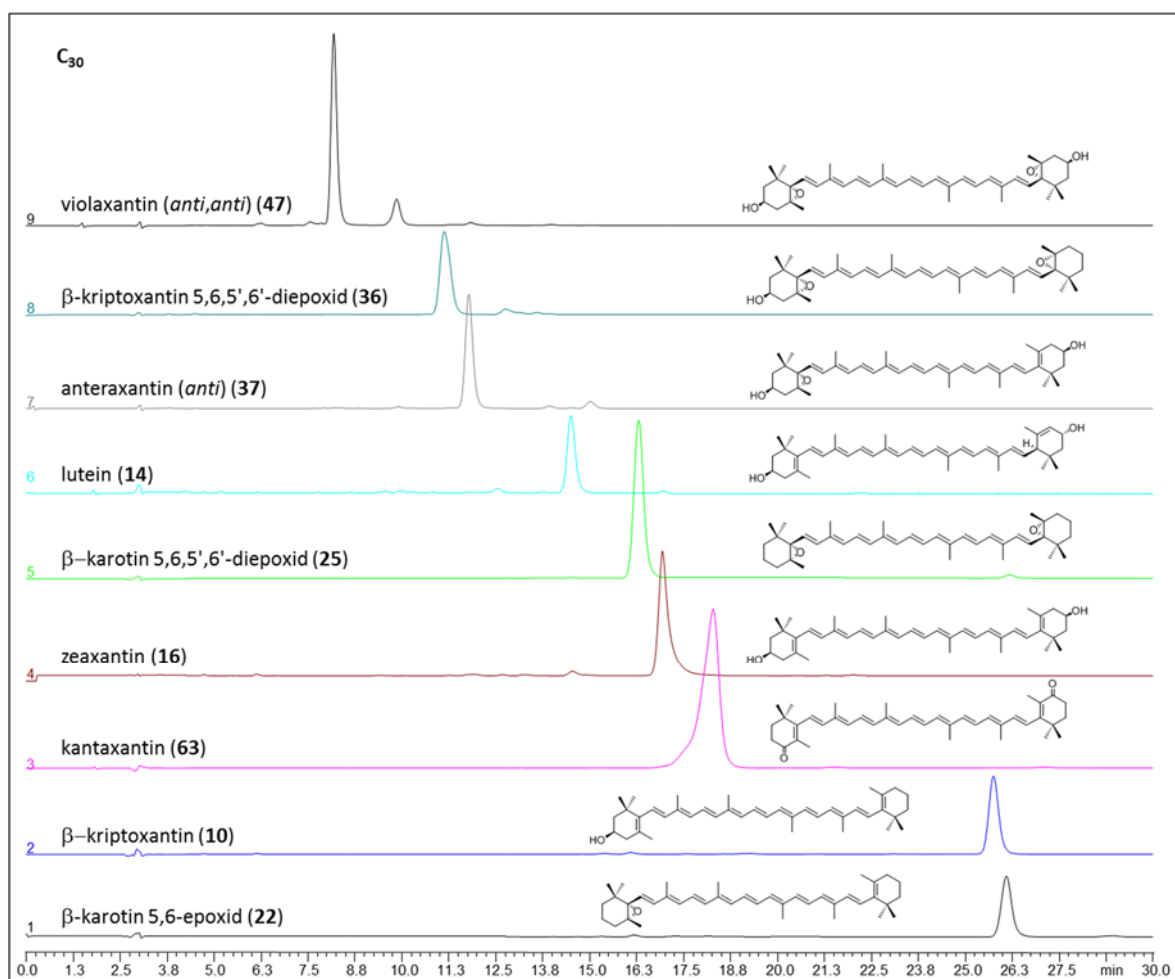
Az epoxi, hidroxil és oxo funkciós csoportokat tartalmazó poláros karotinoidok a C_{18} -as oszlopot relatív polaritásuk sorrendjében hagyják el (15. ábra). Ezen relatív polaritási sorrendet metanol-petroléter rendszerben való megoszlás alapján határozták meg.⁵² A retenciós időbeli különbség az oxo- és hidroxikarotinoidoknál C_{18} -on kicsi, míg az eltérések C_{30} -on szignifikánsak (16. ábra).



15. ábra: Néhány poláros karotinoid retenciós ideje C₁₈-as állófázison.

Azon molekuláknál, melyek kizárólag hidroxilcsoportot tartalmaznak, a retenciós idő a hidroxilcsoportok számának növekedésével csökken mindkét állófázison. Az epoxicsoporttal rendelkező karotinoidoknál viszont C₃₀-on az elúciós sorrend nem követi a polaritást.

Ez a jelenség megfigyelhető a C₃₀-as oszlopon mért retenciós időknél, ahol az elúciós sorrend epoxi- és hidroxikarotinoidoknál a következő: violaxantin (47) < β-kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (36) < anteraxantin (37) < lutein (14) < β-karotin-5,6,5',6'-diepoxid (25) < zeaxantin (16) < β-kriptoxantin (10) < β-karotin-5,6-epoxid (22) (16. ábra).



16. ábra: Néhány poláros karotinoid retenciós ideje C₃₀-as állófázison.

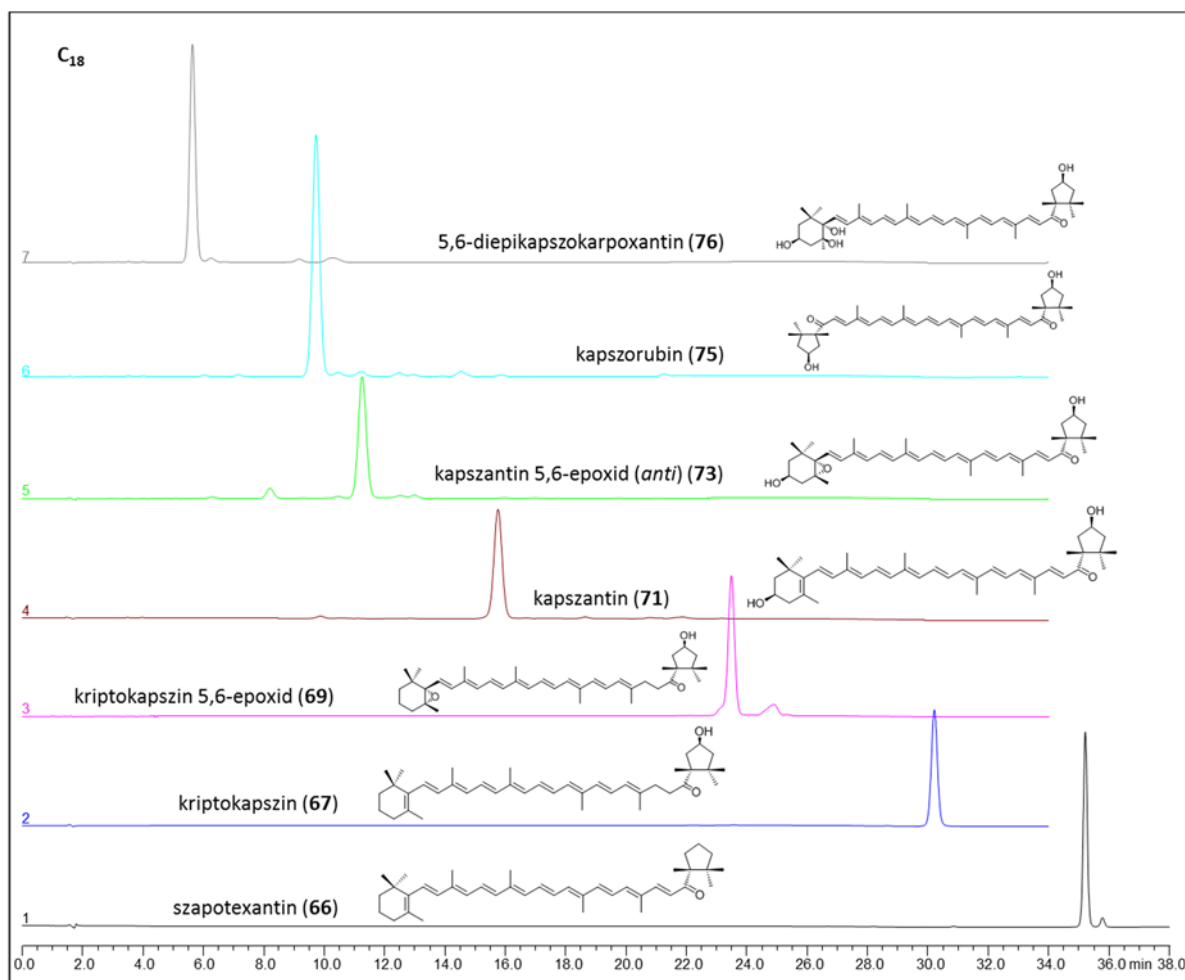
Az epoxidok, és különösen a diepoxidok, úgymint a β -karotin-5,6,5',6'-diepoxid (**25**) és a β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**36**), vagy a violaxantin (**47**), C₃₀-as fázison kevesebb idő töltenek az oszlopon, mint az a polaritásuk alapján várható lenne. Feltehetően a poláros és nagy térkitöltésű epoxidgyűrű korlátozza a molekula diffúzióját az állófázis apoláros 30 szénatomos láncai között, azaz ezek a molekulák részlegesen kiszorulnak az állófázisról. A kisebb felületen létrejövő másodlagos kölcsönhatások miatt pedig hamarabb eluálódnak, mint az egy epoxidcsoportot tartalmazó, vagy nem epoxid molekulák.

Az oxokarotinoidok később eluálódnak mindkét fázison, mint a hidroxivegyületek. A retenciós sorrend alapján, például asztaxantin (**65**) < 4,4'-dihidroxi- β -karotin (**17**) < kantaxantin (**63**) < 4'-hidroxi-echinenon (**61**) < 4-hidroxi- β -karotin (**12**) < echinenon (**59**), megállapítható, hogy a hidrogénkötés akceptor oxocsoportot tartalmazó karotinoidok több időt töltenek az állófázison, mint a hidrogén kötésben akceptorként és donorként is részt vevő hidroxilcsoportot tartalmazók.

6.1.3. κ -karotinoidok elválasztása

A fent említett tendenciák a κ -karotinoidokon jól tanulmányozhatók. A κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok öttagú gyűrűt tartalmaznak, melyen hidroxil- vagy oxocsoport lehet. Ezen poláros vegyületek tipikus piros paprika pigmentek és megtalálhatók néhány közép amerikai gyümölcsben is.⁵⁷⁻⁵⁹

C₁₈-as fázison, a poláros (oxo- és hidroxil-) csoportok számának növekedése a retenciós idő csökkenését eredményezi κ -karotinoidok esetében is (**17. ábra**). A lemosódás sorrendje a következő: 5,6-diepikapszokarboxantin (**76**) < kapszorubin (**75**) < kapszantin-5,6-epoxid (**73**) < kapszantin (**71**) < kriptokapszin-5,6-epoxid (**69**) < kriptokapszin (**67**) < szapotexantin (**66**).

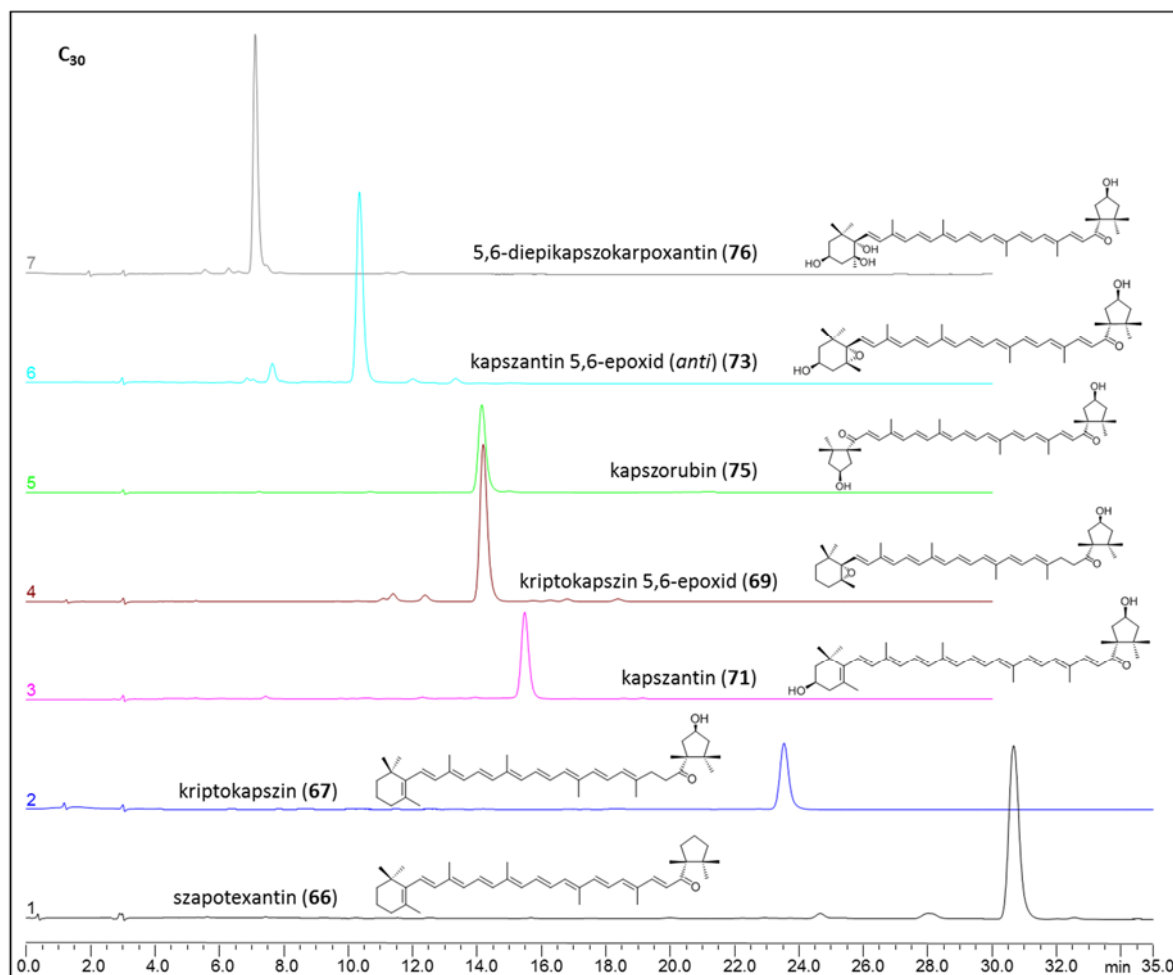


17. ábra: Néhány kappá végcsoportot tartalmazó karotinoid retenciós ideje C₁₈-as állófázison.

C₃₀-on az epoxi- κ karotinoidok megint csak rövidebb időt töltenek az állófázison, mint az polaritásuk alapján várható (**18. ábra**). A kriptokapszin-5,6-epoxid (**69**) és a kapszorubin

(75) retenciós ideje megegyezik, illetve a kapszantin (71) később eluálódik, mint a kriptokapszin-5,6-epoxid (69).

Mindkét állófázis meglehetősen jó elválasztást ad a κ -karotinoidokra, azonban a C_{18} alkalmasabbnak tűnik olyan komplex természetes extraktumok esetén, ahol kapszorubin (75) és kriptokapszin-5,6-epoxid (69) is megtalálható egymás mellett.



18. ábra: Néhány kappa végcsoportot tartalmazó karotinoid retenciós ideje C_{30} -as állófázison.

6.1.4. ϵ és β végcsoportot tartalmazó karotinoidok elválasztása

A következő említésre méltó különbség a C_{18} és C_{30} oszlopok között az ϵ és β végcsoportot tartalmazó molekulák elválasztásában van, melyek a gyűrűs végcsoportban szereplő kettős kötés helyzetében térnek el egymástól. Az α - és β -karotin (2, 1) vagy az α - és β -kriptoxantin (11, 10) nem választhatók el alapvonalig C_{18} -as oszlopon, de C_{30} -on kiválóan elválnak. A sárgafolt pigmentek, a lutein (14) és a zeaxantin (16) teljesen együtt eluálódnak a

tizennyolc szénatomos állófázison (**15. ábra**), de C₃₀-on elválnak, és a lutein (**14**) a zeaxantin (**16**) előtt eluálódik (**16. ábra**). Hasonlóan, az anteraxantin (**37**) és a lutein 5,6-epoxid (**43**) szintén egy kettős kötés helyzetében különböznek, csak C₃₀-on választhatók el, itt a lutein-5,6-epoxid (**43**) 2 perccel előbb lemosódik, mint az anteraxantin (**37**). Ahogy azt már korábban említettük, karotinok ϵ végcsoporttal kisebb retenciós időt adnak, mint a β végcsoportúak C₃₀-on, pl.: ϵ -karotin (**3**) < α -karotin (**2**) < β -karotin (**1**) vagy δ -karotin (**6**) < γ -karotin (**4**) (**14. ábra**).

Oxokarotinoidok esetében hasonló tendencia figyelhető meg (pl. ϵ,ϵ -karotin-3,3'-dion (**64**) < kantaxantin (**63**)).

Mind apoláros, mind poláros karotinoidoknál látható, hogy a konjugált poliénlánc hossza befolyással bír a retenciós tulajdonságokra C₃₀-as oszlopon: több konjugált π -elektron hosszabb retenciós időt eredményez.

6.1.5. Sztereoizomerek elválasztása

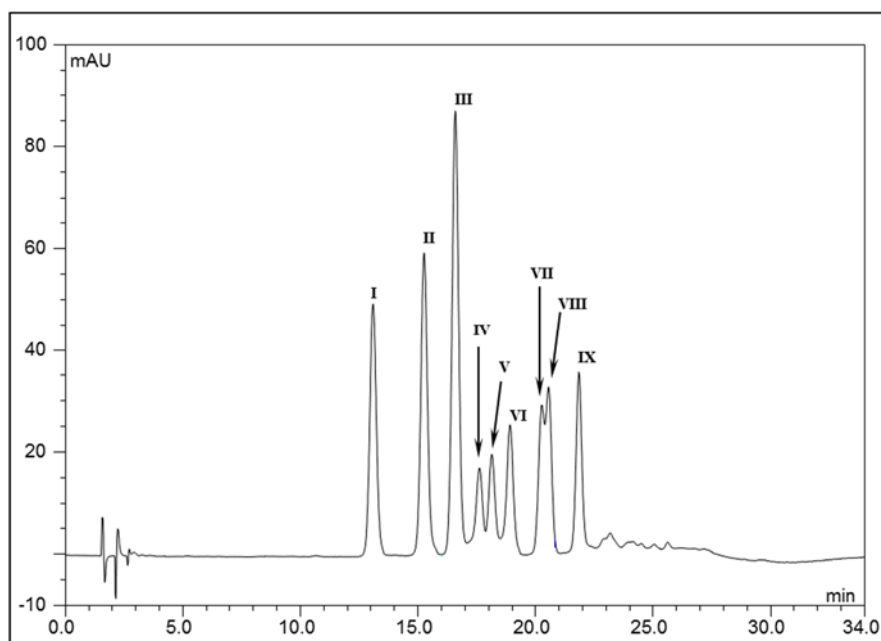
Annak ellenére, hogy sem a C₁₈, sem a C₃₀-as állófázisok nem királisak, számos sztereoizomer elválasztása lehetséges használatukkal. A ciklohexángyűrűkön lévő hidroxilcsoportok térállása jelentősen befolyásolja a C₁₈-as oszlopon való retenciót, míg C₃₀-on nincs ilyen hatása.

Szinte az összes növény tartalmaz luteint (**14**), mely vezető szerepet játszik az időskori makuladegeneráció megelőzésében.⁶⁰ Nyers növényi alapanyagok feldolgozása során a luteinben (**14**) a 3' helyzetű hidroxilcsoport epimerizálódhat és 3'-epilutein (**15**) képződhet. Ezek a diasztereomerek mind C₁₈, mind C₃₀-as oszlopokon jól elválaszthatók, habár elúciós sorrendjük fordított a kétféle állófázison, C₁₈-on a lutein (**14**) C₃₀-on a 3'-epilutein (**15**) eluálódik előbb. Követve az átalakulást meghatározható, hogy a lutein milyen hányada vész kárba a feldolgozás során.

A 3,5,6-trihidroxi- β végcsoport elméletileg négyféle sztereoizomerrel rendelkezik, ezekből három fordul elő a természetben is. A végcsoport abszolút konfigurációja információt ad a képződés módjáról: például a csipkebogyóból 3*S*,5*R*,6*S* és 3*S*,5*R*,6*R* konfigurációjú karpoxantinokat kapunk savkatalizált gyűrűfelnyílással anteraxantinból (**37**)⁶¹, míg piros paprikából vagy *Lilium tigrinum* szirmából 3*S*,5*R*,6*S* és 3*S*,5*S*,6*S* karpoxantinok keletkeznek az epoxidgyűrű enzimatis felnyílásával.^{62, 63} Ezen izomerek elválasztása lényeges bioszintézisük megismerése szempontjából. A karpoxantin három természetes izomere (karpoxantin (**19**), 6-epikarpoxantin (**20**) és 5,6-diepikarpoxantin (**21**)) nem válik el C₃₀-as fázison, de C₁₈-on igen.

A 4-hidroxi-karotinoid sztereoizomerek (pl. 4-hidroxi- β -karotin (**12**), 4,4'-dihidroxi- β -karotin (**17**)), melyek a hat szénatomos végcsoport oxocsoportjának (echinenon (**59**), kantaxantin (**63**)) redukciójával képződnek, nem választhatók el sem C₁₈, sem C₃₀-as állófázison, csak királis oszlopon lehetséges az analízisük.

A 6-oxo- κ -karotinoidok redukált hidroxiszármazékai viszont másképp viselkednek. A kapszantin (**71**) redukciójának termékei a (6'*S*)- (**79**) és (6'*R*)-kapszantol (**78**) molekulák, csupán a hidroxilcsoport térállásában különböznek egymástól, mégis elválaszthatók mindkét állófázison. C₁₈-on 2 perces retenciós idő különbséggel eluálódnak, viszont C₃₀-on ez az idő csak 0,8 perc. Hasonló retenciós tulajdonságok figyelhetők meg más redukált κ -karotinoidoknál is (kapszorubol (**98-100**), kriptokapszol (**82-83**), szapotexantol (**80-81**), stb.). Az elválasztás hatékonysága bemutatható a két oxocsoportot tartalmazó, aszimmetrikus 3'-dezoxikapszorubin (**77**) redukciós termékein is. Tizennyolc szénatomos alkil-szilika állófázison mind a négy lehetséges 6,6'-dihidroxi sztereoizomer (**90-93**) és a részlegesen redukált 6-hidroxi (**94, 95**) és 6'-hidroxiszármazékok (**96, 97**) is elválnak egymástól és a kiindulási anyagtól (**77**) (**19. ábra**).

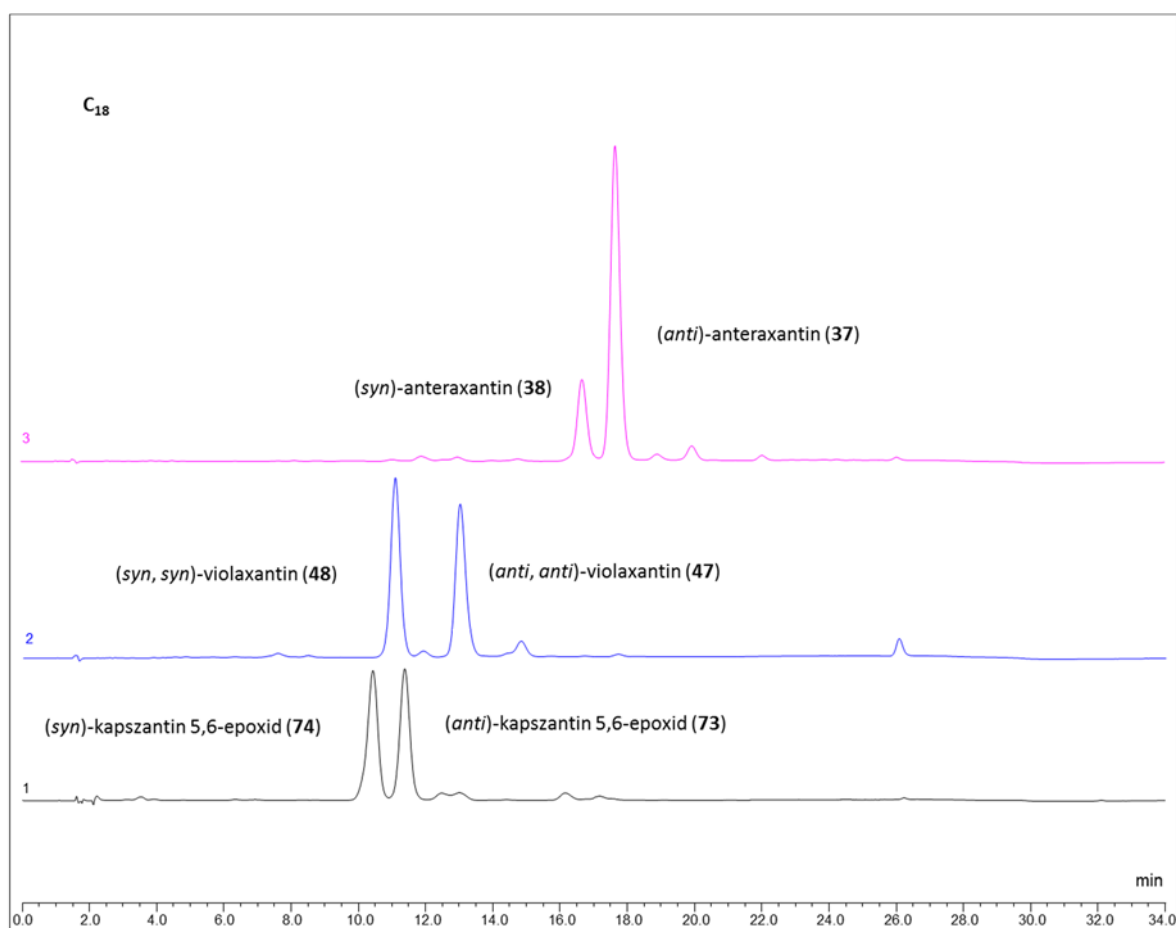


19. ábra: A 3'-dezoxikapszorubin (**77**) redukciós termékei C₁₈-as állófázison:

- I. (6*R*/*S*,6'*R*/*S*)-3'-Dezoxikapszorubol (**90**); II. (6*R*/*S*,6'*S*/*R*)-3'-Dezoxikapszorubol (**91**);
- III. (6*S*/*R*)-3'-Dezoxikapszorubol-6'-on (**95**); IV. (6*S*/*R*,6'*R*/*S*)-3'-Dezoxikapszorubol (**92**);
- V. (6*S*/*R*,6'*S*/*R*)-3'-Dezoxikapszorubol (**93**); VI. (6*R*/*S*)-3'-Dezoxikapszorubol-6'-on (**94**);
- VII. (6'*R*/*S*)-3'-Dezoxikapszorubol-6-on (**96**); VIII. (6'*S*/*R*)-3'-Dezoxikapszorubol-6-on (**97**);
- IX. 3'-dezoxikapszorubin (**77**) (Az abszolút konfigurációkat nem határoztuk meg.)

6.1.6. Epoxikarotinoidok elválasztása

A karotinoid 5,6-epoxidok közül a violaxantin (**47**) és a neoxantin (**56**), az abszcizinsav növényi hormon bioprekurzorai.^{64, 65} 5,8-Epoxidokkal (furanoidok) együtt fordulnak elő különféle növények szíromlevelében és pollenjében, illetve gyümölcsökben és zöld levelekben is.⁶⁶ Az anteraxantin (**37**) és a violaxantin (**47**) részt vesznek a xantofill ciklusban, melynek védő szerepe van a túlzott fénybesugárzás káros hatásaival szemben.⁶⁷ A természetben az epoxidgyűrű térállása *anti* a ciklohexil végcsoport hidroxilcsoportjának térállásához képest. Laboratóriumi körülmények között az epoxidálás perkarbonsavakkal *anti* és *szün* epoxidokat eredményez, melyek C₁₈-as állófázison elválaszthatók.⁶⁸ A *szün* izomerek retenciós ideje kisebb, mint az *anti* vegyületeké.



20. ábra: Karotinoid 5,6-epoxid sztereoiszomerek elválasztása C₁₈-as állófázison.

Az 5,6-epoxidok könnyedén átrendeződnek 5,8-epoxidokká (furanoid) *in vitro* savas kezelés hatására.⁴⁵

Az 5,8-epoxid és a „szülő” 5,6-epoxid izomerek mennyisége és aránya a növényekben rendkívül változékony⁶⁹, azonban az nem minden esetben bizonyított, hogy a furanoidok természetes pigmentek, vagy az 5,6-epoxidokból epoxid-furanoid átrendeződéssel az izolálás során képződött műtermékek. A furanoidképződés növényi savak által *in vivo* katalizált, vagy enzimatis folyamat.⁵ Például a spenót fő epoxid komponense a neoxantin (**56**) és a violaxantin (**47**), míg az oxálsavat nagy mennyiségben tartalmazó sóska főképp ezen anyagok furanoidjait tartalmazza. A növényi nyersanyagok feldolgozása során a furanoidok mennyisége nő, hiszen a sejtek károsodnak és savtartalmuk felszabadul.⁶⁸

A legalább két hidroxilcsoportot tartalmazó 5,8-epoxidok kiválóan elválhatnak az 5,6-epoxidoktól C₁₈-as szilikán. Viszont az egy hidroxilcsoportot, vagy hidroxilcsoportot nem tartalmazó epoxidok nem választhatók el C₁₈-as állófázison. A β -karotin 5,6-epoxid (**22**) és 5,8-epoxid (**24**) retenciós ideje lényegében megegyezik C₁₈-as állófázison, csakúgy mint a β -karotin-5,6,5',6'-diepoxid (**25**), az 5,6,5',8'-diepoxid (**26**) és a 5,8,5',8'-diepoxid (**27**). A C₃₀-as oszlop viszont jó elválást biztosít ezen kevésbé poláros regioizomerekre. A C₃₀-as állófázison a kettős kötések kiterjedt konjugációja általában nagyobb retenciót okoz. Ahogy azt korábban említettük, az 5,6-epoxidok esetében az epoxidgyűrű térigénye és poláros karaktere gátolhatja a molekula diffúzióját az apoláros harminc szénatomos láncok között, és kisebb retenciót eredményez, mint ami a polaritás alapján várható volna. Itt úgy tűnik, az epoxid csoport jelentősebb befolyással bír a retencióra, mint a konjugált poliénrendszer hossza: noha az 5,8-epoxidok kevesebb konjugált kettős kötést tartalmaznak, mint az 5,6-epoxidok, a furanoidok később eluálódnak mint regioizomereik.⁷⁰ Laboratóriumban a karotinoid 5,8-epoxidok (vagy furanoidok) 5,6-epoxidokból állíthatók elő savas kezeléssel. Az epoxid-furanoid átrendeződés során kétféle 5,8-epoxid sztereoizomer keletkezik, miközben az 5-ös szénatom konfigurációja változatlan marad. Így például a (3*S*,5*R*,6*S*)-(anti)-anteraxantin (**37**) két természetben is előforduló mutatoxantint, a (3*S*,5*R*,8*S*) (**39**) és a (3*S*,5*R*,8*R*) konfigurációjú (**40**) epimert képezi⁷¹, míg a mesterséges (3*S*,5*S*,6*R*)-(szün)-anteraxantin (**38**) két félszintetikus mutatoxantin epimert ad, (3*S*,5*S*,8*R*) (**41**) és (3*S*,5*S*,8*S*) konfigurációval (**42**).⁷² Ezeket a mutatoxantin izomereket kivéve⁷³, nem volt autentikus standardunk igazolt sztereokémiával a furanoid vegyületekből. A többi vizsgálathoz az epoxid-furanoid átrendeződés során az *anti*-epoxidokból keletkezett elegyeket használtuk. Ezekben az elegyekben a komponensek abszolút konfigurációját nem határoztuk meg.

Az 5,8-epoxid sztereoizomerek elválasztása csak C₁₈-on valósítható meg, abban az esetben, ha mindkét hattagú gyűrű rendelkezik hidroxilcsoporttal. A legalább két hidroxilcsoporttal rendelkező monofuranoidok (mutatoxantinok (**39**), (**40**), (**41**) és (**42**);

krizantémaxantin (**44**) és flavoxantin (**45**) luteoxantin I (**50**) és luteoxantin II (**51**)) csakúgy, mint a két hidroxidos difuranoid epimerek (auroxantin I (**52**), II (**53**), III (**54**)) alapvonal elválást mutatnak C₁₈-as állófázison. Ezek az izomerek viszont C₃₀-on nem választhatók el, például az auroxantinok (**52-54**) három helyett csak két csúcsot adnak.

Azon furanoid molekulák sztereoizomerjei, ahol egy hidroxilcsoport van a hatos gyűrűn (pl. β -kriptoxantin-5,8-epoxid (**34**)), vagy hidroxilcsoport nélküliek (mint a β -karotin-5,8-epoxid (**24**), illetve a kriptokapszin-5,8-epoxid (**70**)), nem választhatók el ezeken az oszlopokon. Ezen anyagok elválasztása csak királis állófázison valósítható meg.⁵⁸

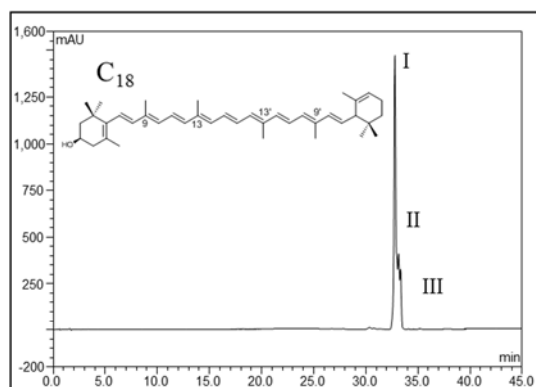
Meg kell említenünk az 5,6 és 3,6-epoxidok közötti különbségeket is. Az anteraxantin (**37**) és kukurbitaxantin A (**46**) esetében, vagy a violaxantin (**47**) és a cikloviolaxantin (**49**) esetében a különbség csupán az éter csoport pozíciójában van, az *UV/Vis* spektrumok, a molekulatömegek megegyeznek, és tömegspektrometriás fragmenseik is ugyanazok. A nagyon hasonló tulajdonságok ellenére az 5,6- és 3,6-epoxidok C₁₈-as oszlopon jó elválást mutatnak, C₃₀-on viszont nem válnak szét.⁷⁴ Ezen regioizomerek megkülönböztetése a savval való reakció alapján történhet: csak az 5,6-epoxidok reagálnak savval 5,8-epoxidot képezve, a 3,6-epoxidok nem.

6.1.7. Geometriai izomerek (Z/E) elválasztása

Az élelmiszer előkészítő technológiák, különösképpen a melegítési eljárások a karotinoidok kettős kötéseinek *cisz-transz* (Z/E) izomerizációjához vezethetnek.⁷³ Élelmiszer minták esetén a *cisz-transz* izomerek arányának követése a technológia során fontos lehet. Vizsgálatainkhoz a *transz* vegyületből jódkatalizált fotoizomerizációval készült (Z/E) izomer elegyeket használtunk.⁵⁰ A *cisz* izomereket karakterisztikus *UV/Vis* spektrumuk alapján azonosítottuk ($\lambda_{\max}$ és %A_{cisz csúcs}/A_{max}).¹ Aszimmetrikus karotinok esetén a 9Z és 9'Z, valamint a 13Z és 13'Z izomerek nem különböztethetők meg autentikus standardok nélkül.

Geometriai izomerek esetén a felbontás C₁₈-as oszlopon limitált, főként apoláros karotinoknál (**Függelék 9.2. Táblázat**). Kizárólag poláros izomerek választhatók el, az elúció a *transz* < 9Z < 13Z < 15Z sorrendet követi. Poláros karotinoidok esetében a *transz* izomer jól elválik a *cisz*ektől, azonban a *cisz* komponensek elválása egymástól rosszabb. A 9Z és 13Z komponensek elválaszthatók, de aszimmetrikus szerkezetek esetén a 9Z/9'Z és 13Z/13'Z párok egy csúcsot adnak (pl. α -kriptoxantin (**11**), **21. ábra**, vagy kapszantin (**71**) R_t össz-*transz*: 15,8; 9/9'Z: 21,5; 13/13'Z: 22,2 perc). A polaritás csökkenésével az E és Z izomer csúcsok valamint a 9Z és 13Z komponensek csúcsai is közelednek egymáshoz, nem poláros karotinok esetén ezen

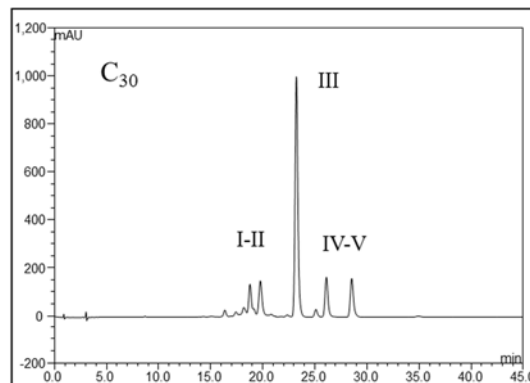
izomerek megkülönböztetése nehézkes (β -karotin (**1**) össz-*transz*: 39,3; 9Z: 39,8; 13Z: 39,8 perc) (**22. ábra**).



I. (all *E*)- α -kriptoxantin

II. (9Z/9'Z)- α -kriptoxantin és
(9'Z/9Z)- α -kriptoxantin

III. (13Z/13'Z)- α -kriptoxantin
és (13'Z/13Z)- α -kriptoxantin



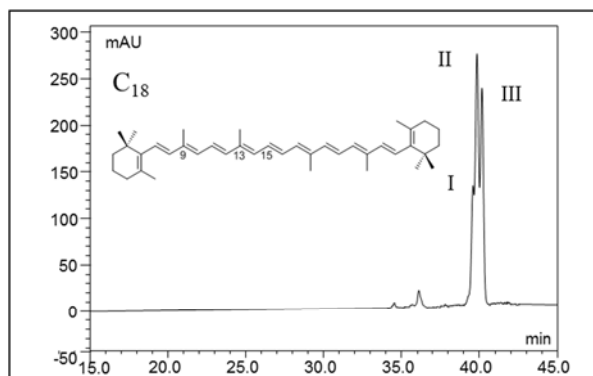
I-II. (13Z/13'Z)- α -kriptoxantin
és (13'Z/13Z)- α -kriptoxantin

III. (all *E*)- α -kriptoxantin

IV-V. (9Z/9'Z)- α -kriptoxantin és
(9'Z/9Z)- α -kriptoxantin

21. ábra: Az α -kriptoxantin (**11**) össz-*transz* és *cisz* izomerjeinek retenciós ideje C₁₈ és C₃₀-as állófázisokon.

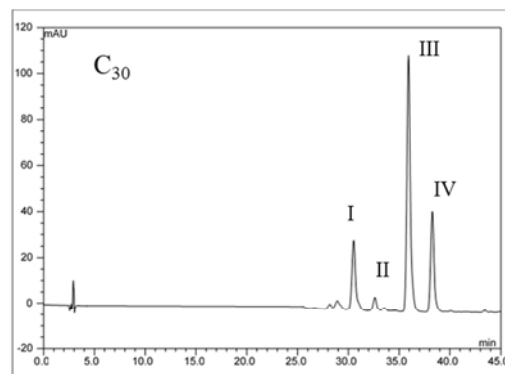
A C₃₀-as állófázis ideálisnak látszik kevésbé poláros karotinoidok (szénhidrogének, monohidroxi-vegyületek) és *cisz-transz* izomerjeik elválasztására. A geometriai izomerek elúciós sorrendje 15Z < 13Z < össz-*transz* < 9Z ezen a szilikagélen (**22. ábra**).



I. (all *E*)- β -karotin

II. (9Z)- β -karotin

III. (13Z)- és (15Z)- β -karotin



I. (15Z)- β -karotin

II. (13Z)- β -karotin

III. (all *E*)- β -karotin

IV. (9Z)- β -karotin

22. ábra: A β -karotin (**1**) össz-*transz* és *cisz* izomerjeinek retenciós ideje C₁₈ és C₃₀-as állófázisokon.

C₃₀-as állófázison a karotinoid molekula hossza befolyásolni látszik a retenciós időt: a 15Z és 13Z izomerek V-alakúak, rövidebbek és „gömböszzerűbbek”, mint az össz-*transz* vagy a 9Z izomerek.

A polaritás növekedésével a geometriai izomerek elválasztásának hatékonysága csökken a C₃₀-as oszlopon. Míg a nem poláros, aszimmetrikus karotinok esetében (pl. α-karotin (**2**), α-kriptoxantin (**11**)) akár a 9Z/9'Z vagy 13Z/13'Z izomer párok elválnak, az elválasztás felbontása csökken az analit növekvő polaritásával (epoxi- és ketokarotinok, pl. kapszantin (**71**): össz-*transz*: 15,5; 9/9'Z: 17,9; 9'/9Z: 18,7; 13/13'Z=13'/13Z: 12,5 perc), különösen igaz ez a 13Z/13'Z izomer párokra.

6.2. Alkalmazások

Kutatócsoportunk a legkülönbébb természetes forrásokból izolálja és analizálja a karotinoidokat. A továbbiakban néhány példán keresztül szeretném bemutatni a fent tárgyalt kétféle állófázis, illetve módszer felhasználását természetben előforduló növények analízisén keresztül.

6.2.1. A kanadai aranyvessző (*Solidago Canadensis* L.) és a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) virágának analízise

A Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognózia Intézetével együttműködve vizsgáltuk a kanadai aranyvessző (*Solidago Canadensis* L.) (**23. ábra**) virágzatának és a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) (**23. ábra**) virágának karotinoid összetételét.¹⁰

A kanadai aranyvessző a fészkesvirágzatúak (*Asteraceae*) családjába tartozó, Észak-Amerikából származó gyógynövény. Többek között flavonoidokat, cserzőanyagot, szaponinokat, illóolajat, szerves savakat, inulint, kumarint és nyálkaanyagokat tartalmaz. A virágzás kezdetétől, júliustól nyár végéig gyűjtik a leveles hajtás felső, maximum 40 cm-es részét (*Solidaginis herba*).

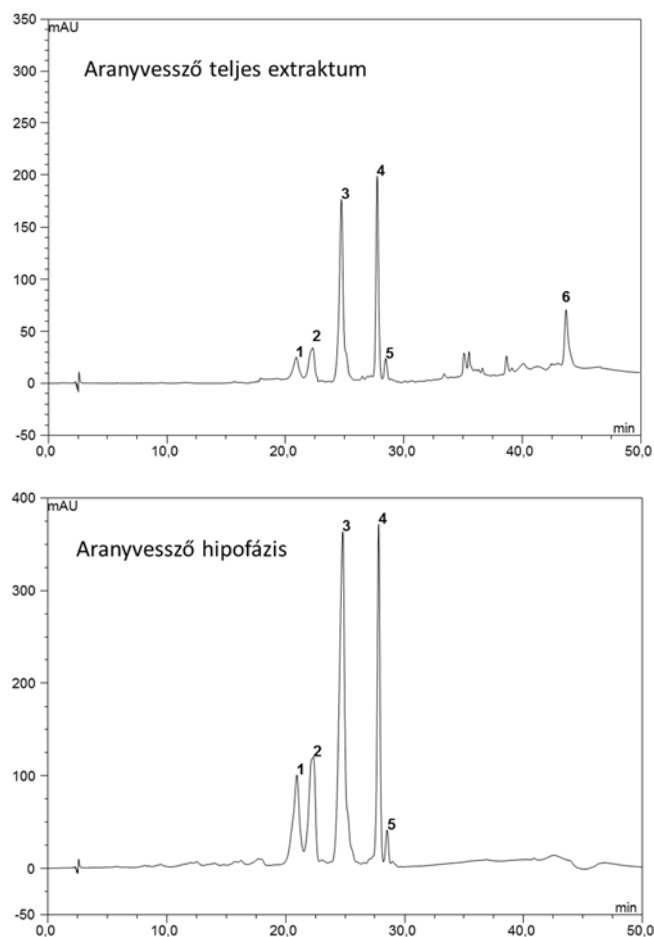
A vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) régóta használt gyógynövény⁷⁵, azonban sárga virágainak karotinoid-összetételét még nem vizsgálták. A gyógyászatban a növény virágos hajtása (*Chelidonii herba*) használatos, mely kb. 0,3-1,5%-ban izokinolinvázis alkaloidokat (kelidonin, protopin, koptizin), ezen kívül fehérjéket (lektineket, és egy proteolitikus enzimet) tartalmaz. Ezek a vegyületek a sárga tejnedvben halmozódnak fel, melyet külsőleg szemölcsök kezelésére használnak napjainkban is.⁷⁶



23. ábra: A kanadai aranyvessző (*Solidago Canadensis* L.) (balra) és a vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) (jobbra) képei.

Munkánk során célul tűztük ki a fenti gyógynövények virágzatából nyerhető teljes extraktum összkarotinoid-tartalmának és karotinoid-összetételének meghatározását.

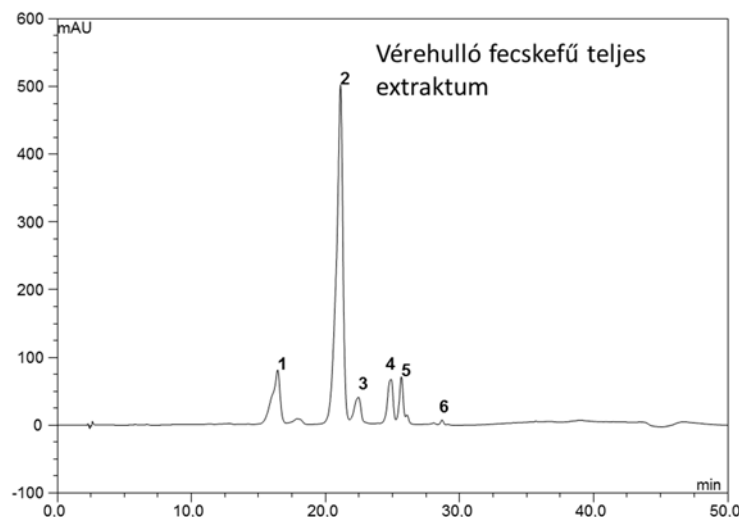
Az analízist C₁₈-as állófázison végezve a kanadai aranyvessző virágában fő komponensekként (9Z,9'Z)-luteint, azaz a neolutein C-t és (9Z)- vagy (9'Z)-luteint azonosítottunk (**24. ábra**). A teljes extraktum vizes metanol (10:90) és hexán közötti megoszlása után a hexános epifázisban csak β-karotin (**1**) maradt mint apoláros karotin. A metanolos hipofázisban viszont a *cisz*-vegyületeken kívül lutein 5,6- (**43**) és 5,8-epoxidot (**44/45**) találtunk (**24. ábra**). A hipofázis CaCO₃-on való oszlopkromatográfiája során több frakció eluálódott az oszlopról, melyek gazdagok voltak poláros karotinoidokban, és így kis mennyiségben jelenlévő komponenseket (neoxantin (**56**), neokrómok (**104**, **105**), violaxantin (**47**), luteoxantin (**50**, **51**), (9Z)-anteraxantin, zeaxantin (**16**)) is sikerült azonosítani.



24. ábra: A kanadai aranyvessző (*Solidago Canadensis* L.) teljes extraktumának (fent) és hipofázikus extraktumának kromatogramja C₁₈-as állófázison:

1 lutein-5,6-epoxid (**43**); **2** flavoxantin/krizantemaxantin (**45/44**); **3** (9Z,9'Z)-lutein (**14**); **4** (9Z)/(9'Z)-lutein; **5** (13Z)/(13'Z)-lutein; **6** β-karotin (**1**)

A vérehulló fecskefű fő karotinoidja a lutein 5,6-epoxid (**43**), ezenkívül lutein 5,8-epoxidot (**44/45**), violaxantint (**47**) és a lutein-5,6-epoxid (**37**) cisz izomerjeit tartalmazza. Apoláros karotin gyakorlatilag nem található az extraktumban (**25. ábra**).



25. ábra: A vérehulló fecskefű (*Chelidonium majus* L.) teljes extraktumának kromatogramja C₁₈-as állófázison:

1 violaxantin (**47**); 2 lutein-5,6-epoxid (**43**); 3 flavoxantin/krizantemaxantin (**45/44**); 4 (9Z)-lutein-5,6-epoxid (**43**); 5 (13Z)/(13'Z)-lutein-5,6-epoxid; 6 lutein (**14**)

6.2.2. Különböző sütőtök fajták karotinoid analízise⁷⁷

Epidemiológiai tanulmányok szerint a zöldségek és a karotinban gazdag gyümölcsök fogyasztása fordított arányban áll a rák, valamint a szív- és érrendszeri megbetegedések előfordulásával. A legtöbb zöldséget nem nyersen, hanem feldolgozva fogyasztjuk. A feldolgozási folyamatok tartalmazznak hőkezelést és oxidációt, melynek mértékét a fény vagy enzimek jelenléte csak fokozza.

A karotinoidok dúsulhatnak az ehető növények bizonyos részeiben, úgymint a gyökérben, szárban, levélben, virágokban, gyümölcsökben vagy a magokban.

Munkacsoportunk korábban vizsgálta a karotinoid összetétel változását néhány zöldségfélében a különböző feldolgozási eljárások során. Azt találták, hogy a lutein (**14**) bizonyos körülmények között átalakulhat 3'-epiluteinné (**15**) illetve anhidrolutein I (**106**) és II (**107**)-vé.^{68, 78} Magyarországon nagy hagyománya van a sütőtök fogyasztásának, illetve számos bébiétel tartalmaz sütőtököt. Munkánk során a hazánkban termesztett, illetve forgalmazott

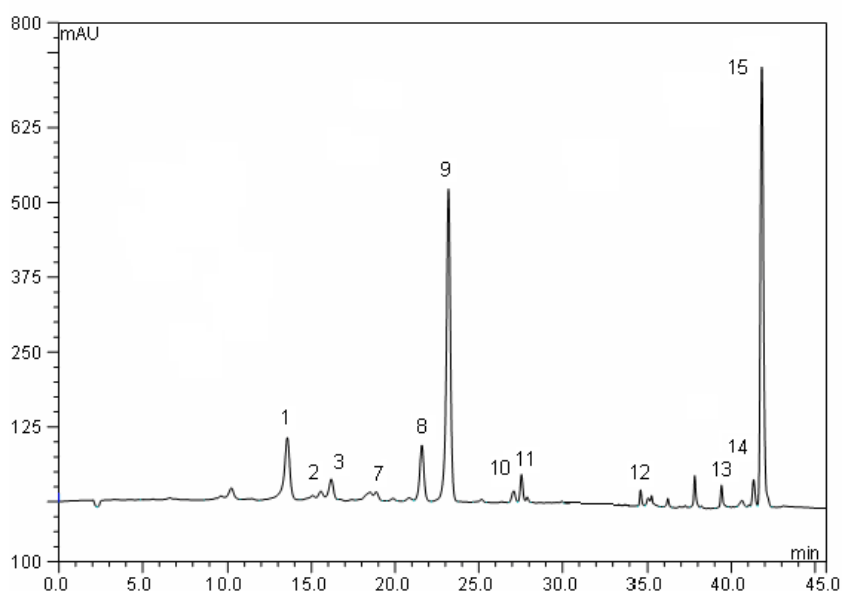
különböző fajtájú nyers- és főtt sütőtökök karotinoid összetételének vizsgálatát végeztük el, C₁₈- és C₃₀-as állófázison.

A piacokon, illetve a hipermarketekben az ún. Nagydobosi (*Cucurbita maxima*), a takarmány tök (Halloween) (*Cucurbita pepo*), az orange, vagy kanadai tök (*Cucurbita moschata*), és a japán Hokkaido tök (*Cucurbita maxima* Duchesne ssp.) kapható (26. ábra).



26. ábra: Sorrendben a Nagydobosi (*Cucurbita maxima*), a takarmány tök (Halloween) (*Cucurbita pepo*), az orange (*Cucurbita moschata*), és a japán Hokkaido tök (*Cucurbita maxima* Duchesne ssp.) képei.

Amint a 3. táblázatból is látható, az egyre közkedveltebb orange tök minimális mennyiségű α -kriptoxantinon (11) kívül csak α - (2) és β -karotint (1) tartalmaz. A másik három fajta nagyobb mennyiségű luteint (14), és egyéb poláros komponenseket, pl. kukurbitaxantint (46) is tartalmaznak.



27. ábra: Nagydobosi sütőtök (*Cucurbita maxima*) extraktumának kromatogramja C₁₈-as állófázison. A számozott csúcsok azonosítása a 3. táblázatban található.

3. táblázat: Különböző sütőtök fajták karotinoid összetétele C₁₈-as állófázison mérve.

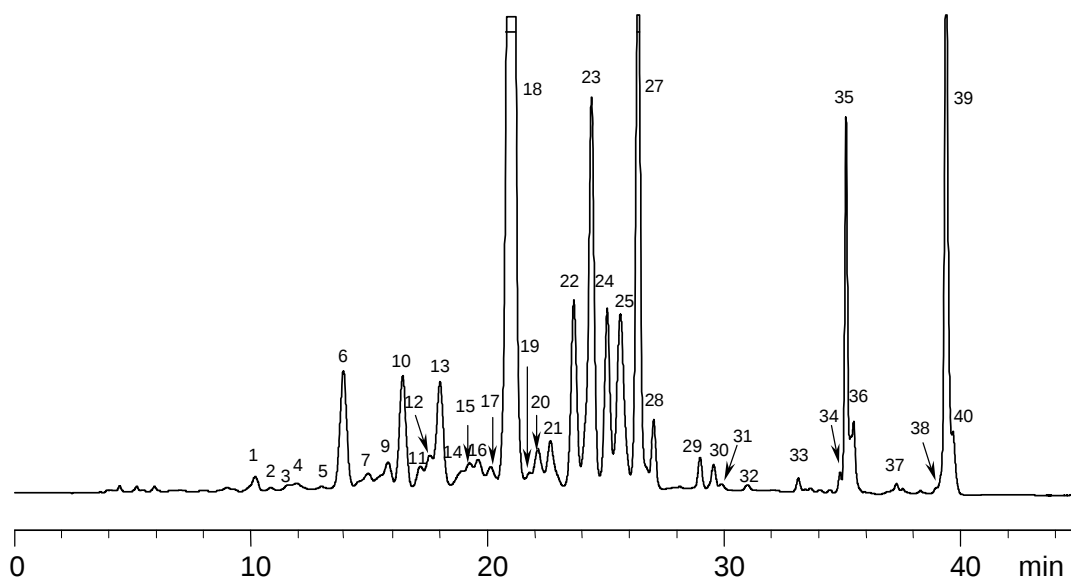
Csúcs	Karotinoid	Nagydobosi	Hokkaido	Halloween	Orange	MS	UV/Vis maximumok
		relatív csúcs alatti terület %				[M+H] ⁺	
1	neoxantin (56)	8,55	2,71	6,70	n.a.	601,4	416, 437, 464
2	neokróm I (104)	0,58	0,55	0,50	n.a.	601,5	396, 416, 445
3	neokróm II (105)	0,92	n.a.	0,40	n.a.	601,5	397, 416, 445
4	violaxantin (47)	2,14	4,14	2,40	n.a.	601,5	415, 436, 465
5	(9/9'Z)-violaxantin ((9Z)- 47)	0,30	1,07	0,20	n.a.	601,5	412, 435, 462
6	(13Z)-violaxantin ((13Z)- 47)	n.a.	n.a.	0,30	n.a.	601,5	408, 431, 460
7	kukurbitaxantin B (108)	0,36	2,89	n.a.	n.a.	601,5	416, 436, 464
8	kukurbitaxantin A (46)	5,46	34,10	n.a.	n.a.	585,5	442, 468
9	lutein (14)	25,59	36,50	15,40	n.a.	569,4	441, 467
10	(9/9'Z)-lutein ((9/9'Z)- 14)	0,58	1,78	n.a.	n.a.	569,4	438, 465
11	(13/13'Z)-lutein ((13/13'Z)- 14)	1,80	3,06	n.a.	n.a.	569,5	434, 460
12	α-kriptoxantin (11)	1,53	0,41	1,13	2,60	553,4	442, 468
13	likopin (7)	1,15	n.a.	n.a.	n.a.	537,5	468, 499
14	α-karotin (2)	1,07	n.a.	26,30	36,0	537,5	442, 468
15	β-karotin (1)	31,72	6,94	38,30	60,4	537,5	454, 479

Ez utóbbiak analízisére mind a C₁₈- (**27. ábra**) mind a C₃₀ fázis alkalmasnak bizonyult. Itt kell megjegyezni, hogy egy korábban publikált közleményben Carle és mtsai⁷⁹ C₃₀-as állófázist alkalmazva a hokkaido tökben anteraxantint (**37**) mutattak ki, ami véleményünk szerint valószínűleg kukurbataxantin A (**46**). A két vegyület azonos molekulatömege és UV/Vis spektruma, valamint C₃₀-as fázison közel azonos retenció ideje alapján nagyon könnyen összekeverhető, C₁₈-as fázison azonban jól megkülönböztethetők (**Függelék 9.1. Táblázat**).

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a hőkezelési eljárások (sütés, főzés) hatásait az izomer képződés miatt jobb a C₃₀-as fázison tanulmányozni, különösen az orange tök esetében.

6.2.3. κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok vizsgálata komplex rendszerekben

A κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok (kapszantin (71), kapszorubin (75) stb) legismertebb forrása a piros paprika, melyet intézetünkben mintegy 90 éve vizsgálnak. Az elmúlt 30 évben a C_{18} -as állófázist alkalmazó HPLC rendszer segítségével számos új szerkezetű karotinoidot izoláltak piros paprikából.⁴⁷ A rendszer kiválóan alkalmas a poláros karotinoidok elválasztására komplex rendszerben, mintegy 40 csúcsot sikerült elválasztani és azonosítani⁹ (28. ábra, 5. táblázat). A 2001-ben megjelent közleményben Szentesi piros paradicsompaprika extraktum karotinoid tartalmát vizsgálták az érési folyamat során. Itt is az általunk használt HPLC módszert (2. táblázat I. Módszer) alkalmazták, de az oszlop a 3.4. fejezetben is említett Chromsyl C_{18} 6 μ m-es állófázis volt. A karotinoidok azonosításának menete az eredeti közleményben olvasható.



28. ábra. Érett (mélyvörös) Szentesi piros paradicsompaprika extraktum kromatogramja Chromsyl C_{18} 6 μ m oszlopon mérve.

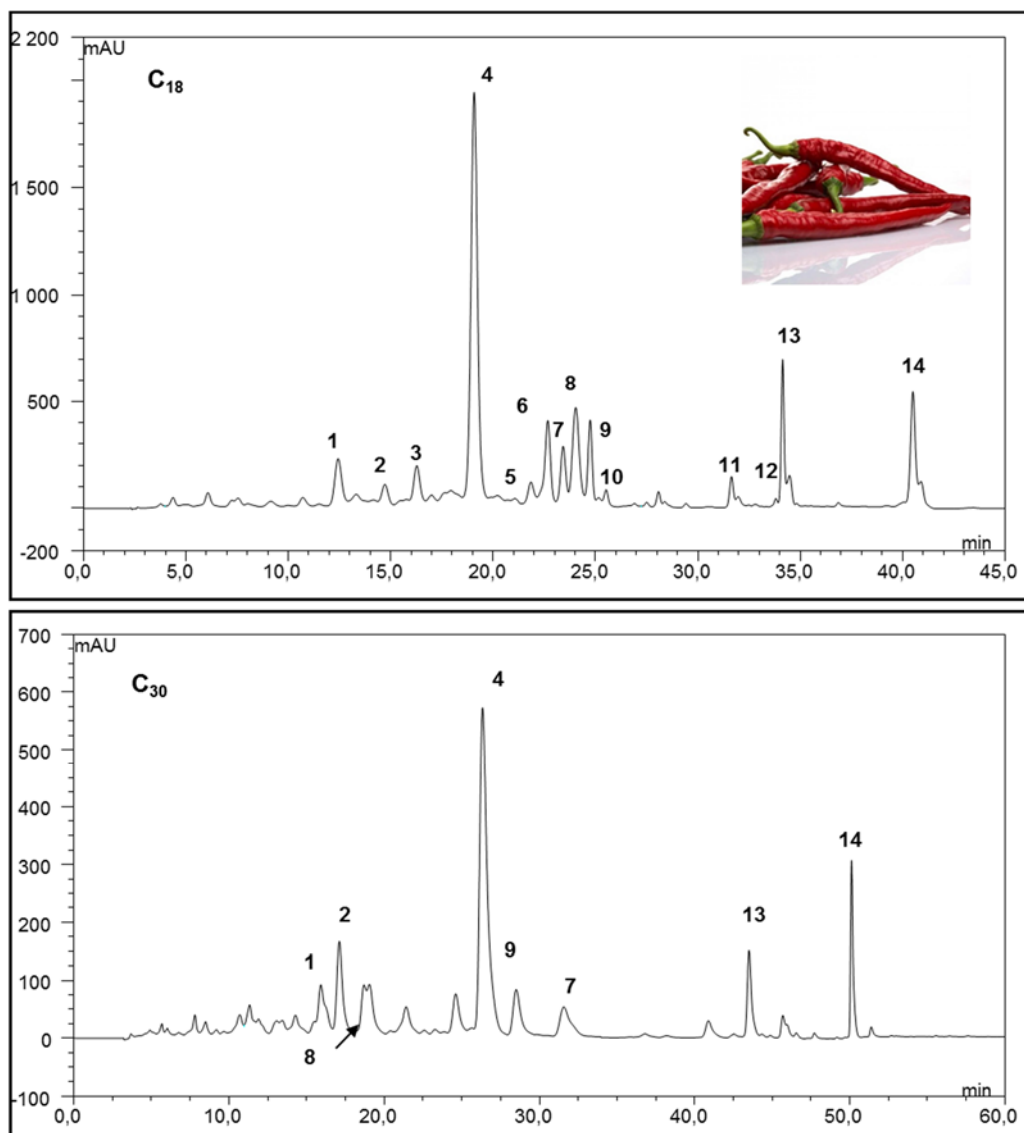
4. táblázat. Érett (mélyvörös) Szentesi piros paradicsompaprika relatív karotinoid tartalma (csúcs alatti terület %)* Chromsyl C₁₈ 6µm oszlopon mérve.

* Összes karotinoid tartalom 1297,12 mg/100 g szárazanyag.

** A számok CaCO₃ oszlopon tapasztalt adszorpciós affinitást jelölik, növekvő sorrendben.

Csúcs	Retenció idő	Karotinoid	Csúcs alatti terület (%)
1	10,2	5,6-diepikapszokarpoxantin (76)	0,32
2	10,8	5,6-diepilatoxantin (109)	0,28
3	11,5	n.a.	0,11
4	11,9	n.a.	0,60
5	12,9	n.a.	0,35
6	13,9	kapszorubin (75)	3,17
7	14,9	6-epikarpoxantin (20)	0,44
8	15,8	neoxantin (56)	0,00
9	15,8	kapszantin-5,6-epoxid (73)	0,54
10	16,4	5,6-diepikarpoxantin (21)	2,76
11	17,2	n.a.	0,57
12	17,6	violaxantin (47)	1,92
13	18,0	kapszantin-3,6-epoxid (103)	2,54
14	18,5	luteoxantin 2** (50,51)	1,11
15	19,2	luteoxantin 1** (50,51)	0,39
16	19,5	kukurbitaxantin B (108)	1,10
17	19,7	kukurbitakróm (110)	0,71
18	21,0	kapszantin (71)	37,02
19	21,8	kapszanton (72)	0,44
20	22,1	anteraxantin (37)	0,45
21	22,7	(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-mutatoxantin (39)	1,50
22	23,6	(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-mutatoxantin (40)	2, 96
23	24,4	kukurbitaxantin A (46)	7,25
24	25,0	(9 <i>Z</i> /9' <i>Z</i>)-kapszantin ((9 <i>Z</i> /9' <i>Z</i>)-71)	3,40
25	25,6	(13 <i>Z</i> /13' <i>Z</i>)-kapszantin ((13 <i>Z</i> /13' <i>Z</i>)-71)	3,83
26	26,4	lutein (14)	0,00
27	26,4	zeaxantin (16)	8,16
28	27,0	nigroxantin (18)	0,77
29	29,0	(9 <i>Z</i>)-zeaxantin ((9 <i>Z</i>)-16)	0,25
30	29,6	(13 <i>Z</i>)-zeaxantin ((13 <i>Z</i>)-16)	0,33
31	29,9	(15 <i>Z</i>)-zeaxantin ((15 <i>Z</i>)-16)	0,09
32	31,0	n.a.	0,51
33	33,6	kriptokapszin (67)	0,57
34	34,9	α-kriptoxantin (11)	0,26
35	35,2	β-kriptoxantin (10)	3,48
36	35,5	(<i>Z</i>)-α-kriptoxantin ((<i>Z</i>)-11)	0,63
37	37,0	n.a.	0,26
38	38,3	α-karotin (2)	0,21
39	39,4	β-karotin (2)	9,16
40	39,8	(<i>Z</i>)-β-karotin ((<i>Z</i>)-2)	0,88

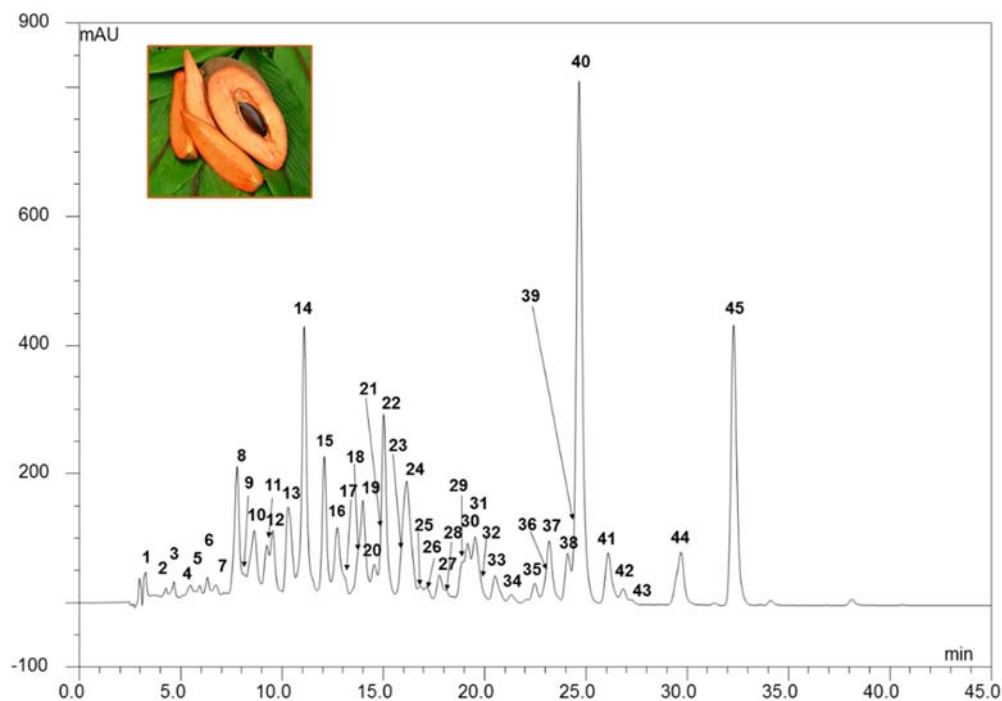
Azóta sokféle piros paprika karotinoid összetételét vizsgáltuk, az alábbi ábrán (**29. ábra** fent) egy Jeromin fajtájú piros paprika extraktum kromatogramja látható C₁₈-as állófázison. Ha C₃₀-as rendszeren mérjük ugyanazt a piros paprika extraktumot, akkor jól láthatóan kevesebb csúcsot kapunk (**29. ábra** lent). Ez a példa is mutatja a két fázis közti különbség, a paprika extraktumban található sok poláros komponens C₃₀-as oszlopon összerolódik, míg a C₁₈-as rendszeren jobb felbontással válnak el.



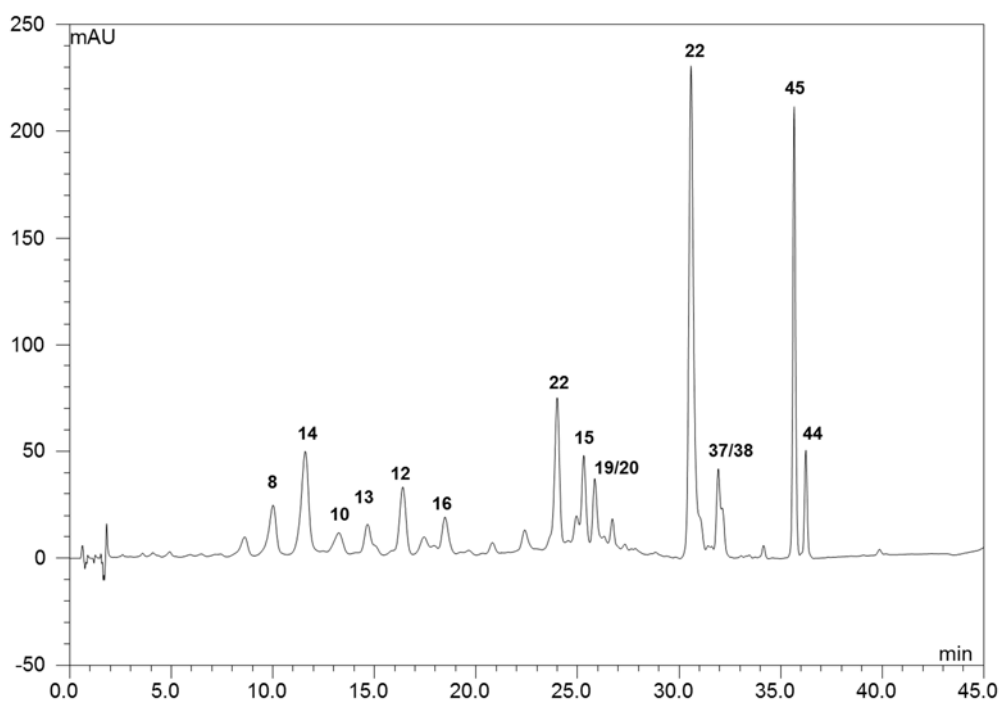
29. ábra: Jeromin piros paprika HPLC kromatogramja C₁₈ (fent) és C₃₀-as (lent) állófázisokon:

1:Kapszorubin (**75**); **2:** Karpoxantin (**19**); **3:** Kapszantin-5,6-epoxid (**73**); **4:** Kapszantin (**71**); **5:** Mutatoxantin (**39**); **6:** Kukurbitaxantin A (**46**); **7:** (9Z)-Kapszantin ((9Z)-**71**); **8:** (13Z)-Kapszantin ((13Z)-**71**); **9:** Zeaxantin (**16**); **10:** Nigroxantin (**18**); **11:** Kriptokapszin (**67**); **12:** α-Karotin (**2**); **13:** β-Kriptoxantin (**10**); **14:** β-Karotin (**1**)

Épp fordított a helyzet egy dél-amerikai gyümölcs a piros mamey (*Pouteria sapota*) esetén. C₁₈-as állófázis használata esetén úgy tűnik a gyümölcs karotinoid összetétele nem túl komplex (**31. ábra**), míg a C₃₀-as oszlopon végzett analízis egy rendkívül bonyolult képet mutat (**30. ábra**).



30. ábra: Mamey gyümölcs karotinoid összetétele C₃₀-as állófázison.



31. ábra: Mamey gyümölcs karotinoid összetétele C₁₈-as állófázison. A csúcsok számozása a C₃₀-as kromatogramnak megfelelően történt.

5. táblázat. Mamey (*Pouteria sapota*) gyümölcs karotinoid összetétele C₃₀ és C₁₈-as állófázisokon, a retenciós idők feltüntetésével.

Csúcs	Retenciós idő C ₃₀ -on	Retenciós idő C ₁₈ -on	Karotinoid	UV/Vis maximum (nm)
1	3.26		n.a.	419, 444
2	4.26		n.a.	416, 431
3	4.65		n.a.	440, 466
4	5.48		latoxantin (111)	416, 441, 468
5	5.93		n.a.	414, 438, 467
6	6.31		n.a.	439, 467
7	6.73		n.a.	412, 436, 463
8	7.78	10.03	<i>transz</i> -neoxantin (55)	416, 440, 468
9	8.39		neokróm (104/105)	402, 423, 448
10	8.63	12,68	violaxantin (47)	416, 440, 468
11	9.25		n.a.	398, 421, 448
12	9.54	16,40	kapszoneoxantin (115)	463
13	10.30	14,67	luteoxantin epimerek (50, 51)	398, 421, 448
14	11.08	11,61	kapszantin-5,6-epoxid (73)	464
15	12.08	25,29	β-kriptoxantin 5,6,5',6'-diepoxid (36)	415, 438, 468
16	12.72	18,47	(9'Z)-violaxantin ((9Z)- 47)	411, 434, 463
17	13.05		n.a.	433, 462
18	13.69		n.a.	396, 419, 446
19	13.98	25,83	β-kriptoxantin 5,6,5',8'-diepoxid (112)	398, 421, 448
20	14.55		β-kriptoxantin 5,8,5',6'-diepoxid (113)	398, 421, 448
21	14.85		kapszorubin (75)+(13Z/13'Z) piros komponens	481 és 454
22	15.02	23,98	kriptokapszin-5,6-epoxid (69) nem tiszta csúcs	481 és 467

23	15.91		3'-dezoxi-kapszantin-5,6-epoxid (118)	467
24	16.15		β -kriptoxantin-5,8,5',8'-diepoxid (114) + (9'Z)-kapszoneoxantin ((9'Z)- 115)	388, 402, 426 és 460
25	16.85		n.a.	411, 435, 464
26	17.27		n.a.	421, 447, 475
27	17.78		n.a.	468
28	18.11		n.a.	468
29	18.75		β -karotin-5,6,5',8'-diepoxid (26)	398, 421, 447
30	19.17		(13Z/13'Z)-kriptokapszin ((13Z/13Z)- 67)	463
31	19.53		(13Z/13'Z)-kriptokapszin ((13'Z/13Z)- 67)	463
32			n.a.	447, 470
33	20.52		keverék	450, 475
34	21.31		3'-dezoxikapszorubin (77)	482
35	22.47		3'-dezoxikapszantin (68)	473
36	22.90		n.a.	445, 470
37	23.18	31,94	β -kriptoxantin-5',8'-epoxid (35)	427, 451
38	24.09		β -kriptoxantin-5,8-epoxid (34)	427, 451
39	24.40		n.a.	469
40	24.65		kriptokapszin (67)	472
41	26.07		(13Z/13'Z)-szapotexantin ((13Z/13'Z)- 66)	462
42	26.83		β -karotin 5,6-epoxid (22)	420, 444, 472
43	27.27		3,3'-didezoxikapszorubin (117)	482
44	29.70	36,24	β -karotin-5,8-epoxid (24)	427, 452
45	32.30	35,67	szapotexantin (66)	473
46	34.11		n.a.	
47	38.11		β -karotin (1)	450, 476

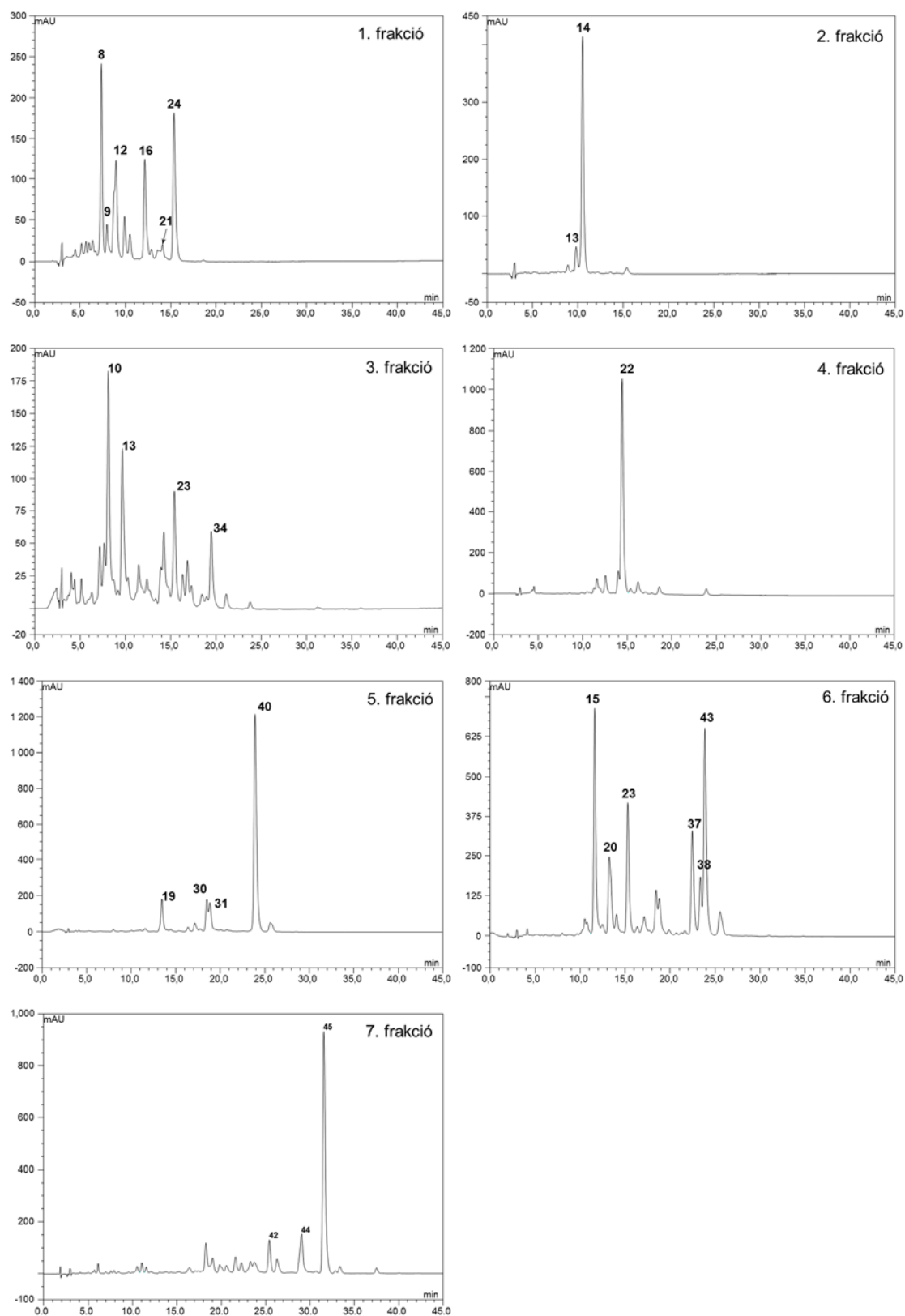
A továbbiakban a mamey példáján mutatnám be egy komplex rendszer részletes karotinoid analízisét.^{80, 81}

Az extraktum HPLC-DAD-MS C₃₀-as állófázison elvégzett analízise mintegy 47 csúcsot eredményezett. A fő csúcsok azonosítása retenciós idejük, *UV/Vis* spektrumuk, molekulatömegük, illetve az autentikus mintákkal való összehasonlítás alapján történt. Így a fő komponens (40-es csúcs, 568 m/z, $\lambda_{\max} = 473\text{nm}$) kriptokapszinnak (**67**) adódott. A 30 és 31-es csúcs a kriptokapszin 13Z- és 13'Z-izomerjei. A következő fő csúcs, a 45-ös, mely a kriptokapszinhoz hasonló spektrummal és 552 m/z molekulatömeggel rendelkezett, a szapotexantin (**66**) volt, melynek szerkezetét kutatócsoportunk a panamai kutatócsoporttal együtt tisztázta.⁵⁹ A 14-es csúcs (600 m/z, $\lambda_{\max} = 464\text{ nm}$) kapszantin-5,6-epoxidnak (**75**) bizonyult. A poláros karotinoidok közül a 10-es csúcs molekulatömege és spektrumának finomszerkezete alapján (600 m/z, $\lambda_{\max} = 416, 440, 468\text{ nm}$) violaxantin (**47**), míg a 16-os csúcs a (9Z)-violaxantin mely a *transz*-vegyületnél 4 nm-el alacsonyabb hullámhossz maximumú spektrummal bír. Ugyancsak 600 m/z molekulatömegű a 34-es csúcs, melynek spektruma a violaxanthinhoz (**47**) hasonló finomszerkezettel, de 20 nm-el alacsonyabb hullámhossz maximummal rendelkezett. Autentikus mintával összehasonlítva a violaxantin ún. félfuranoidjairól a luteoxantin epimerekről (**50, 51**) van szó, melyek C₃₀-as fázison nem válnak el egymástól.

A 8-as és a 15-ös csúcsok ugyancsak violaxantin-szerű csúcsot mutattak, 600 m/z illetve 584 m/z molekulatömeggel. A 8-as csúcs ez alapján *transz*-neoxantin (**55**), a 15-ös csúcs pedig β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**36**). A 9-es csúcs, mely a 10-es csúcs vállaként jelentkezett, a neoxantin furanoidjai, a neokróm (**104, 105**) diasztereomer párok, (pontos azonosításuk autentikus standardok nélkül nem lehetséges) voltak molekulatömegük és spektrumuk alapján.

A β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**36**) részleges savazásával β -kriptoxantin-5,8,5',8'-diepoxidot (**114**), β -kriptoxantin-5,8,5',6'-diepoxidot (**113**) és β -kriptoxantin-5,6,5',8'-diepoxidok (**112**) keverékét állítottuk elő. A mamey extraktum és ennek a keveréknek az összekromatografálásával a 24-es csúcsot β -kriptoxantin-5,8,5',8'-diepoxidnak (**114**), a 19 és 20-as csúcsot β -kriptoxantin-5,6,5',8'-diepoxidnak (**112**) és/vagy β -kriptoxantin-5,8,5',6'-diepoxidnak (**113**) azonosítottuk. Az utóbbi kettő egzakt megkülönböztetése csak NMR mérések alapján végezhető el, tiszta minta azonban nem állt rendelkezésünkre. A 42-es és a 44-es csúcs is 552 m/z molekulatömeget mutatott. Spektrumuk alapján az első β -karotin-5,6-epoxid (**22**), a másik β -karotin-5,8-epoxid (**24**). Az apoláros karotinoidok közül a 47-es csúcs, mint β -karotin (**1**) a 41-es csúcs a szapotexantin (**66**) (13Z/13'Z)-izomerjeként került azonosításra.

Bár sok komponens azonosítható a teljes extraktum analízisével, számos kisebb csúcs, melyek zöme kevert csúcs volt azonosítatlan maradt. Ezek azonosítására a teljes extraktumot klasszikus oszlopkrómográfiával CaCO_3 adszorbensen 7 frakcióra bontottuk (**32. ábra**), melyek HPLC-DAD-MS analízisét szintén elvégeztük C_{30} -as állófázison. CaCO_3 adszorbensen a karotinoidok máshogy kötődnek, mint a szilikagélen, így az egymást elfedő komponensek is elválaszthatók és azonosíthatók.



32. ábra: A mamey gyümölcs CaCO_3 oszlopon végzett oszlopkromatográfiájakor kapott hét frakciójának kromatogramjai C_{30} -as oszlopon. A csúcsok számozása a **30. ábrának** megfelelően történt.

Az 1. frakció hét nagyon poláros komponenst tartalmazott, melyek közül hatot tudtunk azonosítani. A fő komponens a (*transz*)-neoxantin (**55**) (8. csúcs) és a (9*Z*)-violaxantin ((9*Z*)-**47**) (16. csúcs). A harmadik azonosított karotinoid a neokróm (**104/105**) volt (9. csúcs). A negyedik komponens (12. csúcs) a kapszantin-5,6-epoxidhoz hasonló spektrummal rendelkezett, molekulatömege 600 volt, de nem mutatott reakciót savval. Korábban asparagus bogyóból munkacsoportunk⁸² kapszoneoxantint (**115**) mutatott ki, mely hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, így a 12-es csúcsot kapszoneoxantinként (**115**) azonosítottuk. Egy másik kísérlet sorozat eredményeként a közelmúltban kb. 3 mg kristályos kapszoneoxantint (**115**) izoláltunk mameyből (neoxantinnal (**55**) és (9*Z*)-neoxantinnal (**56**) együtt), melyek szerkezetazonosítása folyamatban van. Az ötödik komponens, melyet feltételesen azonosítottunk ebből a frakcióból a kapszoneoxantin (**115**) (9*Z*)-izomerje volt, amely a 24-es csúcs alatt bújik el a total extraktum kromatogramján. A hatodik komponens a kapszantin-5,6-epoxidnak megfelelő retenciós időnél jelentkezett, molekulatömege 600, az *UV/Vis* spektrumának maximuma azonban 481 nm volt így kapszorubinként (**75**) azonosítottuk (21. csúcs).

A 2. frakció fő komponense a kapszantin-5,6-epoxid (**73**) volt (14. csúcs). E frakció tartalmazott még az egyik luteoxantin-epimert (**50/51**) (13. csúcs) és a kapszantin-5,6-epoxid (**73**) (13*Z*)- és vagy (13'*Z*)-izomerjeit, melyeket a total extraktumban nem tudtunk kimutatni.

A 3. frakció fő komponense a violaxantin (**47**) (10. csúcs) és a másik luteoxantin epimer (**50/51**) (13. csúcs). Ahogy korábban említettem a luteoxantin epimerek C₃₀-as állófázison nem válnak szét, a CaCO₃ adszorbens azonban szétválasztja őket, az egyik epimer a második a másik epimer pedig a harmadik frakcióban eluálódott, pontos azonosításuk autentikus standard nélkül nem lehetséges. Ez a frakció tartalmazza ezen kívül a kapszantint (**71**) (R_t=15,5 min, m/z=584, λ_{max}=475 nm) (23. csúcs) és a 3'-dezoxikapszorubint (**77**) (R_t=18,5 min, m/z=584, λ_{max}=481 nm) (34. csúcs), melyeket a total extraktumban elfednek a nagyobb mennyiségben jelenlévő komponensek.

A 4. frakció fő komponense a kapszantin-5,6-epoxidhoz hasonló spektrummal rendelkezik, molekulatömege azonban csak 584. Ez a kriptokapszin-5,6-epoxidnak (**69**) felel meg (22. csúcs), melyet, mint új karotinoidot izoláltunk és szerkezetét meghatároztuk.⁵⁸ A frakció más, beazonosítható komponenst nem tartalmazott.

Az 5. frakció fő komponense a mamey fő karotinoidja a kriptokapszin (m/z=569.2) (**67**) (40. csúcs), és 13/13'-*cisz* izomerjei (m/z=569.3) (30. és 31. csúcs). Ebben a frakcióban található még a β-kriptoxantin-5,6,5',8'-diepoxid (m/z=585.2) (**112**) is (19. csúcs)

A 6. frakció meglehetősen komplex képet mutatott. Fő komponensek a β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid ($m/z=585.3$) (**36**) (15. csúcs), a β -kriptoxantin-5,8,5',6'-diepoxid ($m/z=585.2$) (**113**) (20. csúcs), a 3'-dezoxi-kapszantin-5,6-epoxid (**116**) (23. csúcs), a didezoxi-kapszorubin (**115**) (43. csúcs), β -kriptoxantin-5',8'-epoxid ($m/z=569.2$) (**35**) (37. csúcs), és a β -kriptoxantin-5,8-epoxid ($m/z=569.3$) (**34**) (38. csúcs).

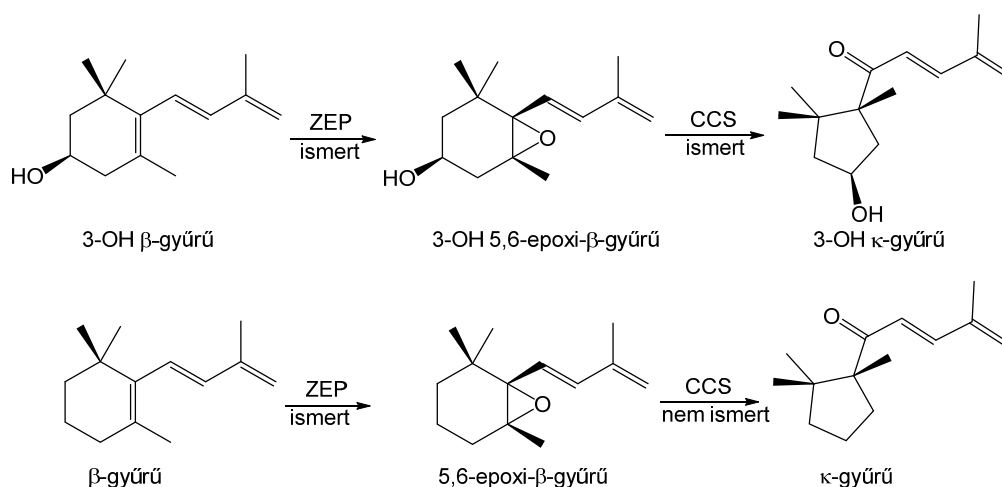
A 7. frakció fő komponense a szapotexantin (**66**) (45. csúcs). Emellett kisebb mennyiségben β -karotin-5,6- (**22**) (42. csúcs) és 5,8-epoxidot (**24**) (44. csúcs) mutattunk ki.

6.3. A nem hidroxilált végcsoportot tartalmazó karotinoid epoxidok analízise^{58, 83}

A hidroxilált β -gyűrűn 5,6-os helyzetben epoxid funkciós csoportot tartalmazó karotinoidok (anteraxantin (**37**), violaxantin (**47**), stb.) igen gyakoriak a természetben. A szimmetrikus és nem szimmetrikus karotinoid 5,6-epoxidok (9Z)-izomerjei különösen fontosak, hiszen ezen karotinoidok centrális oxidatív hasításával jön létre az abszcizinsav (ABA), a jól ismert növényi hormon.^{64, 65}

A nem hidroxilált β -gyűrűn lévő 5,6-epoxi csoporttal rendelkező vegyületek ritkábban fordulnak elő a természetben, apoláros tulajdonságuk miatt izolálásuk is nehezebb. A β -karotin mono- (**22**) és diepoxidot (**25**) édesburgonyából izolálták az 1980-as években.^{84, 85} A 90-es években munkacsoportunk tagjai közölték a β -kriptoxantin mono- és diepoxidjainak szintézisét.⁴⁸

Egyes növényi szervezetekben az 5,6-epoxi karotinoidok 6-oxo- κ -karotinoidokká alakulnak a kapszantin-kapszorubin szintáz (CCS) enzim segítségével (**33. ábra**).⁸⁶

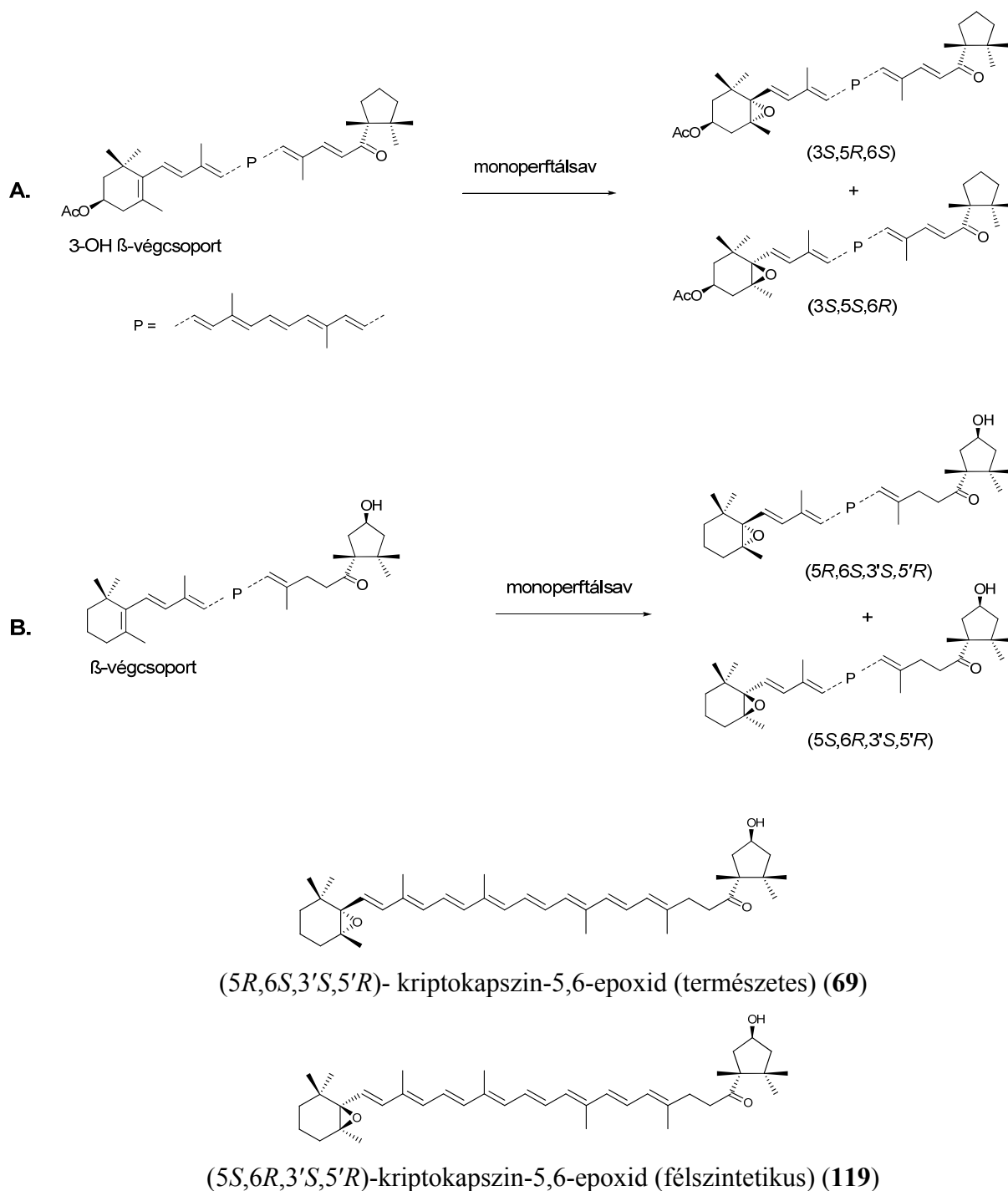


33. ábra: A κ gyűrű bioszintézise (ZEP: zeaxantin epoxidáz; CCS: kapszantin-kapszorubin szintáz).

Így például az anteraxantin (**37**) kapszantinná (**71**), a violaxantin (**47**) pedig kapszantin-5,6-epoxiddá (**73**), majd kapszorubinná (**75**) alakul át a piros paprikában (*Capsicum annuum*),⁷⁻⁹ az *Asparagus officinalis*⁸⁷ és az *Asparagus falcatus*,⁸⁸ bogyójában, valamint a *Lilium tigrinum* porzójában és virágszirmában.⁶³

A piros mamey (*Pouteria sapote*) gyümölcséből új, korábban ismeretlen szerkezetű, nem hidroxilált κ -karotinoidokat, pl. szapotexantint (**66**),⁵⁹ 3-dezoxi- (**116**) és 3,3'-didezoxi-kapszorubint (**117**)⁸⁹ izoláltunk és azonosítottunk. Feltételezzük, hogy ezek a vegyületek is a fent említett bioszintetikus úton keletkezhetnek a β -karotin valamint a β -kriptoxantin mono- és diepoxidjaiból, melyeket az extraktumban is ki tudtunk mutatni.

Szintén a piros mamey gyümölcs analízise során találtuk meg a természetes forrásból először izolált κ -végcsoportot tartalmazó kriptokapszin-5,6-epoxidot (**69**) és a 3'-dezoxi-kapszantin-5,6-epoxidot (**116**).⁵⁸ Ez utóbbi vegyület esetében a hidroxilcsoport az epoxidos gyűrűn van, így a szerkezetazonosítás nem okoz problémát (**34A. ábra**). Ahogy azt a 6.1.6. fejezetben is említettem, ha a hidroxilcsoport az epoxid csoporttal azonos gyűrűn helyezkedik el, a két sztereoizomer (*szün* és *anti*) C₁₈-as oszlopon elválik egymástól. A kriptokapszin-5,6-epoxid (**69**) esetében - ahol az epoxidos végcsoporton nincs hidroxilcsoport - az azonosítás megkönnyítésére kriptokapszin monoperftálsavval történő epoxidálásával előállítottuk a félszintetikus vegyületet (**34B. ábra**). Az epoxidálás során egy diasztereomer vegyületpár keletkezik:

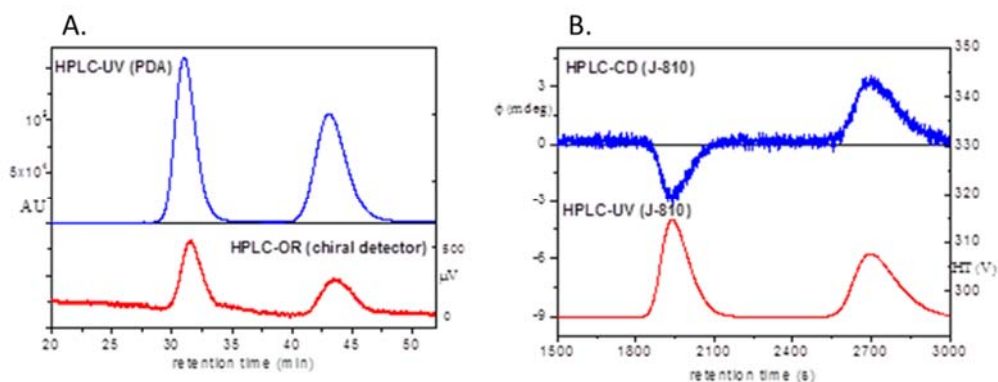


34. ábra. Az epoxidálás 3-as helyzetű hidroxil- és hidroxilcsoportot nem tartalmazó β gyűrű esetén, valamint a kriptokapszin-5,6-epoxid diasztereomerek szerkezeti képlete.

A szintetikusan előállított *szün*- és *anti*-epoxidok ha 3-as helyzetben tartalmazznak hidroxilcsoportot (**34A. ábra**), akkor jól elválaszthatók klasszikus oszlopkromatográfiával és HPLC-vel is mind C_{18} , mind C_{30} állófázison (**Függelék 9.1. Táblázat**). A hidroxilcsoportot nem tartalmazó diasztereomerpárok azonban csak királis HPLC oszlopon választhatók el.

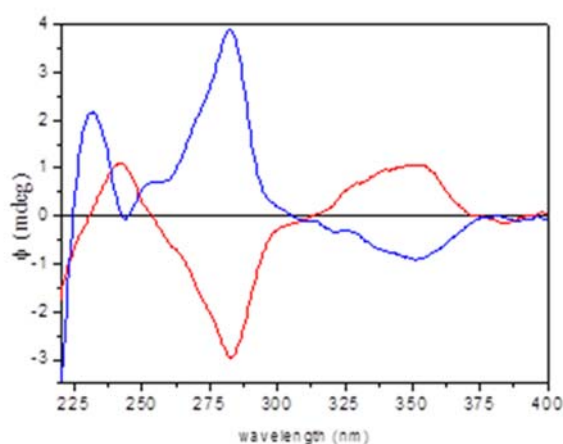
Esetünkben először Chiralcel OD 3 μm oszlopot és *n*-hexán-etanol (80:20 v/v%) eluenst alkalmazva sikerült az elválasztást megvalósítani, igaz hosszú analízis idő alatt (**7. táblázat**).

A Debreceni Egyetem TTK Szerves Kémiai Tanszékének munkatársai a kidolgozott elválasztás segítségével elvégezték a HPLC-CD méréseket, mely alapján a két komponens konfigurációját meg lehetett határozni (**35. ábra** és **36. ábra**).⁵⁸



35. ábra. A. Az elválasztott (5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)- (**69**) és (5*S*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-kriptokapszin-5,6-epoxid (**119**) diaszteromerek (**34. ábra**) HPLC-UV (kék) és HPLC-OR (piros) kromatogramjai, 480 nm-en (Chiralcel OD, *n*-hexán/EtOH 80:20).

B. Az elválasztott (5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)- (**69**) és (5*S*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-kriptokapszin-5,6-epoxid diaszteromerek (**119**) HPLC-CD (kék) és -UV (piros) kromatogramjai (Chiralcel OD, *n*-hexán/EtOH 80:20)

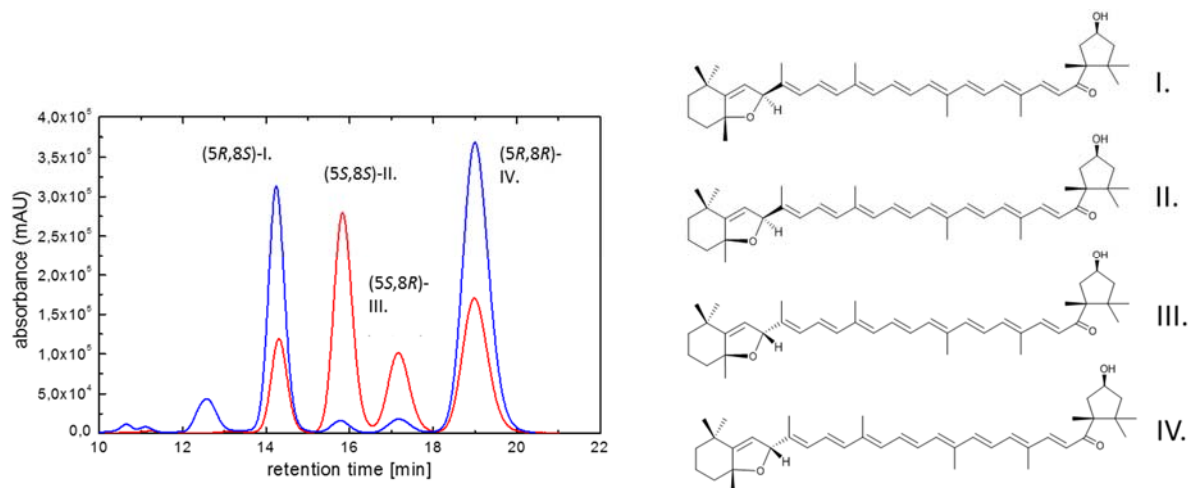


36. ábra. A (5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*)- kriptokapszin-5,6-epoxid (**69**) (piros, elsőként eluálódó diasztereomer) és a (5*S*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-kriptokapszin-5,6-epoxid (**119**) (kék, másodikként eluálódó diasztereomer) HPLC-ECD spektruma.

Mint azt már a violaxantin esetén⁹⁰ a hatvanas években megállapították, az (5*R*,6*S*) végcsoporthoz 280 nm-nél negatív Cotton effektus tartozik és az (5*S*,6*R*) végcsoporthoz

pozitív.⁴⁸ Ez alapján rendeltük hozzá a **(69)** vegyülethez, ami egyben a természetes komponens, az *5R,6S* konfigurációt, a **(119)** vegyülethez pedig az *5S,6R* konfigurációt.

Hasonló módszerrel a mameyből izolált természetes **(120, 123)** és a félszintetikus kriptokapszin-5,6-epoxidok keverékből előállított kriptokapszin 5,8-epoxidokat **(120-123)** is szétválasztottuk, és a csúcsokhoz hozzárendeltük a konfigurációkat (**37. ábra**).



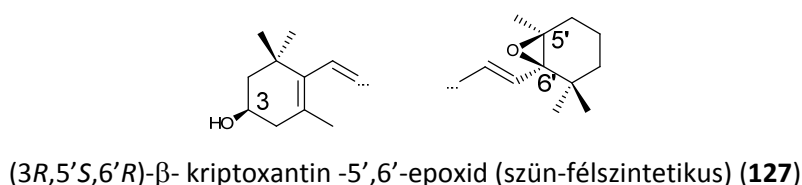
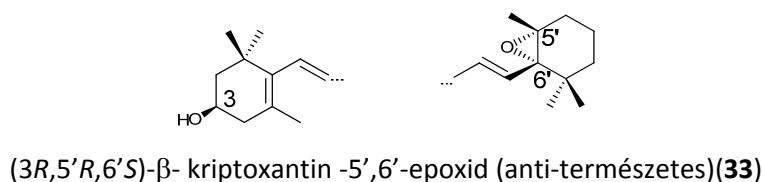
37. ábra. A kriptokapszin-5,8-epoxid természetes [kék, (*5R,8S,3'S,5'R*)-I (**120**), (*5R,8R,3'S,5'R*)-IV (**123**)] és a félszintetikus sztereoizomer keverékének [piros, (*5R,8S,3'S,5'R*)-I (**120**), (*5R,8R,3'S,5'R*)-IV (**123**), (*5S,8R,3'S,5'R*)-III (**122**), (*5S,8S,3'S,5'R*)-II (**121**)] HPLC-UV kromatogramjai egymásra helyezve (Chiralpak IC, *n*-hexán/EtOH 80:20).

A későbbiekben az analízis idő csökkentése érdekében az *n*-hexán-etanol (80:20 v/v%) eluens rendszerről a metanol-etanol, illetve acetonitril-etanol (50:50 v/v%) rendszerre tértünk át. Így a retenciós idők jelentősen lecsökkentek és a csúcsszélesedés is redukálódott. A CD-méréseknél minden esetben Chiralpak IA oszlopot alkalmaztak, az eluensek viszont, ahogy az az ábrákon is feltüntettem, különbözőek. Ennek oka, hogy az acetonitril oldószer CD méréseknél nem használható, UV elnyelése zavarja a mérést.

A piros mamey (*Pouteria sapota*) extraktum HPLC analízise során (ld. **2. táblázat** II. Módszer) két intenzív csúcsot találtunk azonos *UV/Vis* spektrumokkal (445, 472 nm a HPLC eluensben) és azonos molekulatömeggel (568 m/z). Ezeket az anyagokat az *UV/Vis* és MS spektrumuk alapján β-kriptoxantin-5,6- (**31**) és 5',6'-epoxidként (**33**) azonosítottunk feltételeesen (18,78 min és 15,85 min). A kérdés csak az volt, hogy melyik az 5,6- és melyik az 5',6'-epoxid. Panamai partnerünknek sikerült preparatív HPLC-vel kis mennyiségben izolálni a két komponenst, így természetes forrásból is rendelkezésre álltak ezek a komponensek. A teljes szerkezetazonosításhoz újra elvégeztük a β-kriptoxantin (**10**) acetilezést követő monoperftálsavas epoxidálását is, ugyanúgy, ahogy 1997-ben már Molnár és munkatársai

leírták.⁴⁸ Akkor a dezacetilezést követő többszöri ismételt oszlopkromatográfia segítségével izolálták a (3*S*,5*R*,6*S*)- (**31**), (3*S*,5*S*,6*R*)-5,6-epoxi- (**32**) és (3*R*,5'*R*,6'*S*)-5',6'-epoxi-β-kriptoxantint (**33**), valamint a (3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)- (**36**) és (3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-5,6,5',6'-diepoxi-β-kriptoxantint (**124**) mint fő komponenseket a reakcióelegyből. A pontos szerkezetazonosítást *UV/Vis*, ECD, ¹H- és ¹³C-NMR és tömegspektrumok segítségével végezték el. Az előbbi felsorolásból látszik, hogy a β-kriptoxantin-5,6-epoxid esetében az *anti* (3*S*,5*R*,6*S*)- (**31**) és a *szün* (3*S*,5*S*,6*R*)- (**32**) konfigurációjú vegyület is rendelkezésre állt. A β-kriptoxantin-5',6'-epoxid esetében azonban, tehát ahol a hidroxilcsoport nem az epoxidos végcsoporton található, 1997-ben csupán a (3*R*,5'*R*,6'*S*)- (**33**) komponenst közölték le; a (3*R*,5'*S*,6'*R*)- diasztereomert nem találták meg. Ma már tudjuk, hogy azoknál a karotinoidoknál, ahol a hidroxilcsoport nem az epoxidos csoporttal azonos gyűrűn található, a diasztereomer párok elválasztása csak királis töltetű HPLC oszlopon valósítható meg (ld. 6.1.6. fejezet).

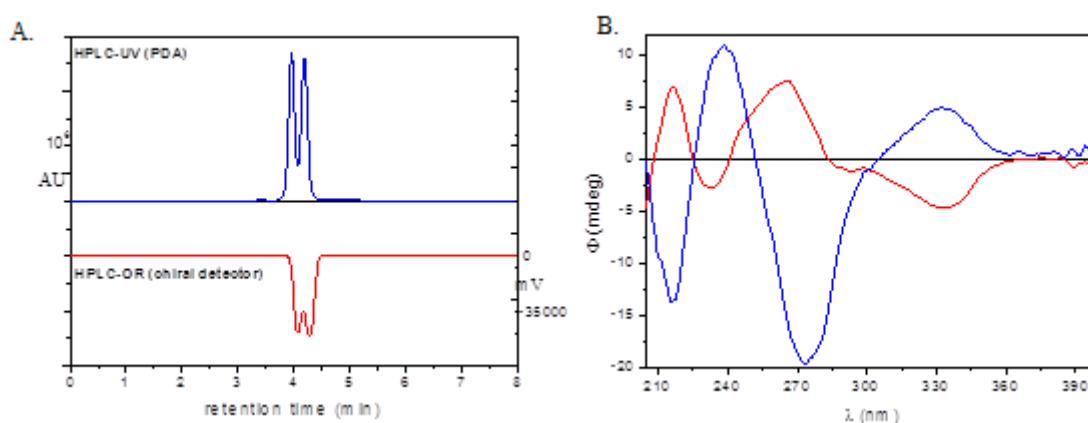
Klasszikus oszlopkromatográfiát alkalmazva újra izoláltuk a β-kriptoxantin epoxidálásával előállítható négyféle monoepoxidot (**31**, **32**, **33**, **127**). Az NMR és MS vizsgálatok alapján azonosítottuk a β-kriptoxantin-5,6- és -5',6'-epoxidot, és megállapítottuk, hogy a mamey extraktum HPLC kromatogramján kisebb retenciós idővel jelentkező csúcs az 5',6'-epoxid, a nagyobb retenciójú pedig az 5,6-epoxid (**2. táblázat II. Módszer**).



38. ábra: A β-kriptoxantin epoxidálása során nyert 5',6'-epoxidok két diasztereomer párjának szerkezeti képlete.

A félszintetikus (5'*R*,6'*S*)- (**33**) és (5'*S*,6'*R*)-kriptoxantin-5',6'-epoxid (**127**) (**38. ábra**) diasztereomer párt Chiralcel OD és Chiralpack IA HPLC oszlopokkal el tudtuk választani, és ezen módszerek alapján a két diasztereomer körülbelül azonos mennyiségben van jelen a reakcióelegyben (**39. ábra**). Ugyanezen a királis rendszeren az izolált 5',6'-epoxid egy csúcsot

adott, melynek retenciós ideje megegyezett az előbb eluálódó 5'*R*,6'*S* konfigurációjú félszintetikus vegyülettel. Ez alapján a természetes komponenshez hozzárendeltük ezt a konfigurációt. Az abszolút konfiguráció meghatározásához a félszintetikus diasztereomer keveréket és a természetes komponenst a debreceni kollégák is megvizsgálták HPLC-CD módszerrel, melynek eredményét a **39. ábrán** látjuk. Itt jegyzem meg, hogy az általuk alkalmazott HPLC rendszeren a két diasztereomer elúciós sorrendje megfordult. A diasztereomer párok HPLC-ECD spektruma ellentétes Cotton effektust mutatott, de nem tükörképi grafikonok (**39. ábra**). A korábbi kutatások alapján⁴⁸ az ECD spektrumok szerint az elsőként eluálódó komponenshez a (3*R*,5'*R*,6'*S*)- (**33**) abszolút konfigurációt rendeltük hozzá, a másodikhoz pedig a (3*R*,5'*S*,6'*R*)- (**107**) konfigurációt. Tehát a természetes komponens abszolút konfigurációja (3*R*,5'*R*,6'*S*) (**33**).



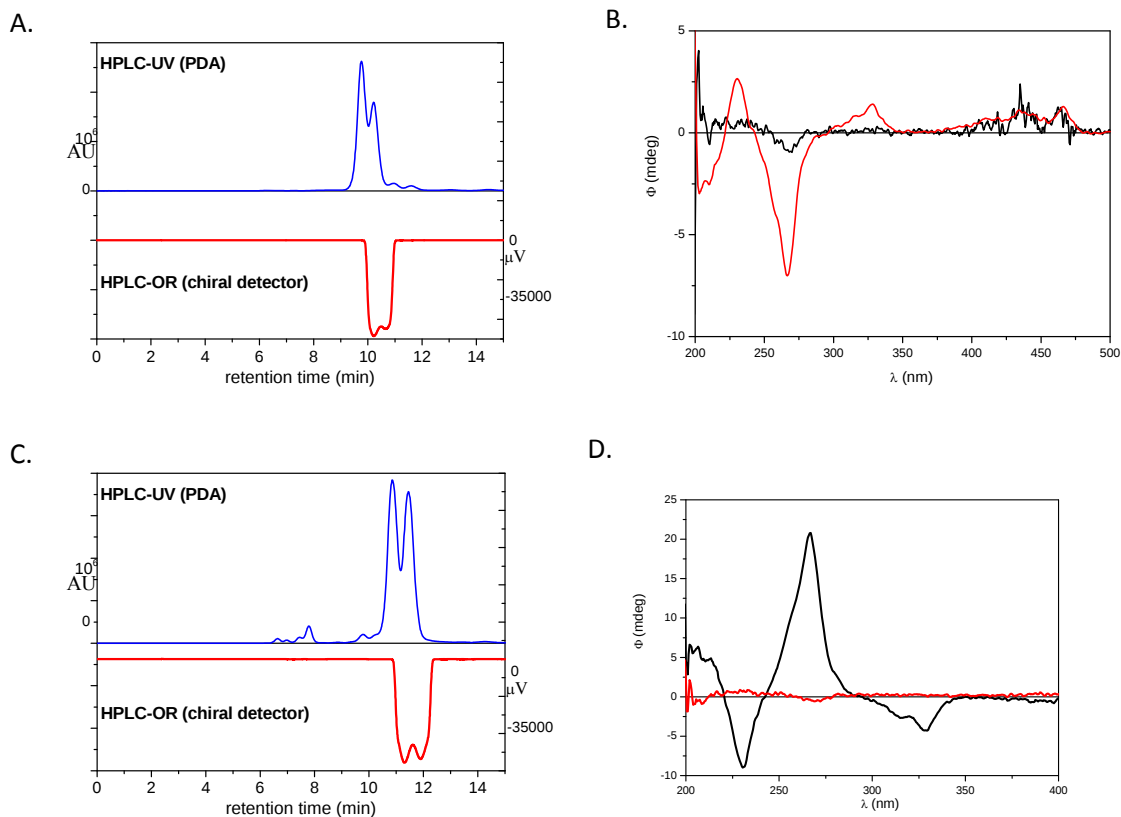
39. ábra: A. A (3*R*,5'*R*,6'*S*)- (**33**) és (3*R*,5'*S*,6'*R*) (**127**)-kriptoxantin-5',6'-epoxidok HPLC-UV és HPLC-OR kromatogramjai, (Chirlapak IA, *n*-hexán/izopropanol 9:1).

B. A kriptoxantin-5',6'-epoxid diasztereomerek HPLC-ECD spektruma: (3*R*,5'*R*,6'*S*)- (**33**) (kék) és (3*R*,5'*S*,6'*R*)- (**127**) (piros) (*n*-hexán/izopropanol 9:1).

Hasonló módon megvizsgáltuk a β-kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxidokat is. Úgy találtuk, hogy a korábban⁴⁸ úgynevezett *anti,anti* (3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-diepoxidnak (**36**) valamint a *szün,szün* (3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-diepoxidnak (**124**) tartott két komponens valójában négy vegyület (**36** és **124-126**) (**40. ábra**).

A korábban elvégzett CD vizsgálatok erre nem tudtak fényt deríteni, mivel az azonos konfigurációjú végcsoportok egymás hatását felerősítik, az ellentétesek pedig kioltják, így csak az azonos konfiguráció Cotton effektusa vált láthatóvá. Királis oszlop híján a (3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-(**36**) *anti,anti* és (3*S*,5*R*,6*S*,5'*S*,6'*R*)-(**125**) *anti,szün* valamint a

(3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-(124) *szűn,szűn* és (3*S*,5*S*,6*R*,5'*R*,6'*S*)-(126) *szűn,anti* vegyületeket nem tudták egymástól elválasztani, megkülönböztetni.



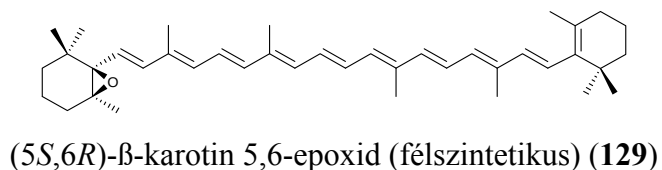
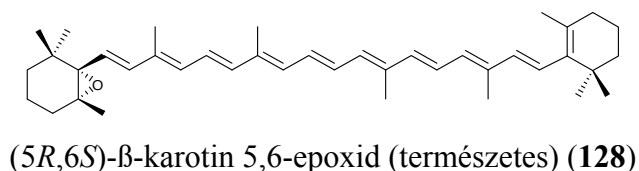
40. ábra. A. A (3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-(36) *anti,anti* és (3*S*,5*R*,6*S*,5'*S*,6'*R*)-(125) *anti,szűn* kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxidok HPLC-UV és HPLC-OR kromatogramjai (Chiralpak IA *n*-hexán/izopropanol 95:5).

B. A kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid diasztereomerek HPLC-ECD spektruma: (3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-(36) (fekete) és (3*S*,5*R*,6*S*,5'*S*,6'*R*)-(125) (piros) (*n*-hexán/izopropanol 95:5).

C. A (3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-(124) *szűn,szűn* és (3*S*,5*S*,6*R*,5'*R*,6'*S*)-(126) *szűn,anti* kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxidok HPLC-UV és HPLC-OR kromatogramjai (Chiralpak IA, *n*-hexán/izopropanol 95:5).

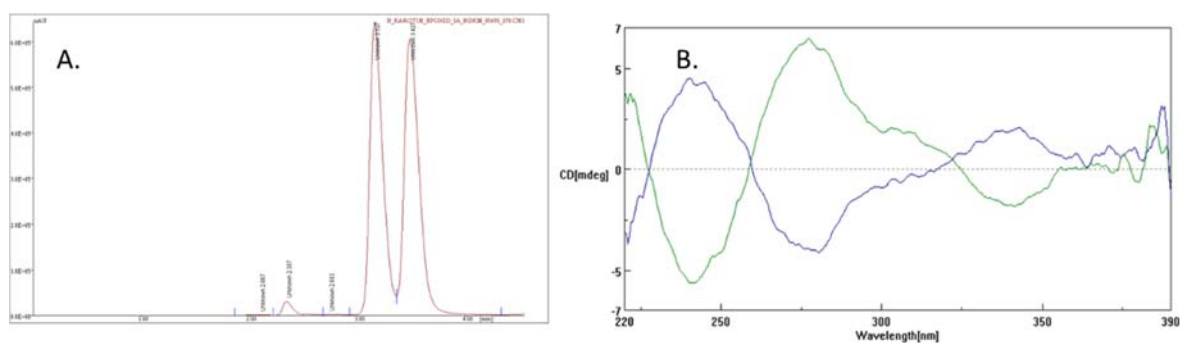
D. A kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid diasztereomerek HPLC-ECD spektruma: (3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-(124) (piros) és (3*S*,5*S*,6*R*,5'*R*,6'*S*)-(126) (fekete) (*n*-hexán/izopropanol 95:5).

Ugyancsak izoláltunk β -karotin-5,6-monoepoxidot (22) is mameyből. Az izolált komponenst a kísérő olajoktól nem sikerült teljes mértékben megtisztítani, így itt is szükségessé vált a szintetikus β -karotin-5,6-epoxid vizsgálata (41. ábra).



41. ábra. A β-karotin-5,6-epoxid diasztereomerek szerkezeti képlete.

A királis fázison végzett vizsgálatok itt is két csúcsot eredményeztek, melyek tükörképi CD görbét adtak (**42. ábra**).



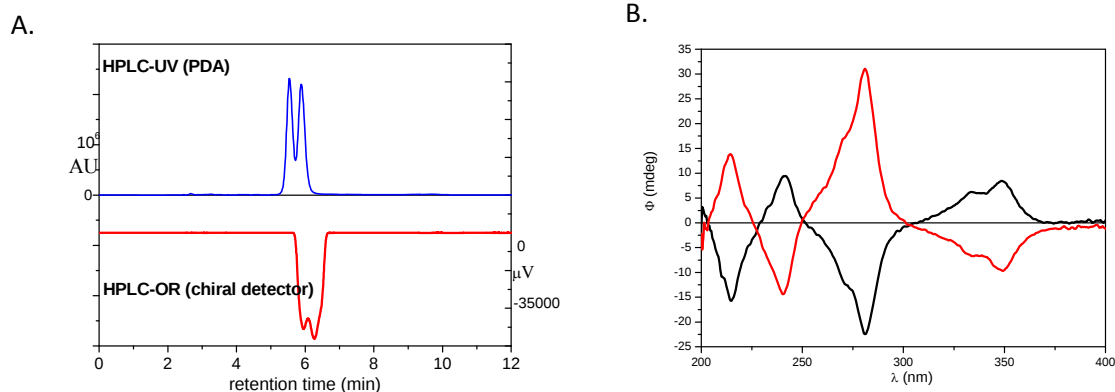
42. ábra. A. Az (5*R*,6*S*)- (**128**) és (5*S*,6*R*)-β-karotin-5,6-monoepoxid (**129**) HPLC-UV kromatogramja (Chiralpack IA, *n*-hexán/ diklórmétán 85:15).

B. Az (5*R*,6*S*)- (**128**) és (5*S*,6*R*)-β-karotin 5,6-monoepoxid (**129**) HPLC-CD spektruma (zöld az UV kromatogramon levő 1. csúcs és kék az UV-n levő 2. csúcs)

A abszolút konfiguráció meghatározását a korábban végzett mérések alapján végeztük el.⁹¹ A természetes forrásból izolált vegyületet összekromatografálva a félszintetikus keverékkel, azt tapasztaltuk, hogy a két oszlopon az elúciós sorrend itt is megváltozott (**6. táblázat**).

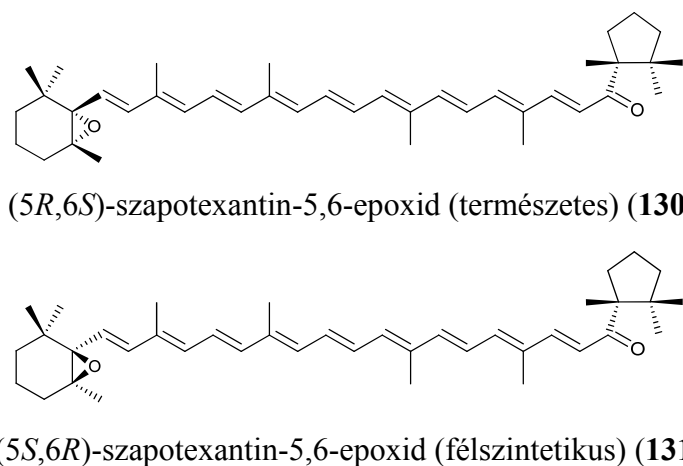
A korábban már említett szapotexantin 5,6-epoxidját is megtaláltuk a piros mamey extraktumában. A pontos szerkezetazonosításhoz itt is szükségessé vált a szapotexantin epoxidálása. Az epoxidálás során megkaptuk a szapotexantin 5,6-epoxid két diasztereomerjét (**44. ábra 130,131**), melyek csak királis oszlop segítségével választhatók el egymástól. Az ECD spektrumok alapján a negatív Cotton effektus itt is a természetes komponensre jellemző, így a félszintetikus komponensek HPLC-CD kromatogramja és ECD spektruma alapján (**43. ábra**)

az *5R,6S* konfigurációt rendeltük a természetes **(130)** vegyülethez és az *5S,6R* konfigurációt pedig a **(131)** vegyülethez.



43. ábra: A. Az (*5R,6S*)- **(130)** és (*5S,6R*) **(131)**-szapotexantin-5,6-epoxidok HPLC-UV és HPLC-OR kromatogramjai (Chiralpak IA, *n*-hexán/izopropanol 9:1).

B. A szapotexantin-5,6-epoxid diasztereomerek HPLC-ECD spektruma: (*5R,6S*)- **(130)** (fekete) és (*5S,6R*)- **(131)** (piros) (*n*-hexán/izopropanol 9:1).



44. ábra. A szapotexantin 5,6-epoxid diasztereomerek szerkezeti képlete.

6. táblázat. A királis vizsgálatoknál használt módszerek és retenciós idők, percben feltüntetve.

Karotinoid	Chiralcel OD 3 μ m MeOH/EtOH 50:50 MeCN/EtOH 50:50	Chiralcel OD 3 μ m n-hexán/EtOH 80:20
(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-kriptokapszin-5,6-epoxid (<i>anti</i>) (69)		31,00
(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-kriptokapszin-5,6-epoxid (<i>szűn</i>) (119)		43,10
(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-kriptokapszin-5,8-epoxid (120)		14,16
(5 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-kriptokapszin-5,8-epoxid (123)		19,02
(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-kriptokapszin-5,8-epoxid (121)		16,65
(5 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-kriptokapszin-5,8-epoxid (122)		17,24
(3 <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)- β -kriptoxantin-5',6'-epoxid (<i>anti</i>) (33)	6,55	
(3 <i>R</i> ,5' <i>S</i> ,6' <i>R</i>)- β -kriptoxantin-5',6'-epoxid (<i>szűn</i>) (127)	7,02	
(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)- β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (<i>anti,anti</i>) (36)	6,71	
(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,6' <i>R</i>)- β -kriptoxantin 5,6,5',6'-diepoxid (<i>anti,szűn</i>) (125)	7,34	
(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,5' <i>S</i> ,6' <i>R</i>)- β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (<i>szűn,szűn</i>) (124)	6,74	
(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)- β -kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (<i>szűn,anti</i>) (126)	7,23	
(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- β -karotin 5,6-epoxid (<i>anti</i>) (128)	8,82	
(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- β -karotin 5,6-epoxid (<i>szűn</i>) (129)	8,26	
(5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-szapotexantin-5,6-epoxid (<i>anti</i>) (130)	12,92	
(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-szapotexantin-5,6-epoxid (<i>szűn</i>) (131)	14,33	

VII. Összefoglalás

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

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

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

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

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

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

VIII. Irodalomjegyzék

1. Britton, G., UV/Visible Spectroscopy. In *Carotenoids*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995; Vol. 1B, pp 13-62.
2. Rodriguez-Amaya, D. B., *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. International Life Science Institute: Washington, D.C., 2001.
3. Schiedt, K.; Liaaen-Jensen, S., Isolation and Analysis. In *Carotenoids*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995; Vol. 1A, pp 81-107.
4. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Isolation and Analysis. In *Carotenoids*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995; Vol. 1A, pp 13-26.
5. Matus, Z.; Deli, J.; Szabolcs, J., Carotenoid composition of yellow pepper during ripening - isolation of β -cryptoxanthin 5,6-epoxide. *J Agr Food Chem* **1991**, *39*, 1907-1914.
6. Deli, J.; Matus, Z.; Szabolcs, J., Carotenoid composition in the fruits of Black paprika (*Capsicum annuum* Variety *Longum nigrum*) during ripening. *J Agr Food Chem* **1992**, *40*, 2072-2076.
7. Deli, J.; Matus, Z.; Tóth, G., Carotenoid composition in the fruits of *Capsicum annuum* cv. Szentesi Kosszarvú during ripening. *J Agr Food Chem* **1996**, *44*, 711-716.
8. Deli, J.; Tóth, G., Carotenoid composition of the fruits of *Capsicum annuum* cv. Bovet 4 during ripening. *Z Lebensm Unters F A* **1997**, *205*, 388-391.
9. 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. *J Agr Food Chem* **2001**, *49*, 1517-1523.
10. Horváth, G.; Molnár, P.; Farkas, A.; Szabó, L. G.; Tureci, E.; Deli, J., Separation and identification of carotenoids in flowers of *Chelidonium majus* L. and inflorescences of *Solidago canadensis* L. *Chromatographia* **2010**, *71*, S103-S108.
11. Alvarez, R.; Vaz, B.; Gronemeyer, H.; de Lera, A. R., Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chem Rev* **2014**, *114*, 1-125.
12. Rao, A. V.; Rao, L. G., Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* **2007**, *55*, 207-216.
13. Palozza, P.; Serini, S.; Di Nicuolo, F.; Calviello, G., Modulation of apoptotic signalling by carotenoids in cancer cells. *Arch Biochem Biophys* **2004**, *430*, 104-109.
14. Rao, A. V.; Agarwal, S., Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr Res* **1999**, *19*, 305-323.

15. Kritchevsky, S. B., Beta-carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *J Nutr* **1999**, *129*, 5-8.
16. Landrum, J. T.; Bone, R. A., Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys* **2001**, *385*, 28-40.
17. Krinsky, N. I.; Johnson, E. J., Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **2005**, *26*, 459-516.
18. Tinkler, J. H.; Truscott, T. G., Carotenoids protect against cell-membrane damage by the nitrogen-dioxide radical. *Nat Med* **1995**, *1*, 98-99.
19. Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H., Lycopene as the most effective biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* **1989**, *274*, 532-538.
20. Stewart, I.; Wheaton, T. A., Continuous flow separation of carotenoids by liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1971**, *55*, 325-336.
21. Nelis, H. J. C. F.; Vansteenberge, M. M. Z.; Lefevere, M. F.; Deleenheer, A. P., Selectivity effects in nonaqueous reversed-phase and normal-phase chromatography of geometric canthaxanthin isomers. *J Chromatogr* **1986**, *353*, 295-302.
22. Hashimoto, H.; Koyama, Y.; Shimamura, T., Isolation of *cis-trans* isomers of canthaxanthin by high-performance liquid-chromatography using a calcium hydroxide column and identification of their configurations by H-1-NMR spectroscopy. *J Chromatogr* **1988**, *448*, 182-187.
23. Koyama, Y.; Hosomi, M.; Miyata, A.; Hashimoto, H.; Reames, S. A.; Nagayama, K.; Katojippo, T.; Shimamura, T., Supplementary and revised assignment of the peaks of the 7,9-di-*cis*, 9,9'-di-*cis*, 13,13'-di-*cis*, 9,13'-di-*cis* and 9,9',13-tri-*cis* isomers of beta-carotene in high-performance liquid-chromatography using a column of calcium hydroxide. *J Chromatogr* **1988**, *439*, 417-422.
24. Khachik, F.; Beecher, G. R.; Goli, M. B., Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry* **1991**, *63*, 71-80.
25. Pfander, H.; Riesen, R.; Niggli, U., HPLC and SFC of carotenoids - scope and limitations. *Pure and Applied Chemistry* **1994**, *66*, 947-954.
26. Fekete, J., *Folyadékkromatográfia elmélete és gyakorlata*. Edison House Kft.: 2006.
27. Sander, L. C.; Wise, S. A., Effect of phase length on column selectivity for the separation of polycyclic aromatic-hydrocarbons by reversed-phase liquid-chromatography. *Anal Chem* **1987**, *59*, 2309-2313.

28. Craft, N. E., Carotenoid reversed-phase high-performance liquid-chromatography methods - Reference compendium. *Method Enzymol* **1992**, *213*, 185-205.
29. Quackenbush, F. W., Reverse phase HPLC separation of cis-carotenoids and trans-carotenoids and its application to beta-carotenes in food materials. *J Liq Chromatogr* **1987**, *10*, 643-653.
30. Bushway, R. J., Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* **1985**, *8*, 1527-1547.
31. Epler, K. S.; Sander, L. C.; Ziegler, R. G.; Wise, S. A.; Craft, N. E., Evaluation of reversed-phase liquid-chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *J Chromatogr* **1992**, *595*, 89-101.
32. Lesellier, E.; Marty, C.; Berset, C.; Tchaplal, A., Optimization of the isocratic non-aqueous reverse phase (narp) HPLC separation of trans *cis* alpha-carotenes and beta-carotenes. *Hrc-J High Res Chrom* **1989**, *12*, 447-454.
33. Sander, L. C.; Sharpless, K. E.; Craft, N. E.; Wise, S. A., Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Anal Chem* **1994**, *66*, 1667-1674.
34. Sander, L. C.; Glinka, C. J.; Wise, S. A., Determination of bonded phase thickness in liquid-chromatography by small-angle neutron-scattering. *Anal Chem* **1990**, *62*, 1099-1101.
35. Glinka, C. J.; Sander, L. C.; Wise, S. A.; Hunnicutt, M. L.; Lochmuller, C. H., Determination of pore accessibility in silica microparticles by small-angle neutron-scattering. *Anal Chem* **1985**, *57*, 2079-2084.
36. Wheeler, J. F.; Beck, T. L.; Klatte, S. J.; Cole, L. A.; Dorsey, J. G., Phase-transitions of reversed-phase stationary phases - Cause and effects in the mechanism of retention. *J Chromatogr A* **1993**, *656*, 317-333.
37. Pursch, M.; Strohschein, S.; Handel, H.; Albert, K., Temperature-dependent behavior of C-30 interphases. A solid-state NMR and LC-NMR study. *Anal Chem* **1996**, *68*, 386-393.
38. Albert, K.; Evers, B.; Bayer, E., NMR investigation of the dynamic behavior of alkyl-modified silica. *J Magn Reson* **1985**, *62*, 428-436.
39. Bohoyo-Gil, D.; Dominguez-Valhondo, D.; Garcia-Parra, J. J.; Gonzalez-Gomez, D., UHPLC as a suitable methodology for the analysis of carotenoids in food matrix. *Eur Food Res Technol* **2012**, *235*, 1055-1061.
40. Pham, V. H.; Hatcher, D. W., Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) quantification of carotenoids in durum wheat Influence of genotype and environment in relation to the colour of yellow alkaline noodles (YAN). *Food Chem* **2011**, *125*, 1510-1516.

41. Guzman, I.; Hamby, S.; Romero, J.; Bosland, P. W.; O'Connell, M. A., Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Sci* **2010**, *179*, 49-59.
42. Delpino-Rius, A.; Eras, J.; Marsol-Vall, A.; Vilaro, F.; Balcells, M.; Canela-Garayoa, R., Ultra performance liquid chromatography analysis to study the changes in the carotenoid profile of commercial monovarietal fruit juices. *J Chromatogr A* **2014**, *1331*, 90-99.
43. Bijttebier, S.; D'Hondt, E.; Noten, B.; Hermans, N.; Apers, S.; Voorspoels, S., Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening. *J Chromatogr A* **2014**, *1332*, 46-56.
44. Baranyai, M.; Matus, Z.; Szabolcs, J., Determination, by HPLC, of carotenoids in paprika products. *Acta Aliment Hung* **1982**, *11*, 309-323.
45. Matus, Z.; Baranyai, M.; Tóth, G.; Szabolcs, J., Identification of oxo, epoxy and some *cis*-carotenoids in High-Performance Liquid-Chromatography. *Chromatographia* **1981**, *14*, 337-340.
46. Parkes, K. E. B.; Pattenden, G.; Baranyai, M.; Molnár, P.; Szabolcs, J.; Tóth, G., Novel carotenoid 3,6-epoxides from red paprika, *Capsicum annuum*. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 2535-2538.
47. Murillo, E.; Nagy, V.; Agócs, A.; Deli, J., Carotenoids with kappa-end group. In *Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefits*, Yamaguchi, M., Ed. Nova Science Publishers, Inc.: United Kingdom, 2013; pp 49-77.
48. Molnár, P.; Deli, J.; Matus, Z.; Tóth, G.; Steck, A.; Pfander, H., Partial synthesis and characterization of the mono- and diepoxides of β -cryptoxanthin. *Helv Chim Acta* **1997**, *80*, 221-229.
49. Eugster, C. H., Isolation and Analysis. In *Carotenoids*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995; Vol. 1A, pp 71-80.
50. Zechmeister, L., *Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes* Springer: Vienna, 1962.
51. Turcsi, E.; Nagy, V.; Deli, J., Study on the elution order of carotenoids on endcapped C₁₈ and C₃₀ reverse silica stationary phases. A review of the database. In *Journal of Food Composition and Analysis*, **2016**; Vol. 47, pp 101-112.
52. Krinsky, N. I., A relationship between partition coefficients of carotenoids and their functional groups. *Analytical Biochemistry* **1963**, *6*, 293-302.
53. Zorn, H.; Breithaupt, D. E.; Takenberg, M.; Schwack, W.; Berger, R. G., Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika

(*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme Microb Tech* **2003**, *32*, 623-628.

54. Pott, I.; Breithaupt, D. E.; Carle, R., Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry* **2003**, *64*, 825-829.

55. Sander, L. C.; Sharpless, K. E.; Pursch, M., C-30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J Chromatogr A* **2000**, *880*, 189-202.

56. Vallverdu-Queralt, A.; Regueiro, J.; de Alvarenga, J. F. R.; Torrado, X.; Lamuela-Raventos, R. M., Carotenoid profile of tomato sauces: Effect of cooking time and content of extra virgin olive oil. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 9588-9599.

57. Deli, J.; Molnár, P., Paprika carotenoids: Analysis, isolation, structure elucidation. *Curr Org Chem* **2002**, *6*, 1197-1219.

58. Gulyás-Fekete, G.; Murillo, E.; Kurtán, T.; Papp, T.; Illyés, T. Z.; Drahos, L.; Visy, J.; Agócs, A.; Turcsi, E.; Deli, J., Cryptocapsinepoxide-type carotenoids from red mamey, *Pouteria sapota*. *J Nat Prod* **2013**, *76*, 607-614.

59. Murillo, E.; McLean, R.; Britton, G.; Agócs, A.; Nagy, V.; Deli, J., Sapotexanthin, an A-provitamin carotenoid from red mamey (*Pouteria sapota*). *J Nat Prod* **2011**, *74*, 283-285.

60. Nagy, V.; Agócs, A.; Deli, J., *In vitro* and *in vivo* transformations of lutein. *Mini-Rev Org Chem* **2009**, *6*, 211-219.

61. Märki-Fischer, E.; Eugster, C. H., Karpoxanthin and 6-epikarpoxanthin. *Helv Chim Acta* **1985**, *68*, 1704-1707.

62. 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*). *Helv Chim Acta* **1998**, *81*, 1233-1241.

63. 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* **1998**, *48*, 27-31.

64. Thompson, A. J.; Jackson, A. C.; Parker, R. A.; Morpeth, D. R.; Burbidge, A.; Taylor, I. B., Absciscic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and absciscic acid. *Plant Molecular Biology* **2000**, *42*, 833-845.

65. Kalala, M.; Cowan, A. K.; Molnár, P.; Tóth, G., (9Z)-Epoxy-carotenoid cleavage enzyme activity from the citrus cell-free system for ABA biosynthesis. *South African Journal of Botany* **2001**, *67*, 376-377.

66. Deli, J.; Ósz, E., Carotenoid 5,6-, 5,8- and 3,6-epoxides. *Arkivoc* **2004**, 150-168.

67. Yamamoto, H. Y.; Bugos, R. C.; Hieber, A. D., Biochemistry and molecular biology of the xanthophyll cycle. In *The photochemistry of carotenoids*, Frank, H. A.; Young, A. J.; Britton, G.; Cogdell, R. J., Eds. Academic Publishers: Dordrecht, 1999; pp 293-303.
68. Deli, J.; Molnár, P.; Ösz, E.; Tóth, G.; Zsila, F., Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2004**, *14*, 925-928.
69. Szabolcs, J., Plant carotenoids. In *Carotenoids Chemistry and Biology*, Krinsky, N. I.; Mathews-Roth, M. M.; Taylor, R. F., Eds. Plenum Press: New York, 1989; pp 39-58.
70. Melendez-Martínez, A. J.; Escudero-Gilete, M. L.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J., Separation of structural, geometrical and optical isomers of epoxycarotenoids using triacontyl-bonded stationary phases. *J Sep Sci* **2009**, *32*, 1838-1848.
71. Molnár, P.; Deli, J.; Matus, Z.; Tóth, G.; Steck, A.; Pfander, H., Isolation and characterization of mutatoxanthin-epimers from red paprika (*Capsicum annuum*). *Eur Food Res Technol* **2000**, *211*, 396-399.
72. Molnár, P.; Deli, J.; Matus, Z.; Tóth, G.; Steck, A.; Pfander, H., Partial synthesis and characterization of karpoxanthins and cucurbitaxanthin A epimers. *Helv Chim Acta* **1999**, *82*, 1994-2002.
73. Nguyen, M.; Francis, D.; Schwartz, S., Thermal isomerisation susceptibility of carotenoids in different tomato varieties. *J Sci Food Agr* **2001**, *81*, 910-917.
74. Matsuno, T.; Tani, Y.; Maoka, T.; Matsuo, K.; Komori, T., Isolation and structural elucidation of cucurbitaxanthin A and B from pumpkin *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2837-2840.
75. Szabó, L. G., *Gyógynövény-ismereti tájékoztató*. Schmidt und Co. – Melius Alalpítvány: Baksa – Pécs, 2005.
76. Szendrei, K.; Csupor, D., *Gyógynövénytár. Útmutató a korszerű gyógynövény-alkalmazáshoz*. Medicina Könyvkiadó: Budapest, 2009.
77. Turcsi, E.; Marton, K.; Oláh, P.; Deli, J., Investigation of the carotenoid composition of different kinds of fresh and cooked pumpkins (*Cucurbita maxima*). In *15th International Symposium on Carotenoids*, Okinawa, 2008; Vol. abstract, p 135.
78. Molnár, P.; Ösz, E.; Zsila, F.; Deli, J., Isolation and structure elucidation of anhydroluteins from cooked sorrel (*Rumex rugosus* CAMPD.). *Chem Biodivers* **2005**, *2*, 928-935.
79. Kurz, C.; Carle, R.; Schieber, A., HPLC-DAD-MSn characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem* **2008**, *110*, 522-530.

80. Turcsi, E.; Szabó, I.; Murillo, E.; Mosquera, Y.; Deli, J., Carotenoid Composition of Mamey fruit (*Pouteria sapota*). In *6th International Congress on Pigments in Food*, Budapest, 2010; Vol. proceedings, pp 289-292.
81. Deli, J.; Turcsi, E.; Szabó, I.; Mosquera, Y.; Murillo, E., Carotenoid composition of mamey fruit (*Pouteria sapota*). *Acta Biol Cracov Bot* **2001**, *53*, 55.
82. Deli, J.; Molnár, P.; Ösz, E.; Tóth, G., Capsoneoxanthin, a new carotenoid isolated from the fruits of *Asparagus falcatus*. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 8153-8155.
83. Turcsi, E.; Murillo, E.; Kurtán, T.; Szappanos, A.; Illyés, T. Z.; Gulyás-Fekete, G.; Agócs, A.; Avar, P.; Deli, J., Isolation of beta-cryptoxanthin-epoxides, precursors of cryptocapsin and 3'-deoxycapsanthin, from red mamey (*Pouteria sapota*). *J Agr Food Chem* **2015**, *63*, 6059-6065.
84. Dealmeida, L. B.; Penteadó, M. D. C.; Simpson, K. L.; Britton, G.; Acemoglu, M.; Eugster, C. H., Isolation and characterization of (5*R*,6*S*,5'*R*,8'*R*)-luteochrome and (5*R*,6*S*,5'*R*,8'*S*)-luteochrome from brazilian sweet-potatoes (*Ipomoea batatas* Lam). *Helv Chim Acta* **1986**, *69*, 1554-1558.
85. Almeida, L. B.; Penteadó, M. V. C., Carotenoids and pro-vitamin A value of white fleshed brazilian sweet potatoes (*Ipomoea batatas* Lam.). *J Food Compos Anal* **1988**, *1*, 341-352.
86. Bouvier, F.; Hugueney, P.; Dharlingue, A.; Kuntz, M.; Camara, B., Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts - isolation and molecular-cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J* **1994**, *6*, 45-54.
87. Deli, J.; Matus, Z.; Tóth, G., Carotenoid composition in the fruits of *Asparagus officinalis*. *J Agr Food Chem* **2000**, *48*, 2793-2796.
88. Deli, J.; Molnár, P.; Ösz, E.; Tóth, G., Analysis of carotenoids in the fruits of *Asparagus falcatus*; Isolation of 5,6-diepikarpoxanthin. *Chromatographia* **2000**, *51*, S183-S187.
89. Murillo, E.; Mosquera, Y.; Kurtán, T.; Gulyás-Fekete, G.; Nagy, V.; Deli, J., Isolation and characterization of novel capsorubin-like carotenoids from the red mamey (*Pouteria sapota*). *Helv Chim Acta* **2012**, *95*, 983-988.
90. Bartlett, L.; Klyne, W.; Mose, W. P.; Scopes, P. M.; Galasko, G.; Mallams, A. K.; Weedon, B. C. L.; Szabolcs, J.; Tóth, G., Optical rotatory dispersion of carotenoids. *Journal of The Chemical Society C* **1969**, 2527-2544.

91. Acemoglu, M.; Eugster, C. H., (5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-5,6,5',6'-Diepoxy- β,β -carotene - synthesis, spectroscopical and chiroptical properties, and HPLC-behaviour. *Helv Chim Acta* **1984**, *67*, 184-190.
92. Cholnoky, L.; Szabolcs, J.; Waight, E. S., The structure of lycoxanthin and lycophyll. *Tetrahedron Letters* **1968**, *16*, 1931-1933.
93. Molnár, P.; Deli, J.; Ösz, E.; Zsila, F.; Simonyi, M.; Tóth, G., Confirmation of the absolute (3*R*,3'*S*,6'*R*)-configuration of (all-*E*)-3'-epilutein. *Helv Chim Acta* **2004**, *87*, 2159-2168.
94. 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* **1994**, *48*, 102-104.
95. Deli, J.; Molnár, P.; Tóth, G.; Szabolcs, J.; Radics, L., Determination of the geometrical configuration of naturally-occurring mono-*cis*-lutein epoxides. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 547-549.
96. Deli, J.; Molnár, P.; Matus, Z.; Tóth, G.; Steck, A., Reisolation of carotenoid 3,6-epoxides from red paprika (*Capsicum annuum*). *Helv Chim Acta* **1996**, *79*, 1435-1443.
97. Molnár, P.; Deli, J.; Zsila, F.; Steck, A.; Pfander, H.; Tóth, G., Preparation and (*E/Z*)-isomerization of the diastereoisomers of violaxanthin. *Helv Chim Acta* **2004**, *87*, 11-27.
98. 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 -carotene-5,5'-diol), a novel carotenoid from red paprika (*Capsicum annuum*). *Helv Chim Acta* **1991**, *74*, 819-824.
99. Molnár, P.; Deli, J.; Ösz, E.; Tóth, G.; Zsila, F.; Herrero, C.; Landrum, J. T., Preparation and spectroscopic characterization of 3'-oxolutein. *Lett Org Chem* **2006**, *3*, 723-734.
100. 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* **1995**, *49*, 69-71.
101. Deli, J.; Molnár, P.; Matus, Z.; Tóth, G.; Steck, A.; Pfander, H., Partial synthesis and characterization of capsokarpoanthins and 3,6-epoxycapsanthins. *Helv Chim Acta* **1998**, *81*, 1242-1253.
102. Deli, J.; Ösz, E.; Visy, J.; Zsila, F.; Simonyi, M.; Tóth, G., Stereoselective reduction of 'capsanthol-3'-ones' (=3,6'-dihydroxy- β,κ -caroten-3'-ones) by complex hydrides. *Helv Chim Acta* **2001**, *84*, 263-270.

103. Deli, J.; Ósz, E.; Molnár, P.; Zsila, F.; Simonyi, M.; Tóth, G., Reduction of capsorubin and cryptocapsin. *Helv Chim Acta* **2001**, *84*, 3810-3817.

IX. Függelék

9.1. Táblázat: C₁₈ és C₃₀-as állófázisokon mért retenciós idők (Kísérleti rész **2. táblázat, I. és II. módszer**)

a. standard módszerrel izolált; b. CaroteNature GmbH (Svájc) készletéből kapott; c. a megfelelő oxovegyületből redukálással nyert; d. a megfelelő vegyületben az 5,6-os helyzetű kettős kötés epoxidálásával nyert; e. a megfelelő 5,6-epoxid savas kezelésével nyert; f. az abszolút konfigurációt nem határoztuk meg.

A referencia oszlopban található számok az irodalomjegyzék referenciáit jelölik.

Szám	Karotinoid	I. módszer C ₁₈ R _t (perc)	elnyelési maximum λ (nm)	II. módszer C ₃₀ R _t (perc)	elnyelési maximum λ (nm)	Referencia
	<i>Szénhidrogének</i>					
1	β-karotin	39,30	452, 477	37,30	450, 476	a
2	α- karotin	38,90	445, 473	33,50	445, 472	b
3	ε- karotin	38,50	416, 439, 468	29,60	415, 439, 468	b
4	γ- karotin	38,40	461, 490	55,00	460, 489	b
5	β-zeakarotin	38,90	428, 452	40,10	426, 452	b
6	δ- karotin	37,90	431, 455, 486	50,50	430, 455, 486	b
7	likopin	37,50	445, 471, 502	73,10	445, 471, 502	b
8	ζ- karotin	38,50	380, 400, 424	41,90	380, 400, 424	b
9	torulin	38,39	461, 485, 518	72,14	461, 485, 518	b
	<i>Hidroxikarotinoidok</i>					

10	β-kriptoxantin	32,90	450, 476	25,80	450, 476	a
11	α-kriptoxantin	32,50	444, 472	22,30	441, 472	a
12	(rac)-4-hidroxi-β-karotin	33,23	450, 476	23,58	450, 476	c
13	likoxantin	32,99	445, 470, 501	62,43	445, 471, 502	⁹²
14	lutein	21,80	443, 471	14,50	443, 471	⁹³
15	3'-epilutein	23,50	443, 471	13,91	444, 471	⁹³
16	zeaxantin	22,00	449, 475	16,90	450, 475	a
17	(rac)-4,4'-dihidroxi-β-karotin	23,50	448, 475	14,10	449, 475	c
18	nigroxantin	23,90	442, 471	14,20	443, 471	⁹⁴
19	karpoxantin	9,90	444, 471	7,40	422, 443, 472	⁷²
20	6-epikarpoxantin	10,90	444, 471	7,80	444, 472	^{62, 72}
21	5,6-dieikarpoxantin	12,10	444, 471	8,00	444, 472	⁶²
	<i>Epoxikarotinoidok</i>					
22	β-karotin-5,6-epoxid	36,00	446, 472	26,10	445, 472	d
23	α-karotin-5,6-epoxid	35,70	418, 441, 468	22,50	416, 439, 468	d
24	β-karotin-5,8-epoxid	35,99	427, 452	29,03	427, 452	e
25	β-karotin-5,6,5',6'-diepoxid	32,10	415, 438, 468	16,30	415, 438, 468	d
26	β-karotin-5,6,5',8'-diepoxid	31,61	398, 420, 447	17,98	398, 421, 448	e
27	β-karotin-5,8,5',8'-diepoxid I	31,55	380, 400, 424	20,49	381, 401, 425	e, f
28	β-karotin-5,8,5',8'-diepoxid II	31,80	380, 400, 424	21,33	380, 400, 425	e, f
29	15-dehidro-β-karotin-5,6-epoxid	35,10	423, 450	28,84	424, 450	d
30	15,15'-dehidro-β-karotin-5,6,5',6'-epoxid	30,70	420, 446	19,49	420, 447	d

31	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-β-kriptoxantin-5,6-epoxid (<i>anti</i>)	31,12	444, 471	18,78	445, 471	48, 83
32	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-β-kriptoxantin-5,6-epoxid (<i>szün</i>)	30,72	443, 472	18,37	445, 471	48
33	(3 <i>S</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)-β-kriptoxantin-5',6'-epoxid	27,33	443, 471	15,85	444, 472	48, 83
34	β-kriptoxantin-5,8-epoxid	31,19	427, 452	21,79	427, 452	e
35	β-kriptoxantin-5',8'-epoxid	27,2	425, 450	18,47	427, 451	e
36	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)-β-kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid	24,75	415, 438, 468	11,12	415, 438, 468	d
37	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-anteraxantin (<i>anti</i>)	17,60	443, 471	11,80	444, 471	72
38	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-anteraxantin (<i>szün</i>)	16,60	443, 471	11,30	444, 472	72
39	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i>)-mutatoxantin	19,12	426, 451	13,88	426, 452	71, 72
40	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-mutatoxantin	20,06	426, 451	14,98	426, 452	71, 72
41	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-mutatoxantin	16,44	426, 451	11,19	426, 452	e
42	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-mutatoxantin	18,94	426, 451	13,62	426, 452	e
43	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-lutein-5,6-epoxid (<i>anti</i>)	17,50	414, 437, 467	9,80	415, 438, 467	95
44	krizantémaxantin	19,30	397, 420, 446	12,50	397, 420, 446	e
45	flavoxantin	18,90	397, 420, 446	11,80	397,420,446	e
46	kukurbitaxantin A	20,30	443, 471	11,50	424, 444, 472	96
47	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,3' <i>S</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)-violaxantin (<i>anti</i> , <i>anti</i>)	12,80	415, 438, 467	8,20	415, 438, 468	97
48	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,3' <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,6' <i>R</i>)-violaxantin (<i>szün</i> , <i>szün</i>)	10,90	415, 438, 467	7,40	415, 438, 468	97
49	cikloviolaxantin	16,82	415, 438, 467	7,85	415, 438, 468	96, 98
50	luteoxantin I	14,46	398, 420, 447	9,65	398, 421, 447	e, f
51	luteoxantin II	14,83	398, 420, 447			e, f
52	auroxantin I	15,24	380, 400, 425	11,09	380, 400, 425	e, f

53	auroxantin II	15,79	379, 400, 424	11,09	380, 400, 425	e, f
54	auroxatin III	17,40	380, 400, 425	13,38	380, 400, 425	e, f
55	(all- <i>E</i>)-neoxantin	9,82	416, 440, 468	7,29	415, 440, 468	a
56	(9' <i>Z</i>)-neoxantin	11,70	412, 435, 463	9,10	412, 435, 463	a
57	fukoxantin	9,08	449	4,82	448	b
58	fukoxantol	4,56	457	4,82	457	b
	<i>Ketokarotinoidok</i>					
59	echinenon	34,10	464	27,00	464	b
60	(<i>rac</i>)-3-hidroxi-echinenon	31,70	465	23,30	468	b
61	(<i>rac</i>)-4'-hidroxi-echinenon	25,92	460	16,60	460	c
62	3'-oxolutein	21,90	444, 472	12,80	444, 472	⁹⁹
63	kantaxantin	25,90	475	18,30	475	b
64	ϵ,ϵ -karotin-3,3'-dion	20,20	416, 440, 469	9,20	416, 440, 469	b
65	asztaxantin	15,20	477	12,40	478	b
	<i>Keto-κ-karotinoidok</i>					
66	szapotexantin	35,21	472	30,68	473	⁵⁹
67	kriptokapszin	30,22	474	23,53	473	⁸³
68	3'-dezoxikapszantin	26,42	469	20,56	469	⁸³
69	kriptokapszin-5,6-epoxid	23,50	466	14,20	466	⁵⁸
70	kriptokapszin-5,8-epoxid	23,15	450	16,09	450	⁵⁸
71	kapszantin	15,80	474	15,50	474	a
72	kapszanton	16,70	481	15,90	479	¹⁰⁰
73	kapszantin-5,6-epoxid (<i>anti</i>)	11,30	467	10,30	466	¹⁰¹

74	kapszantin-5,6-epoxid (szün)	10,41	466	9,79	466	101
75	kapszorubin	9,70	484	14,14	481	a
76	5,6-diepikapszokarpoxantin	5,70	471	7,10	468	62
77	3'-deoxikapszorubin	21,87	482	18,96	480	89
	Redukált κ-karotinoidok					
78	(6'R)-kapszantol	10,70	420, 444, 470	8,20	443, 471	102
79	(6'S)-kapszantol	13,80	443, 471	9,00	443, 471	102
80	(6'R/S)-szapotexantol	33,46	444, 471	20,96	444, 471	c, f
81	(6'S/R)-szapotexantol	34,12	444, 471	24,85	444, 471	c, f
82	(6'R)-kriptokapszol	26,26	442, 470	13,24	444, 471	103
83	(6'S)-kriptokapszol	28,48	442, 470	13,99	444, 471	103
84	(6'R/S)-3'-deoxikapszantol	24,05	442, 470	12,54	443, 471	c, f
85	(6'S/R)-3'-deoxikapsantol	25,25	442, 470	15,69	443, 471	c, f
86	(6'R/S)-kapszantol-5,6-epoxid (<i>anti</i>)	9,78	415, 437, 467	6,27	414, 437, 467	c, f
87	(6'S/R)-kapszantol-5,6-epoxid (<i>anti</i>)	7,03	414, 437, 467	5,53	414, 437, 467	c, f
88	(6'R/S)-kapszantol-5,6-epoxid (szün)	8,61	414, 437, 467	5,76	414, 437, 467	c, f
89	(6'S/R)-kapszantol-5,6-epoxid (szün)	6,52	414, 437, 467	5,52	414, 437, 467	c, f
90	(6R/S,6'R/S)-3'-deoxikapszorubol	13,08	413, 437, 466	6,15	413, 437, 466	c, f
91	(6R/S,6'S/R)-3'-deoxikapszorubol	15,25	412, 436, 465	8,27	413, 437, 466	c, f
92	(6S/R,6'R/S)-3'-deoxikapszorubol	17,61	416, 437, 466	7,33	414, 437, 466	c, f
93	(6S/R,6'S/R)-3'-deoxikapszorubol	18,14	416, 436, 466	8,27	413, 437, 466	c, f
94	(6R/S)-3'-deoxikapszorubol-6'-on	18,92	467	14,61	465	c, f
95	(6S/R)-3'-deoxikapszorubol-6'-on	16,58	466	10,65	465	c, f

96	(6'R/S)-3'-dezoxikapszorubol-6-on	20,15	467	11,09	465	c, f
97	(6'S/R)-3'-dezoxikapszorubol-6-on	20,55	467	11,09	465	c, f
98	(6R,6'R)-kapszorubol	3,66	413, 436, 466	4,48	413, 436, 466	¹⁰³
99	(6R,6'S)-kapszorubol	4,99	414, 436, 466	4,51	413, 437, 466	¹⁰³
100	(6S,6'S)-kapszorubol	4,94	414, 437, 466	4,49	414, 437, 466	¹⁰³

9.2. Táblázat: Néhány karotinoid össz-*transz* és *cisz* izomerjének retenciós ideje C₁₈ és C₃₀-as állófázisokon.

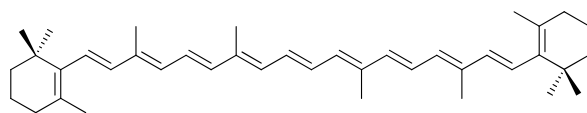
Minden vegyület az **5. Kísérleti rész** Félszintetikus karotinoidok előállítása című részben leírtak alapján, izomerizációval készült.

Karotinoid	Retenciós idő											
	C ₁₈						C ₃₀					
	(all <i>E</i>)	(9 <i>Z</i>)/(9' <i>Z</i>)	(9' <i>Z</i>)/(9 <i>Z</i>)	(13 <i>Z</i>)/(13' <i>Z</i>)	(13' <i>Z</i>)/(13 <i>Z</i>)	(15 <i>Z</i>)	(all <i>E</i>)	(9 <i>Z</i>)/(9' <i>Z</i>)	(9' <i>Z</i>)/(9 <i>Z</i>)	(13 <i>Z</i>)/(13' <i>Z</i>)	(13' <i>Z</i>)/(13 <i>Z</i>)	(15 <i>Z</i>)
β-karotin (1)	39,30	39,80				40,10	37,30	39,60		31,60		29,80
α-karotin (2)	38,90					-	33,50	34,80	37,90	27,70	29,10	-
β-kriptoxantin (10)	32,90	33,70		33,50		-	25,80	29,73	30,80	21,50	21,80	-
α-kriptoxantin (11)	32,50	33,30		33,10		-	22,30	26,10	28,50	18,80	19,80	-
lutein (14)	21,80	25,70		26,30		26,70	14,50	18,20	21,10	12,30	13,30	9,43
zeaxantin (16)	22,00	26,20		26,90		27,20	16,90	22,40		14,80		13,57
anteraxantin (37)	17,60	22,80	23,20	23,80		-	11,80	15,40	18,50	10,00	10,66	-
kukurbitaxantin A (46)	20,30	21,58				-	11,50	13,30	15,93	9,58	10,83	-
violaxantin (47)	12,80	18,20		19,50		-	8,20	12,10		8,20		-
cikloviolaxantin (49)	16,82	15,02		15,53		-	7,85	9,33		6,98		-
echinenon (59)	34,10					-	27,00	29,05	29,50	21,77	23,63	-
kantaxantin (63)	25,90	27,36		27,07		-	18,30	21,24		15,25		-
kriptokapszin (67)	30,20					-	23,50	25,10		16,80	18,10	-
kapszantin (71)	15,80	21,50		22,20		-	15,50	17,90	18,70	12,50		-
kapszorubin (75)	9,70	14,10		14,70		-	14,00	15,20		10,77		-

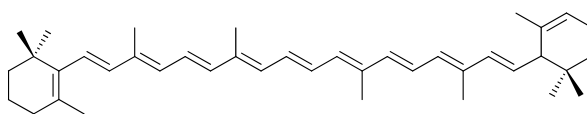
9.3. Szerkezetek

Karotinoid szerkezeti képletek

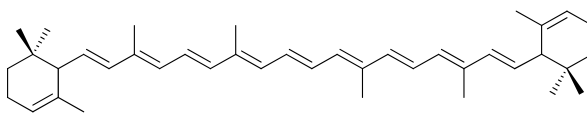
Szénhidrogén karotinoidok



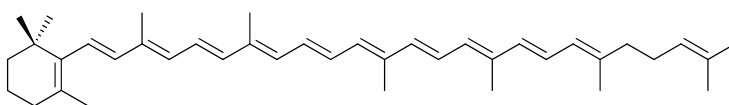
β -karotin (1)



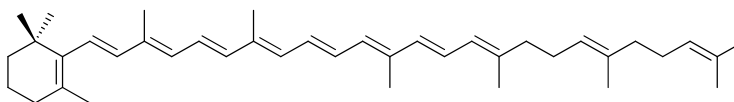
α -karotin (2)



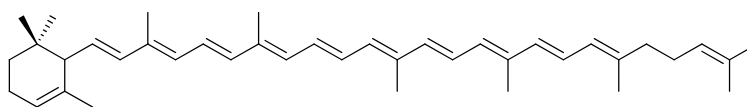
ϵ -karotin (3)



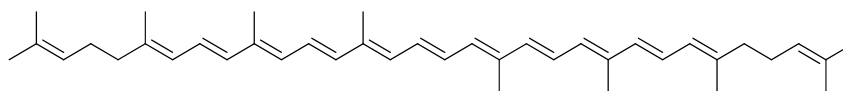
γ -karotin (4)



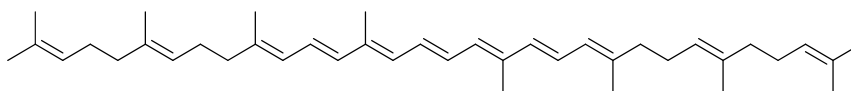
β -zeakarotin (5)



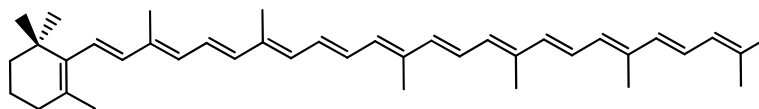
δ -karotin (6)



likopin (7)

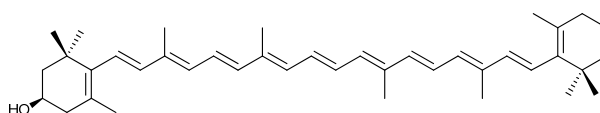


ζ -karotin (8)

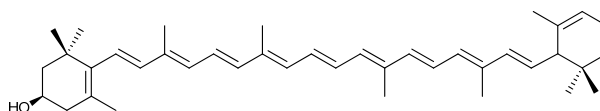


torulin (9)

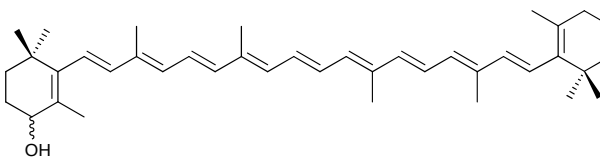
Hidroksikarotinoidok



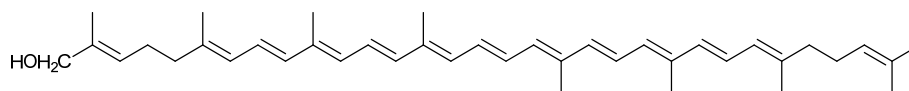
β -kriptoxantin (10)



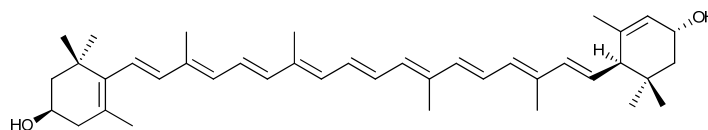
α - kriptoxantin (11)



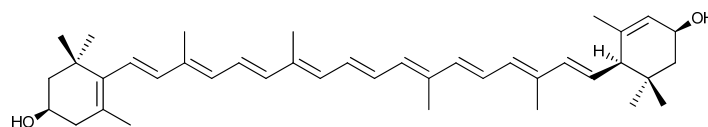
(rac)-4-hidroxi- β -karotin (12)



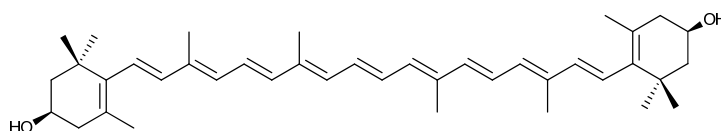
likoxantin (13)



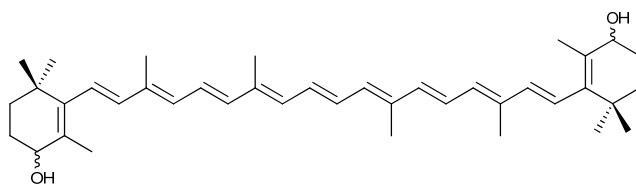
lutein (14)



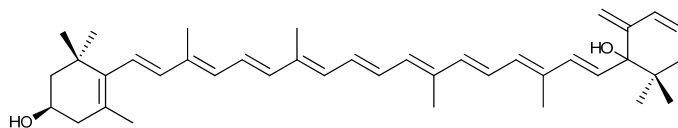
3'-epilutein (15)



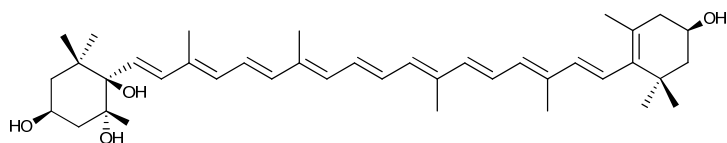
zeaxantin (16)



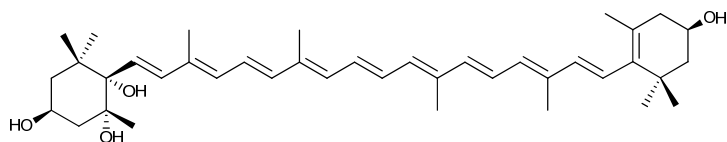
(*rac*)-4,4'-dihidroxi- β -karotin (**17**)



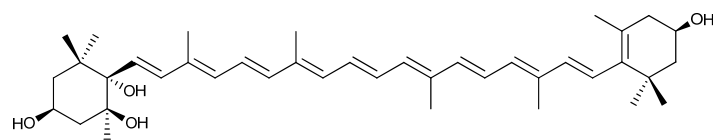
nigroxantin (**18**)



karpoxantin (**19**)

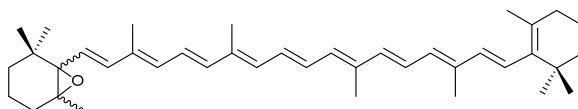


6-epikarpoxantin (**20**)

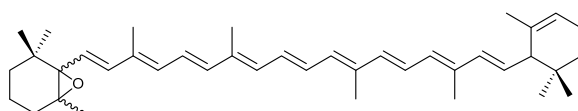


5,6-diepikarpoxantin (**21**)

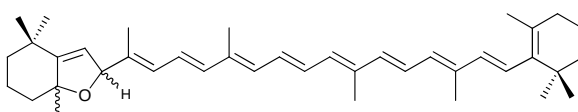
Epoxikarotinoidok



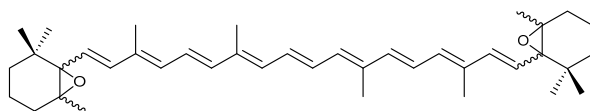
β -karotin-5,6-epoxid (**22**)



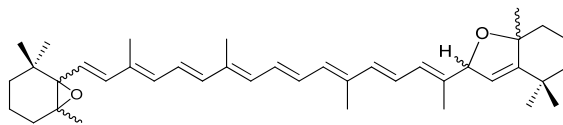
α -karotin-5,6-epoxid (**23**)



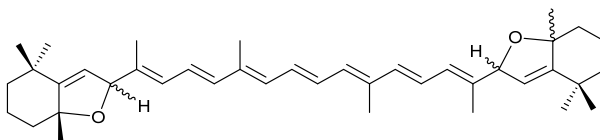
β -karotin-5,8-epoxid (**24**)



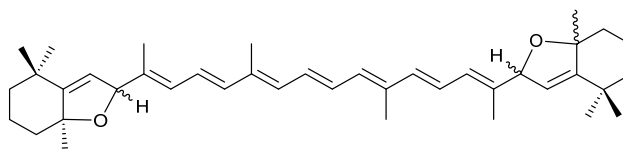
β - karotin-5,6,5',6'-diepoxid (25)



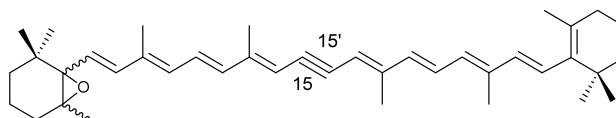
β - karotin-5,6,5',8'-diepoxid (26)



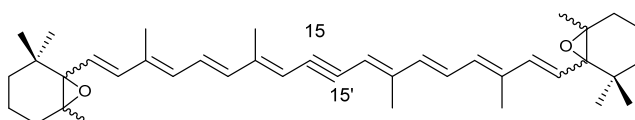
β - karotin-5,8,5',8'-diepoxid I (27)



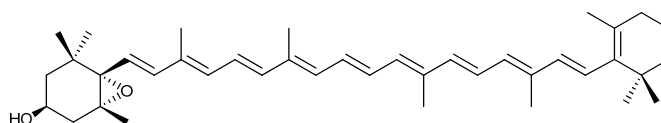
β - karotin-5,8,5',8'-diepoxid II (28)



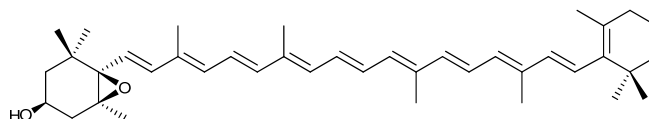
15-dehidro- β - karotin-5,6-epoxid (29)



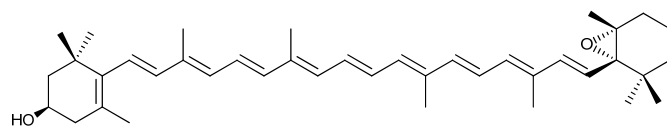
15,15'-dehidro- β - karotin-5,6,5',6'-diepoxid (30)



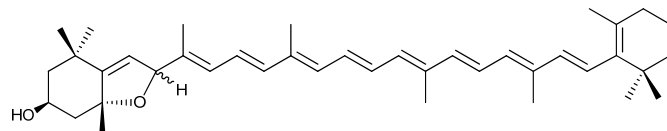
(3*S*,5*R*,6*S*)- β -kriptoxantin-5,6-epoxid (*anti*) (31)



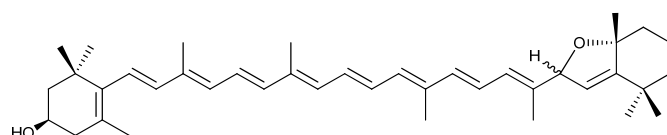
(3*S*,5*S*,6*R*)- β - kriptoxantin-5,6-epoxid (*szűn*) (32)



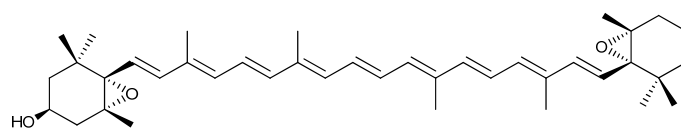
(3*R*,5'*R*,6'*S*)-β- kryptoxantin -5',6'-epoxid (**33**)



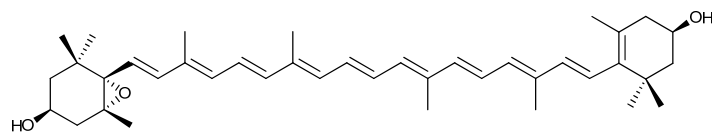
β- kryptoxantin -5,8-epoxid (**34**)



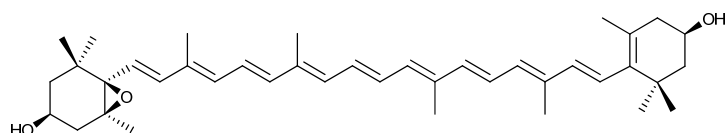
β- kryptoxantin -5',8'-epoxid (**35**)



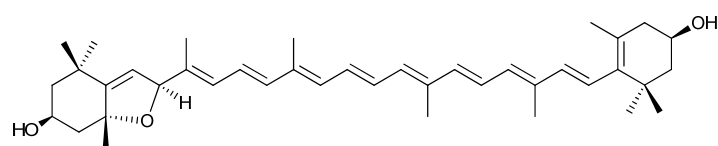
(3*S*,5*R*,6*S*,5'*R*,6'*S*)-β- kryptoxantin -5,6,5',6'-diepoxid (**36**)



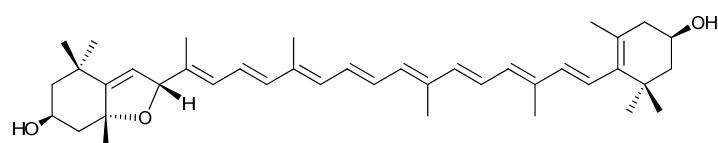
(3*S*,5*R*,6*S*)-anteraxantin (*anti*) (**37**)



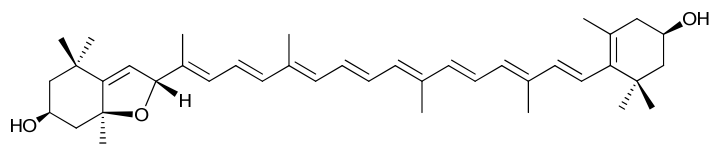
(3*S*,5*S*,6*R*)-anteraxantin (*szün*) (**38**)



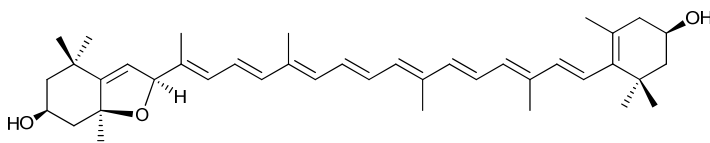
(3*S*,5*R*,8*S*)-mutatoxantin (**39**)



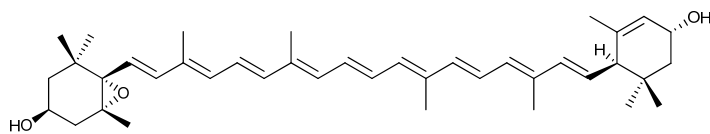
(3*S*,5*R*,8*R*)- mutatoxantin (**40**)



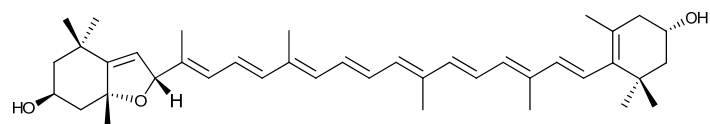
(3S,5S,8R)- mutatoxantin (**41**)



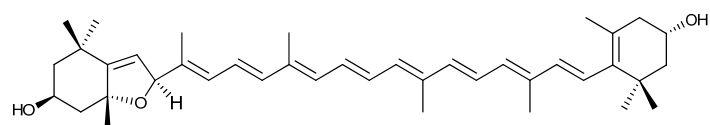
(3S,5S,8S)- mutatoxantin (**42**)



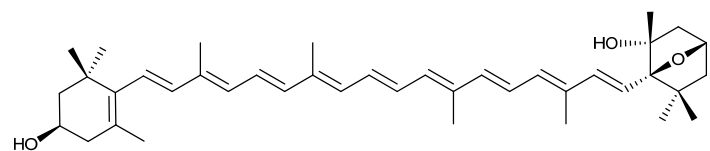
(3S,5R,6S)-lutein-5,6-epoxid (*anti*) (**43**)



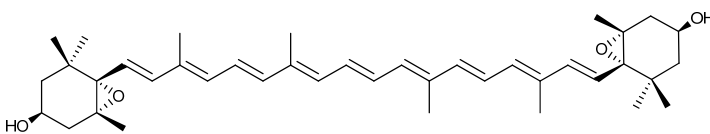
krizantémoxantin (**44**)



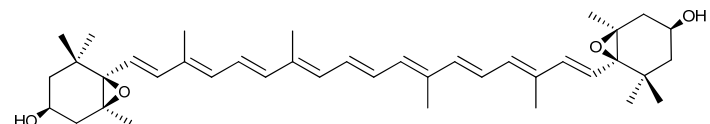
flavoxantin (**45**)



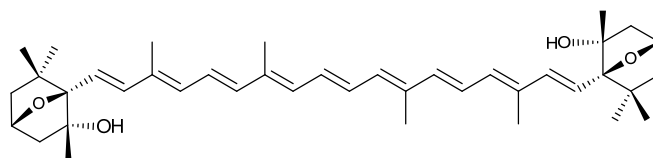
kukurbitaxantin A (**46**)



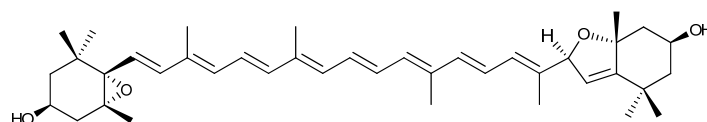
(3S,5R,6S,3'S,5'R,6'S)-violaxantin (*anti,anti*) (**47**)



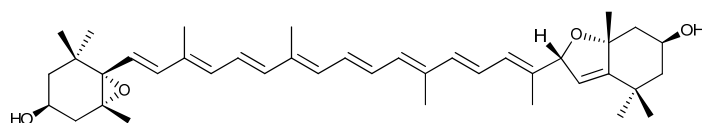
(3S,5S,6R,3'S,5'S,6'R)- violaxantin (*szűn,szűn*) (**48**)



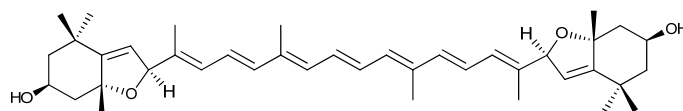
cikloviolaxantin (49)



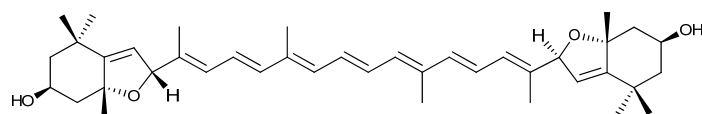
luteoxantin I (50)



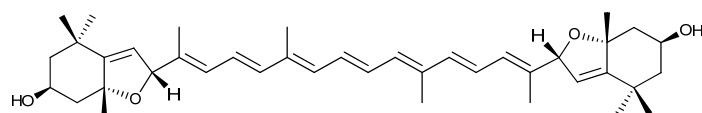
luteoxantin II (51)



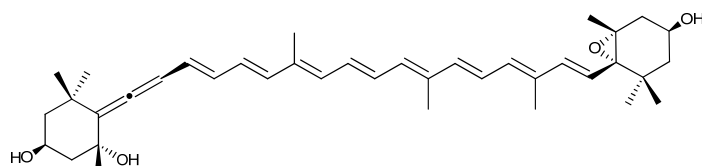
auroxantin I (52)



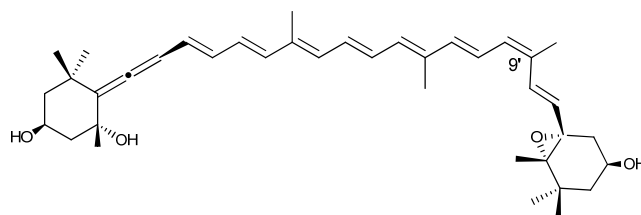
auroxantin II (53)



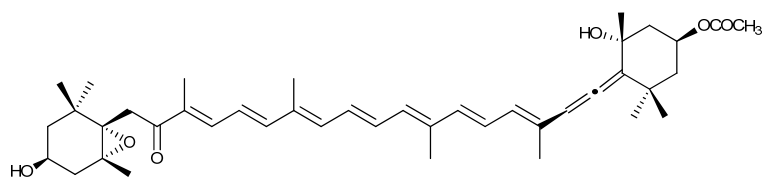
auroxantin III (54)



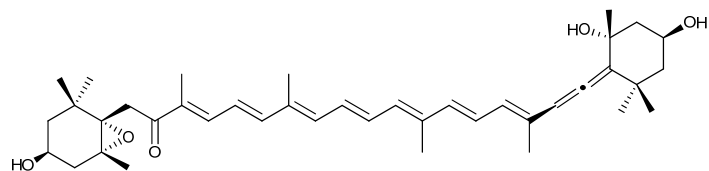
(all-*E*)-neoxantin (55)



(9'*Z*)- neoxantin (56)

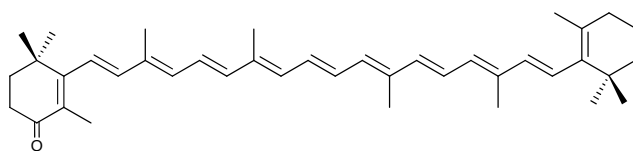


fukoxantin (57)

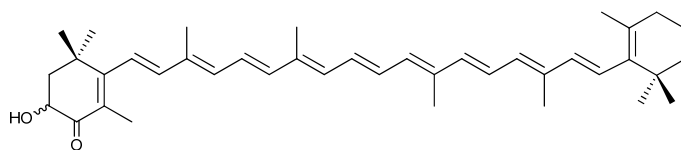


fukoxantol (58)

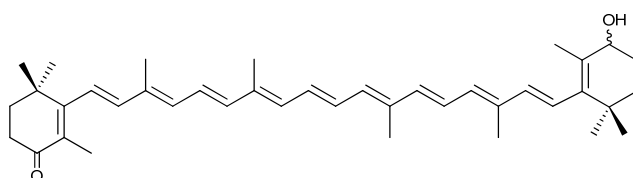
Ketokarotinoidok



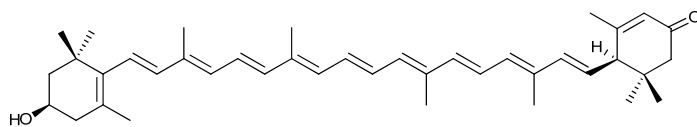
echinenon (59)



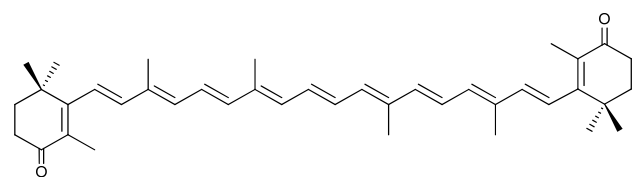
(rac)-3-hidroxi-echinenon (60)



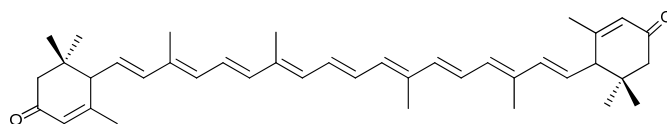
(rac)-4'-hidroxi-echinenon (61)



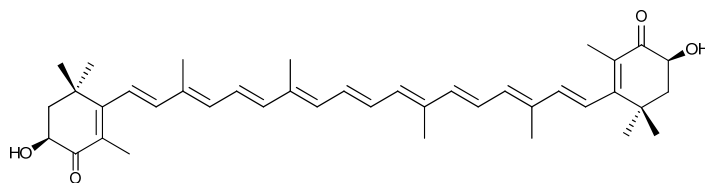
3'-oxolutein (62)



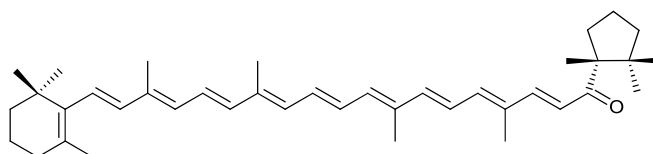
kantaxantin (63)



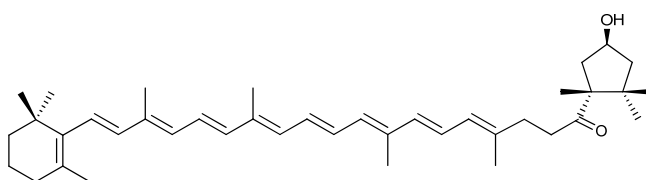
ϵ,ϵ -karotin-3,3'-dion (64)



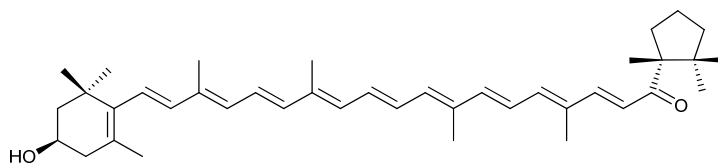
asztaxantin (65)



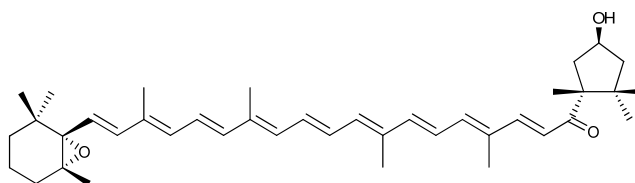
szapotexantin (66)



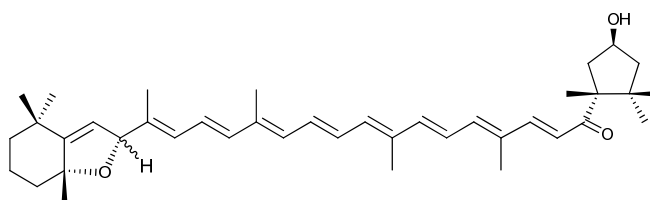
kriptokapszin (67)



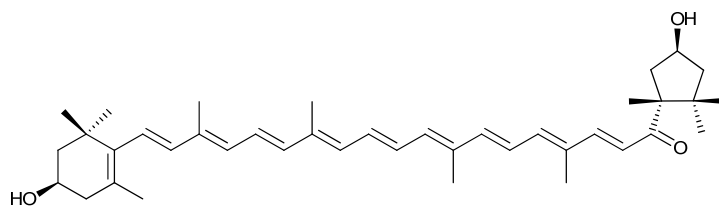
3'-dezokikapszantin (68)



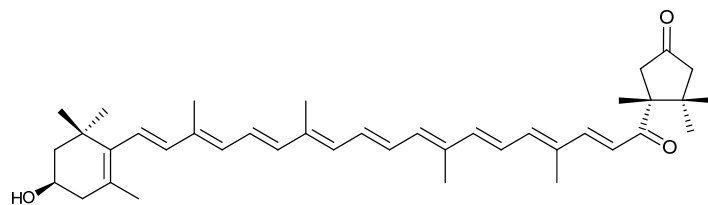
kriptokapszin-5,6-epoxid (69)



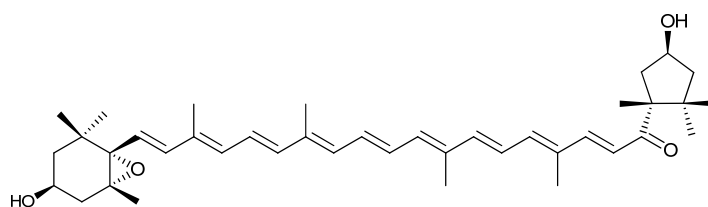
kriptokapszin-5,8-epoxid (70)



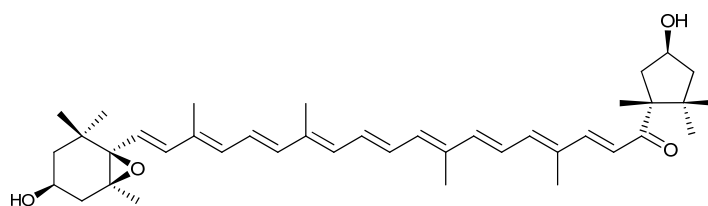
kapszantin (**71**)



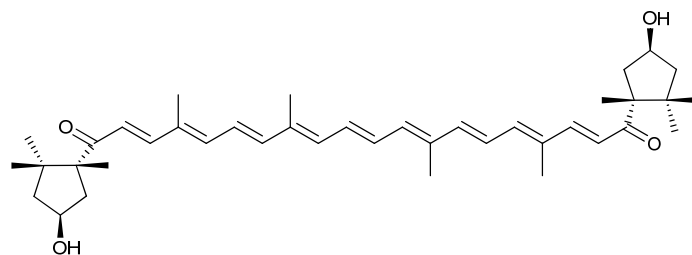
kapszanton (**72**)



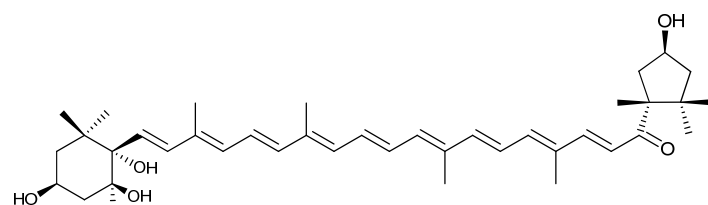
(3*S*,5*R*,6*S*)- kapszantin-5,6-epoxid (*anti*) (**73**)



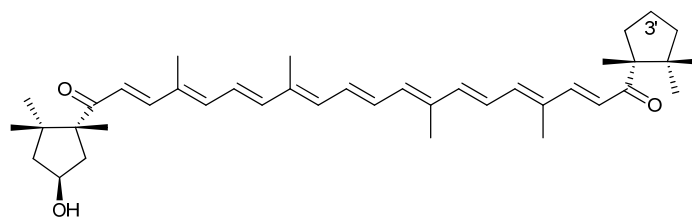
(3*S*,5*S*,6*R*)- kapszantin-5,6-epoxid (*syn*) (**74**)



kapszorubin (**75**)

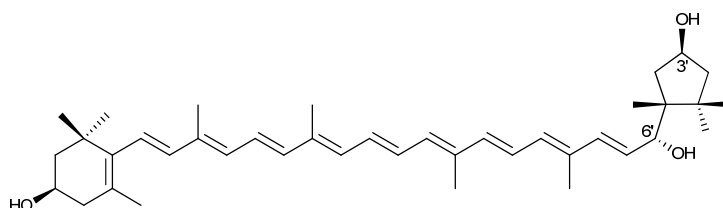


5,6-diepikapszokarpoxantin (**76**)

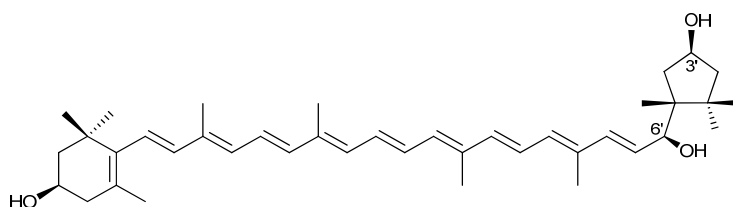


3'-dezoxikapszorubin (**77**)

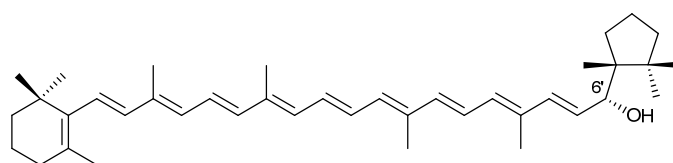
Redukált κ karotinoidok



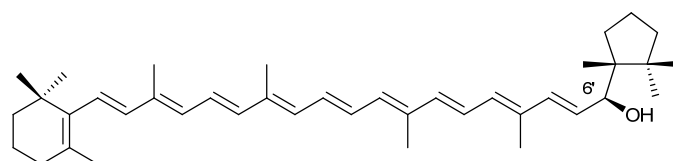
(6'*R*)-kapszantol (**78**)



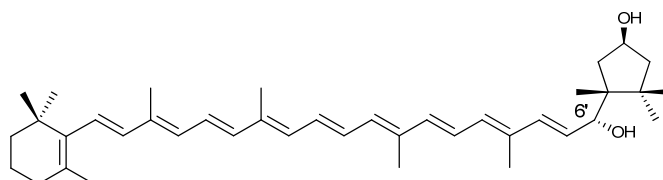
(6'*S*)-kapszantol (**79**)



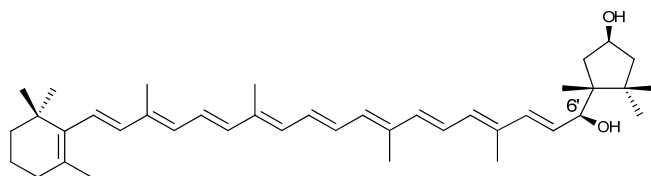
(6'*R*)-szapotexantol (**80**)



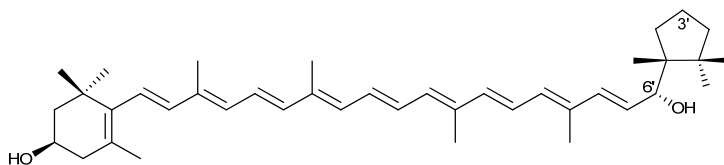
(6'*S*)-szapotexantol (**81**)



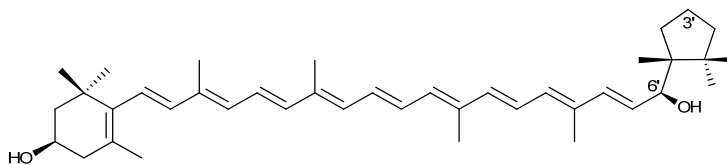
(6'*R*)-kriptokapszol (**82**)



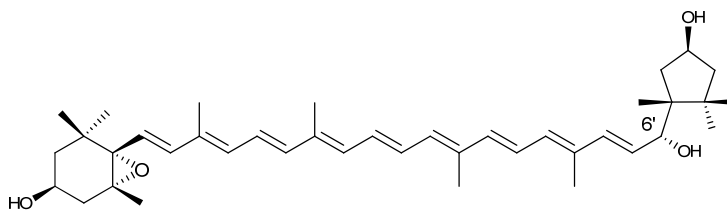
(6'*S*)-kriptokapszol (**83**)



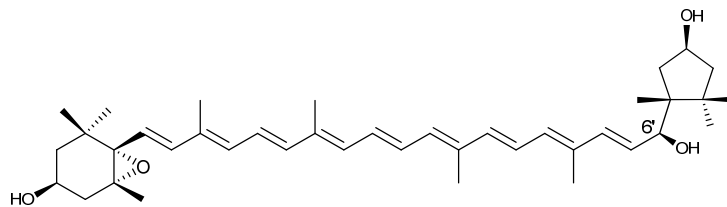
(6'*R*)-3'-dezoxikapszantol (**84**)



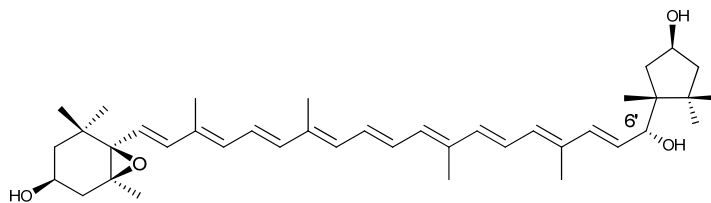
(6'*S*)-3'-dezoxikapszantol (**85**)



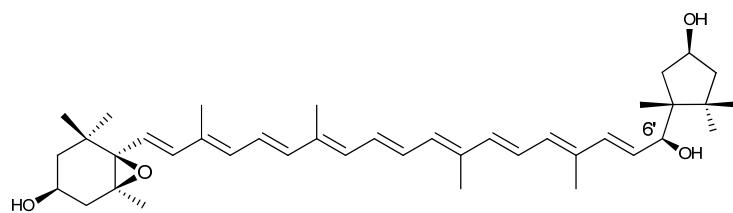
(3*S*,5*R*,6*S*,6'*R*)-kapszantol-5,6-epoxid (*anti*) (**86**)



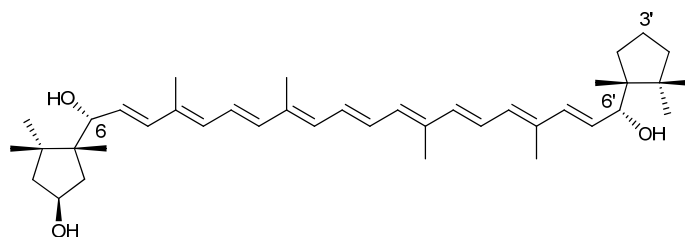
(3*S*,5*R*,6*S*,6'*S*)-kapszantol-5,6-epoxid (*anti*) (**87**)



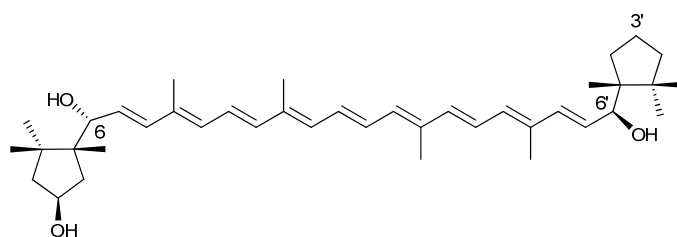
(3*S*,5*S*,6*R*,6'*R*)-kapszantol-5,6-epoxid (*syn*) (**88**)



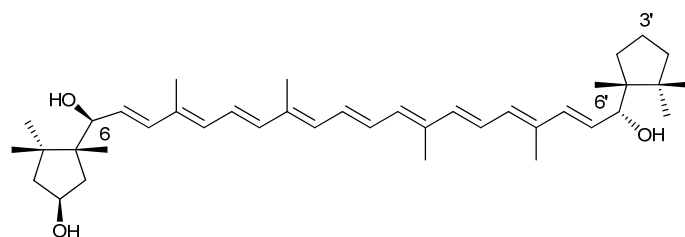
(3*S*,5*S*,6*R*,6'*S*)- kapszantol-5,6-epoxid (*syn*) (**89**)



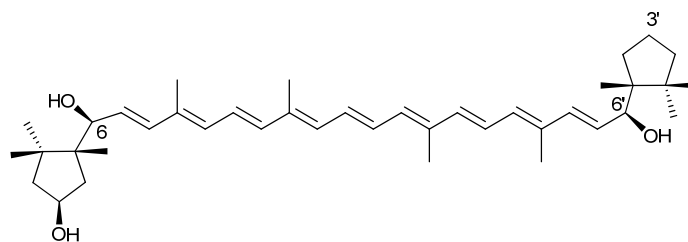
(6*R*,6'*R*)-3'-dezoxikapszorubol (**90**)



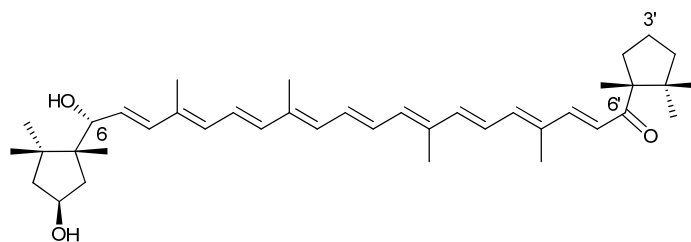
(6*R*,6'*S*)-3'-dezoxikapszorubol (**91**)



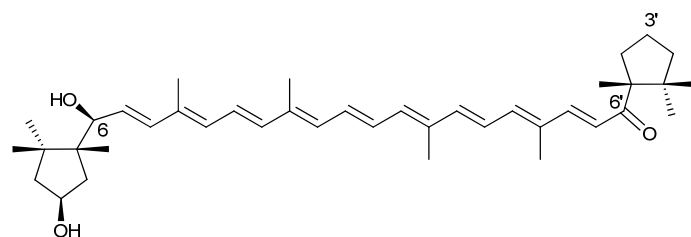
(6*S*,6'*R*)-3'-dezoxikapszorubol (**92**)



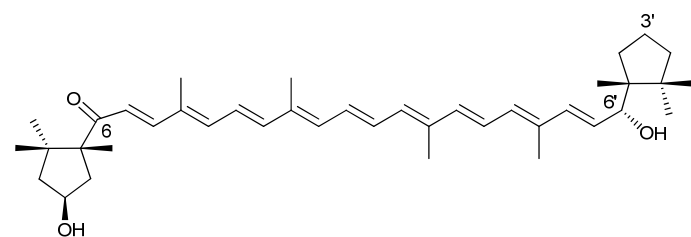
(6*S*,6'*S*)-3'-dezoxikapszorubol (**93**)



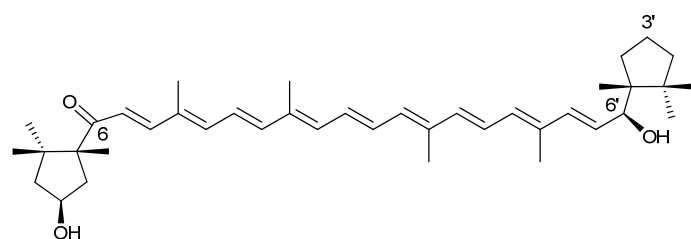
(6*R*)-3'-deoxikapszorubol -6'-on (**94**)



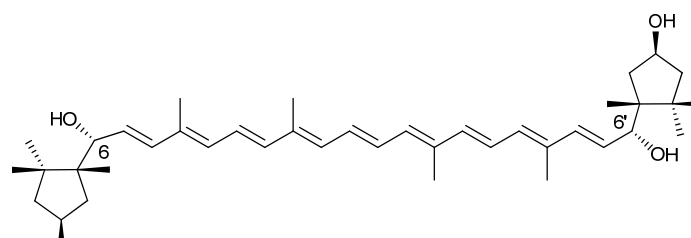
(6*S*)-3'-deoxikapszorubol -6'-on (**95**)



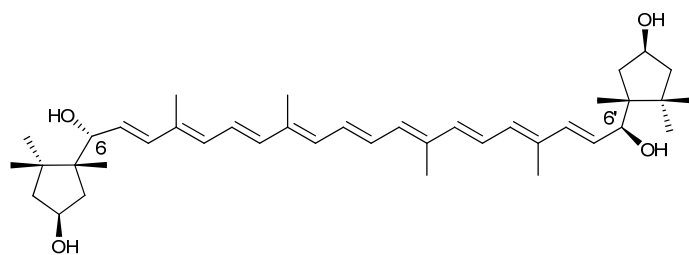
(6'*R*)-3'-deoxikapszorubol-6-on (**96**)



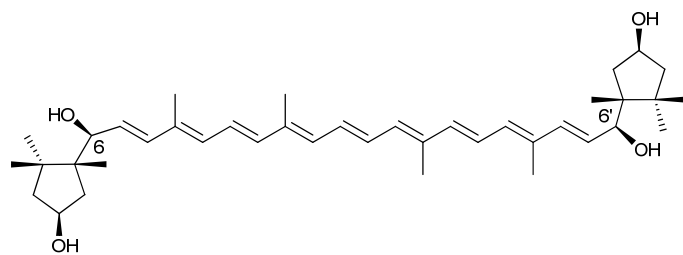
(6'*S*)-3'-deoxikapszorubol-6-on (**97**)



(6*R*,6'*R*)-kapszorubol (**98**)



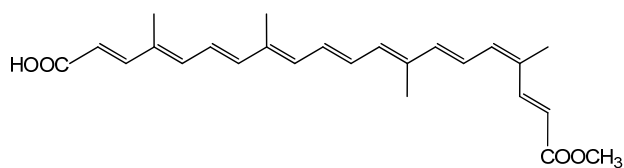
(6*R*,6'*S*)-kapszorubol (**99**)



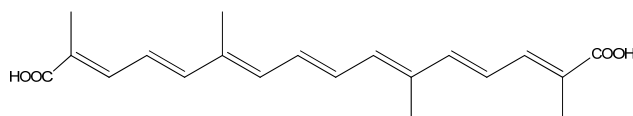
(6*S*,6'*S*)-kapszorubol (**100**)

Karotinoid szerkezeti képletek, melyek a Függelék táblázatban nem szerepelnek:

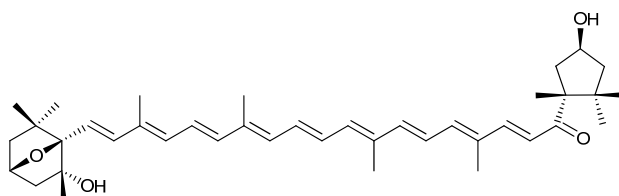
A dolgozatban való előfordulásuk sorrendjében.



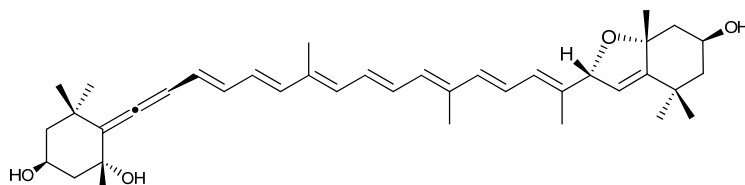
bixin (101)



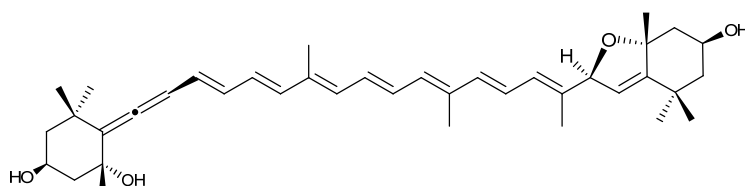
krocetin (102)



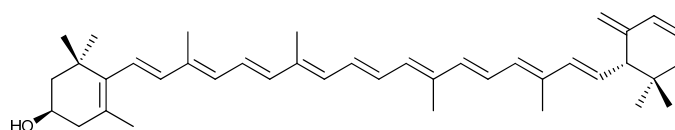
kapszantin-3,6-epoxid (103)



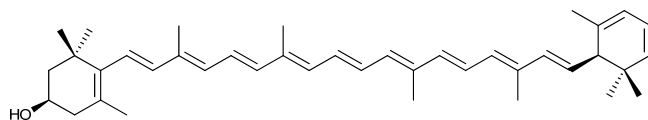
(8'R)-neokróm I (104)



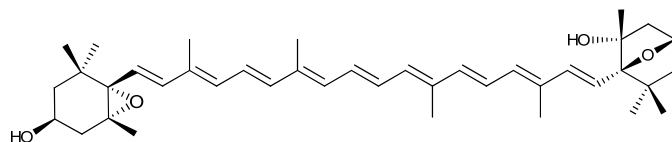
(8'S)-neokróm II (105)



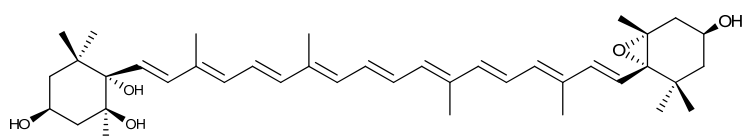
anhydrolutein I (106)



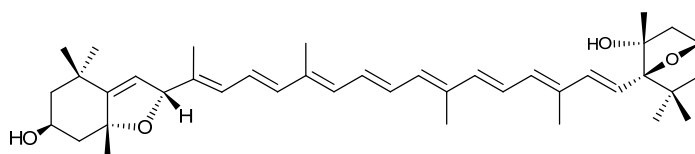
anhidrolutein II (107)



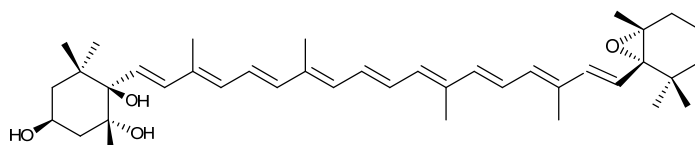
kukurbitaxantin B (108)



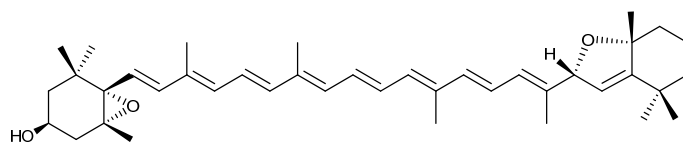
5,6-diepilatoxantin (109)



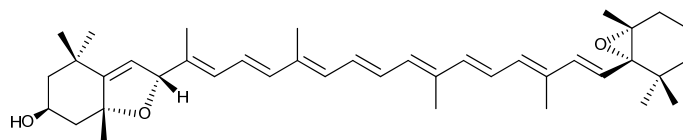
kukurbitakróm (110)



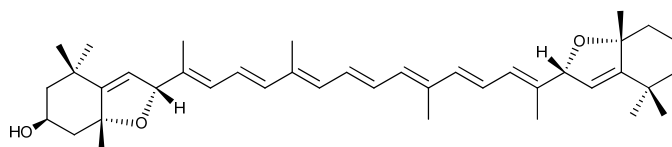
latoxantin (111)



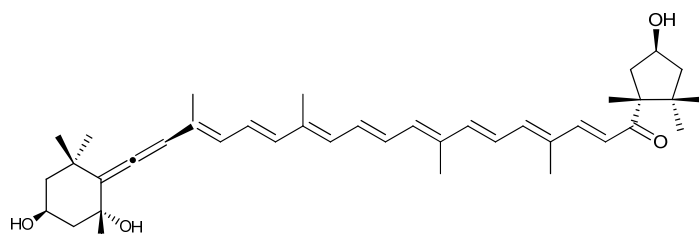
β- kriptoxantin-5,6,5',8'-diepoxid (112)



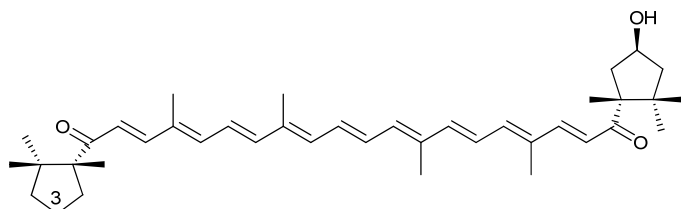
β- kriptoxantin -5,8,5',6'-diepoxid (113)



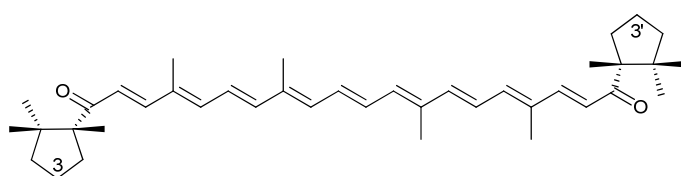
β- kriptoxantin -5,8,5',8'-diepoxid (114)



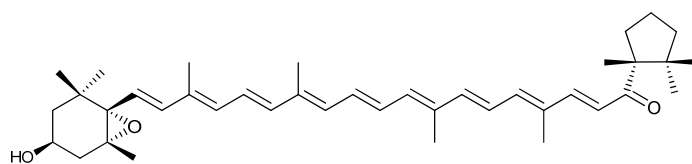
kapszoneoxantin (**115**)



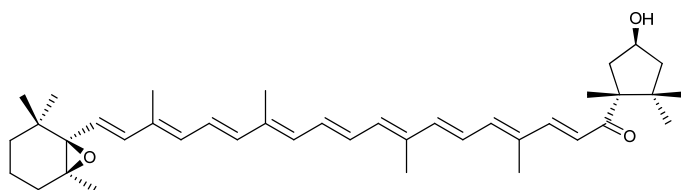
3-dezoxikapszorubin (**116**)



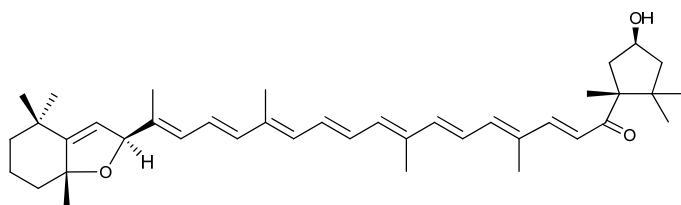
3,3'-didezoxi-kapszorubin (**117**)



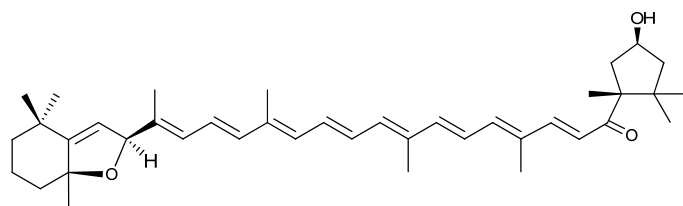
3'-dezoxi-kapszantin-5,6-epoxid (**118**)



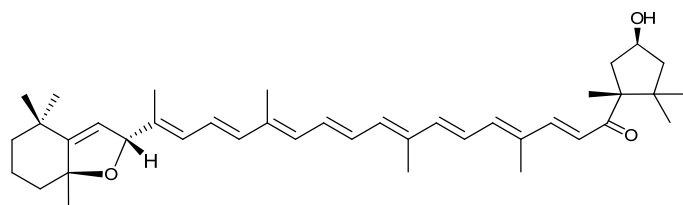
(5S,6R,3'S,5'R)-kriptokapszin-5,6-epoxid (**119**)



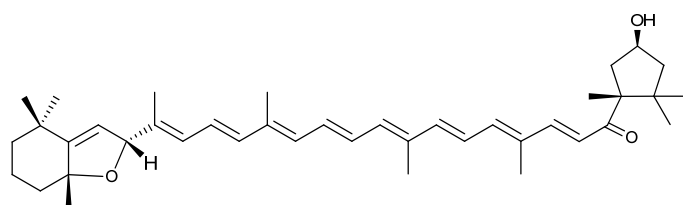
(5R,8S,3'S,5'R)-kriptokapszin-5,8-epoxid (**120**)



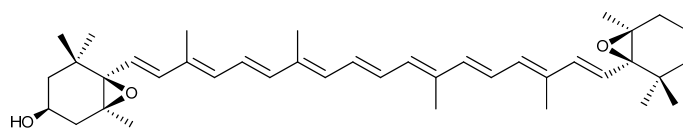
(5*S*,8*S*,3'*S*,5'*R*)- kryptokapsin-5,8-epoxid (**121**)



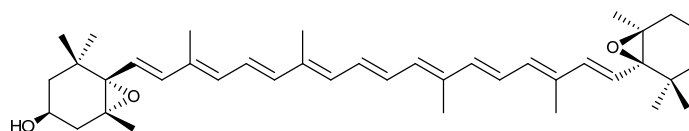
(5*S*,8*R*,3'*S*,5'*R*)- kryptokapsin-5,8-epoxid (**122**)



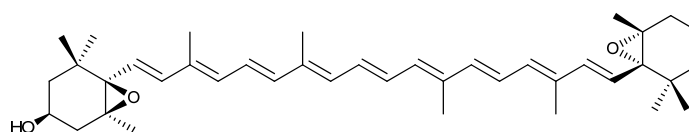
(5*R*,8*R*,3'*S*,5'*R*)- kryptokapsin-5,8-epoxid (**123**)



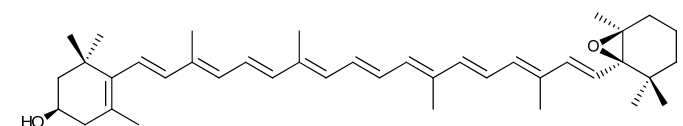
(3*S*,5*S*,6*R*,5'*S*,6'*R*)-β-kryptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**124**)



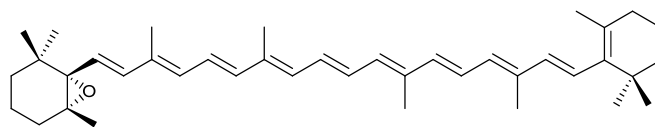
(3*S*,5*R*,6*S*,5'*S*,6'*R*)-β-kryptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**125**)



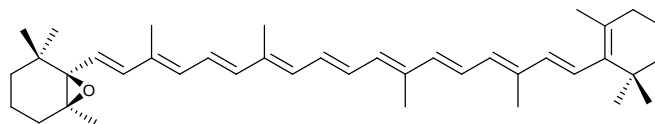
(3*S*,5*S*,6*R*,5'*R*,6'*S*)-β-kryptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**126**)



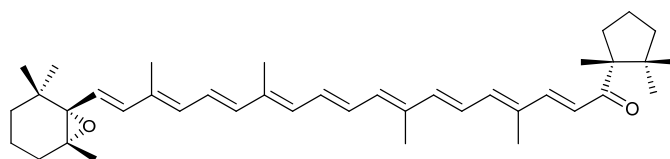
(3*R*,5'*S*,6'*R*)-β-kryptoxantin-5',6'-epoxid (**127**)



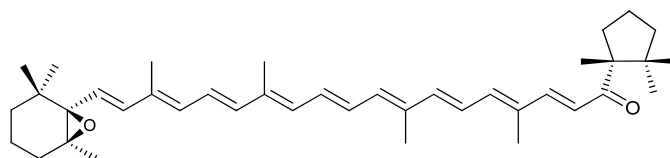
(5*R*,6*S*)-β-karotin-5,6-epoxid (**128**)



(5*S*,6*R*)-β-karotin-5,6-epoxid (**129**)



(5*R*,6*S*)-szapotexantin-5,6-epoxid (**130**)



(5*S*,6*R*)-szapotexantin-5,6-epoxid (**131**)

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. Horváth, G., Molnár, P., Farkas, Á., Szabó, L.G., **Turcsi, E.**, Deli J.: Separation and Identification of Carotenoids in Flowers of *Chelidonium majus* L. and Inflorescences of *Solidago canadensis* L.
Chromatographia **71**, S103-S108 (2010) if=1,075

2. Gulyás-Fekete, G., Murillo, E., Kurtán, T., Papp, T., Illyés, T.Z., Drahos, L., Visy, J., Agócs, A., **Turcsi, E.**, Deli, J.: Cryptocapsinepoxide-Type Carotenoids from Red Mamey, *Pouteria sapota*
Journal of Natural Products **76** (4) 607-614 (2013) if=3,947

3. **Turcsi, E.**, Murillo, E., Kurtán, T., Szappanos, Á., Illyés, T.Z., Gulyás-Fekete, G., Agócs, A., Avar, P., Deli, J.: Isolation of β -Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3'-Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*)
Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**, (26), 6059-6065 (2015) if=2,912

4. **Turcsi, E.**, Nagy, V., Deli, J.: Study on the elution order of carotenoids on endcapped C₁₈ and C₃₀ reverse silica stationary phases. A review of the database
Journal of Food Composition and Analysis **47**, 101-112 (2016) if=1,985

Egyéb közlemények

1. Horvath, G.; **Turcsi, E.**; Molnar, P.; Szabo, L.G.; Deli, J.: Carotenoid content of the flower of tansy (*Tanacetum vulgare* L.)
Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research **73**, (9), 911 (2007) if=1,848

2. Horvath G.; **Turcsi E.**; Molnar P.; Szabo L.G.; Deli J.: Isolation and identification of Carotenoids in the fruit of cornelian cherry (*Cornus mas* L.)
Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research **73**, (9), 912 (2007) if=1,848

3. Nagy, V.; Agócs, A.; **Turcsi, E.**; Molnár, P.; Szabó, Z.; Deli, J.: Latoxanthin, a minor carotenoid isolated from the fruits of yellow paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme* flavum)
Tetrahedron Letters **48**, 9012-9014 (2007) if=2,615

4. **Turcsi, E.**; Marton, K.; Olah, P.; Deli, J.: Investigation of the Carotenoid Composition of Different Kinds of Fresh and Cooked Pumpkins (*Cucurbita maxima*)
Carotenoid Science **12**, 135 (2008)

5. Nagy, V.; Agócs, A.; **Turcsi, E.**; Deli, J.: Isolation and purification of acid-labile carotenoid 5,6-epoxides on modified silica gels
Phytochemical Analysis **20**, (2), 143-148 (2009) if=1,744

6. Huang, F. C.; Horvath, G.; Molnar, P.; **Turcsi, E.**; Deli, J.; Schrader, J.; Sandmann, G.; Schmidt, H.; Schwab, W.: Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*
Pytochemistry **70**, (4), 457-464 (2009) if=3,104

7. Zelena, K.; Lehnert, N.; Krings, U.; Horváth, G.; Molnar, P.; **Turcsi, E.**; Deli, J.; Berger, R.: Degrading of carotenoids by the DyP peroxidase MsP2 from *Marasmius scorodonius*
Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **53**, (S1), 60 (2011) if=0,565

8. Brandi, F.; Bar, E. ; Mourgues, F. ; Horvath, G.; **Turcsi, E.**; Giuliano, G.; Liverani, A. ; Tartarini, S.; Lewinsohn, E.; Rosati, C.: Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism
BMC Plant Biology **11**, 24 (2011) if=3,447

9. Molnar, P.; Horvath, G.; **Turcsi, E.**; Deli, J.; Kavase, M.; Satoh, K.; Tanaka, T.; Tani, S.; Sakagami, H.; Gyemant, N.; Molnar, J.: Carotenoid composition and in vitro pharmacological activity of Rose hips
Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **53**, (S1), 27 (2011) if=0,565

10. Horvath, G.; Molnar, P.; Takacs, T.; **Turcsi, E.**; Deli J.: Investigation of carotenoid composition in flowers of *Chelidonium majus* L. with CLC and HPLC techniques
Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **53**, (S1), 57 (2011) if=0,565

11. Deli, J.; **Turcsi, E.**; Szabo, I.; Mosquera, Y.; Murillo, E.: Carotenoid composition of mamey fruit (*Pouteria sapota*)
Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica **53**, (S1), 55 (2011) if=0,565

12. Somogyi, B.; Felfoldi, T.; Solymosi, K.; Makk, J.; Homonnay, Z. G.; Horvath, G.; **Turcsi, E.**; Boddi, B.; Marialigeti, K.; Voros, L.: *Chloroparva pannonica* gen. et sp. nov. (Trebouxiphyceae, Chlorophyta) - a new picoplanktonic green alga from a turbid, shallow soda pan
Phycologia **50**, (1), 1-10 (2011) if=2,000

13. Horvath, G.; Molnar, P.; **Turcsi, E.**; Deli, J.; Kawase, M.; Satoh, K.; Tanaka, T.; Tani, S.; Sakagami, H.; Gyemant, N.; Molnar, J.: Carotenoid composition and in vitro pharmacological activity of rose hips
Acta Biochimica Polonica **59**, (1), 129-132 if=1,185

Folyóiratban megjelent konferencia absztrakt

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

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

Proceedings

1. **Turcsi, E.**, Szabó, I., Murillo, E., Mosquera, Y., Deli, J.: Carotenoid Composition of Mamey fruit (*Pouteria sapota*)
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010.
Proceedings pp. 289-292..
2. **Turcsi, E.**, Deli, J.: Comparative Study on the Separation of Structural and Geometrical Isomers of Carotenoids on C₁₈ and C₃₀ Stationary Phases
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010.
Proceedings pp. 293-296.
3. Marton, K., **Turcsi, E.**, Deli, J.: Carotenoid Composition of Different Kinds of Fresh and Cooked Pumpkins (*Cucurbita maxima*)
6th International Congress on Pigments in Food, Budapest, June 20-24, 2010.
Proceedings pp. 247-249.