

Matus Zoltán

KAROTINOIDOK MEGHATÁROZÁSA BIOLÓGIAI
MINTÁKBÓL HPLC MÓDSZERREL

Ph.D. DOLGOZAT

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

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

Pécs, 2003

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----------|
| I. BEVEZETÉS | 1 |
| II. ELŐZMÉNYEK | 2 |
| 1. Karotinoidok azonosítása növényekből | 2 |
| 2. Kromatográfiai előzmények | 7 |
| 2.1. Szilikagél adszorbensek | 8 |
| 2.2. Porózus szilikagélek jellemzése | 8 |
| 2.3. Fordított fázisú (RP) töltetek előállítása és ellenőrzése | 11 |
| III. EREDMÉNYEK | 13 |
| 1. HPLC töltetek vizsgálata | 13 |
| 1.1. Fordított fázisú (RP) töltetek ellenőrzése | 13 |
| 1.2. A pórusszerkezet módosítása | 14 |
| 1.3. Különleges technológiákkal készült fordított fázisú töltetek | 15 |
| 1.3.1. Szilárd fázisú reakciókkal készített töltetek | 15 |
| 1.3.2. Utánszilanizált fázisok gyors előállítása (kvázi „one pot” módszer) | 17 |
| 1.4. Az utánszilanizálás hatása fordított fázisú HPLC elválasztásokra | 18 |
| 2. Karotinoidok meghatározása növényi mintákból HPLC-vel | 27 |
| 2.1. Karotinoidok azonosítása bonyolult sokkomponensű mintákban | 27 |
| 2.1.1. Oxo karotinoidok | 27 |
| 2.1.2. 5,6-epoxi-karotinoidok | 28 |
| 2.1.3. 5,8,5',8'-diepoxi karotinoidok (difuranoid oxidok) | 29 |
| 2.1.4. Cisz-karotinoidok magas cisz-peakkal | 29 |
| 2.1.5. Példa a módszer alkalmazására | 29 |
| 2.2. Az azonosítási módszer alkalmazása paprikamintákra | 30 |
| 2.2.1. Elszappanosítás | 31 |
| 2.2.2. Karotinoidok azonosítása | 31 |
| 2.2.3. Mennyiségi kiértékelés | 32 |
| 2.3. Karotinoid-összetétel vizsgálata különböző paprikafajtákban | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.4. | A paprika újabb minor karotinoidjainak célzott vizsgálata | 41 |
| 2.4.1. | β -Kriptoxantin-epoxidok előállítása | 41 |
| 2.4.2. | 3,6-Epoxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok | 43 |
| 2.4.3. | 3,5,6-Trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok | 44 |
| 2.4.4. | γ -Végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálása | 47 |
| 2.4.5. | Kapszanton izolálása | 48 |
| 2.5. | Egyéb növényi források vizsgálata 3,6-epoxi- β - és 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálására | 48 |
| 2.5.1. | Tigris liliom (<i>Lilium tigrinum</i>) | 49 |
| 2.5.2. | Vadgesztenye (<i>Aesculus</i>) virág porzójának vizsgálata | 49 |
| 2.5.3. | <i>Asparagus officinalis</i> bogyójának vizsgálata | 50 |
| 2.6. | Tököfélék HPLC analízise | 51 |
| 2.6.1. | Olajtök analízise | 51 |
| 2.6.2. | Sütőtök | 54 |
| 3. | Adalékok a karotinoidok biológiai hatásainak felderítéséhez Állati és emberi eredetű minták karotinoid és A-vitamin tartalmának meghatározása | 56 |
| 3.1. | Karotinoidok biológiai jelentősége | 56 |
| 3.2. | Kromatográfias előzmények | 57 |
| 3.3. | HPLC módszer | 58 |
| IV. | MÓDSZEREK, ANYAGOK, KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK | 63 |
| 1. | HPLC töltetek készítése, ellenőrzése | 63 |
| 2. | Karotinoidok azonosítása bonyolult sokkomponensű mintákban | 64 |
| 3. | Paprikafajták és kapcsolódó minták vizsgálata | 65 |
| 4. | Tököfélék analízise | 66 |
| 5. | Állati és emberi minták mérése | 67 |
| V. | ÖSSZEFOGLALÁS | 68 |
| VI. | IRODALOM | 70 |
| | MELLÉKLET | |

I. BEVEZETÉS

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

Intézetünkben - a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán - közel 80 éve folyik a karotinoidok kutatása. 1923-ban az Erzsébet Tudományegyetem Orvosi Karán megalakult Kémia Intézet első professzora, Zechmeister László a természetes anyagok kémiájával kezdett el foglalkozni, köztük az akkor Európában éppen kialakulófélben lévő karotinoidkémiaiával. Munkatársával, Cholnoky Lászlóval együtt számos szerkezeti és elválasztási problémát oldottak meg, amelyek nemzetközi hírűvé tették a munkacsoportot, és nagyban hozzájárultak a kromatográfia fejlődéséhez. Már az 1920-as években vizsgálták a paprika színező anyagait is. Ez a téma az elválasztástechnika fejlődésével időről-időre újból előtérbe került. Zechmeister László emigrálása után Cholnoky László, majd az Ő halála után Szabolcs József, majd Tóth Gyula vezetésével folytatódottak a kutatások.

A karotinoidkémia, mint a természetes anyagok kémiájának egyik része, a kémia több klasszikus ágából tevődik össze. A karotinoidforrások felderítéséhez, az új szerkezetű karotinoidok izolálásához szükség van a klasszikus és modern elválasztástechnika alkalmazására, a szerkezetek meghatározásához a modern szerkezetvizsgáló módszerek és a hagyományos kémiai módszerek együttes használatára.

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

A dolgozatban szereplő karotinoidok könnyebb átláthatósága érdekében az értekezés végén, a mellékletben, egy képletgyűjtemény található.

II. ELŐZMÉNYEK

1. Karotinoidok azonosítása növényekből

A piros paprika és más növények színezékanyagaival már a XIX. században is foglalkoztak. A paprikavörös kristályos előállítására mégis sokáig késett, mivel a kísérő zsíroktól és viaszoktól nehezen volt elkülöníthető. 1927-ben sikerült csak Zechmeister Lászlónak és Cholnoky Lászlónak a „paprikavörös” főfestékét kristályosítani, melyet kapszantinnek neveztek el [1]. Ez a kapszantin készítmény azonban nem volt egységes. Zechmeister és Cholnoky később - elsőként alkalmazva a Tswett-féle oszlopkromatográfiát - még egy piros mellékfestéket, a kapszorubint találta meg [2]. Megállapították, hogy a teljesen érett és megszáradt, a kereskedelemben is beszerezhető paprika termésfala (paprikabőr) a két különleges vörös festéken kívül még különböző sárga festékeket is tartalmaz, amelyek közül a β -karotint, kriptoxantint és zeaxantint sikerült kristályosan elkülöníteni, a többi pigmentet ellenben csekély mennyiségük miatt nem lehetett kristályosítani és azonosítani [3].

Az 1940-es évek második felében Karrer és munkatársai [4] írták le a karotinoid-5,6-epoxidok szerkezetét. Az általuk kidolgozott módszerrel, amely lehetővé tette a karotinoidok valószínű azonosítását az egyes festékek kristályosítása nélkül, számos növény különféle szerveinek karotinoidjait vizsgálták meg. Vizsgálataik alapján néhány régebbi irodalmi adatot helyesbíteni kellett, de újabb karotinoidokat nem találtak [5]. Ilyen előzmények után időszerűvé vált a paprika festékeinek újabb vizsgálata is, azzal a céllal, hogy legalább azonosítsák azokat a karotinoidokat amelyeknek kristályosítása addig nem sikerült.

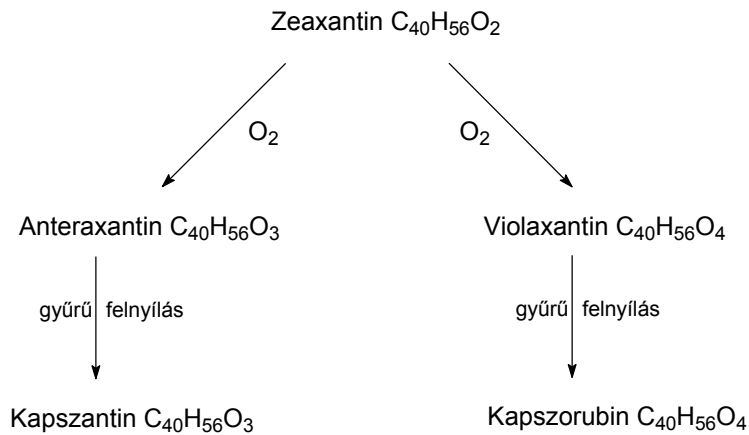
Az 1950-es években Cholnoky és munkatársai a piros paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) és a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme flavum*) érett és éretlen termésének karotinoidjait vizsgálták [6].

A piros paradicsompaprika termésének fejlődésében két szakaszt különböztettek meg. A termés az első szakaszban klorofill tartalma miatt zöld színű, a másodikban viszont a klorofill eltűnésével párhuzamosan megvörösödik. Az éretlen, zöld termés karotinoidjai

közül a következőket azonosították: β -karotin, β -karotin-monoepoxid (nyomok), mutatokróm, neo- β -karotin B és U, violaxantin, xantofill (lutein), fóliaxantin (neoxantin), fóliakróm (a fóliaxantin furanoid származéka) és anteraxantin (nyomok). Ezeken kívül a zöld termés valószínűleg tartalmazott még kriptoxantint, valamint a xantofill és a violaxantin *cisz*-izomerjeit. Az érett termés festékei a következők voltak: β -karotin, aurokróm, mutatokróm, kriptoxantin, kriptokapszin, neo- β -karotin B és U, kapszorubin, kapszantin, violaxantin, anteraxantin, xantofill-epoxid, zeaxantin, és ezek közül egyeseknek a *cisz*-izomerjei. A termések érésénél a klorofill eltűnésével párhuzamosan a festékképződésben minőségi változás következik be, amelyet a festékek mennyiségének ugrásszerű megnövekedése követ.

A sárga paradicsompaprika éretlen termései zöldek, de a klorofill eltűnésekor, tehát teljes beérés után sem vörösödnek meg, hanem narancssárgák maradnak. Cholnoky és munkatársai az éretlen, zöld termésben a következő karotinoidokat azonosították: β -karotin, xantofill, violaxantin, és ezeknek néhány *cisz*-izomerje, β -karotin-monoepoxid, β -kriptoxantin és anteraxantin nyomai, fóliaxantin és fóliakróm. Az érett sárga termések festékei: α - és β -karotin, α - és β -kriptoxantin, valamint ezeknek *cisz*-izomerjei, xantofill, violaxantin, anteraxantin és a két előbbi *cisz*-izomerjei, fóliaxantin, fóliakróm, és nyomokban β -karotin-monoepoxid.

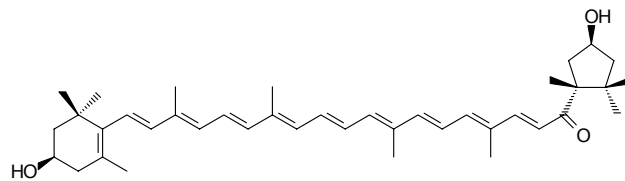
Cholnoky és munkatársai izolálták először kristályosan az α -kriptoxantint, melynek szerkezetét később igazolták [7], és a kriptokapszint [8]. Cholnoky másik feltevése a kapszantin és a kapszorubin bioszintézisére vonatkozott (1. ábra). Eszerint a zeaxantin epoxidálásával anteraxantin, illetve violaxantin keletkezik, és ezekből képződik gyűrűfelnyílással a kapszantin, illetve a kapszorubin. E munkák kapcsán javasolta Cholnoky a kapszantin addig elfogadott szerkezetének revízióját.



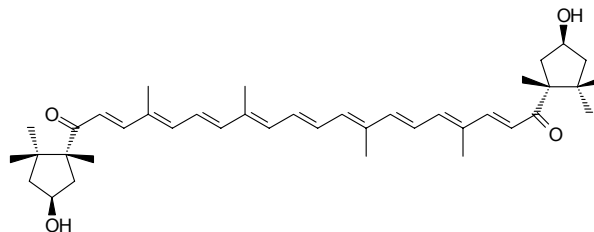
1. ábra. A kapszantin és a kapszorubin képződése zeaxantinból Cholnoky szerint [8]

A paprika fő karotinoidjának, a kapszantinnak a szerkezetét Karrer és Entschel IR adatai [9], Weedon és munkatársai [10] NMR-spektroszkópiai eredményei valamint Cholnoky és Szabolcs preparatív kémiai munkái [11, 12] írták le.

A kapszantin és kapszorubin szerkezetbizonyító szintézisét végül a Weedon kutatócsoport és a Hoffmann-La Roche kutatócsoportja együtt végezte el 1983-ban [13, 14].



Kapszantin (1)
(3*R*,3'*S*,5'*R*)-3,3'-dihidroxi-β,κ-karotin-6'-on



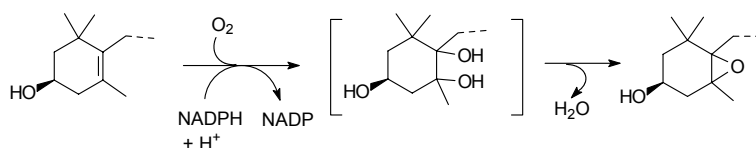
Kapszorubin (2)
(3*S*,5*R*,3'*S*,5'*R*)-3,3'-dihidroxi-κ,κ-karotin-6,6'-dion

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

Curl ellenáramú megosztatást alkalmazva vizsgálta a zöld és piros paprika karotinoid-összetételét [15]. Piros paprikában közel 40 komponenst talált, ezek közül azonban csak a már ismert komponensek (kapszantin, kapszorubin, neoxantin, violaxantin, luteoxantin, anteraxantin, mutatoxantin, zeaxantin, kriptokapszin, kriptoxantin, α - és β -karotin) azonosítása történt meg [16]. Számos további komponens valószínű szerkezetét kémiai reakcióik, illetve a polaritási sorban elfoglalt helyük alapján próbálta meg Curl megadni.

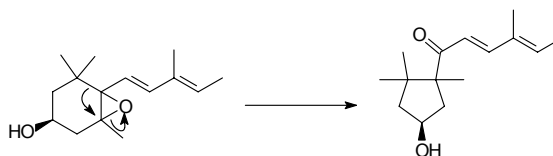
1970-ben Davies és munkatársai [17] vékonyréteg kromatográfiát alkalmazva vizsgálták a fehér, sárga, narancssárga és piros színűre érő paprikák karotinoid-összetételét, és - Cholnoky sémáját alapul véve - felvázolták a lehetséges karotinoid bioszintézist a paprikában.

Davies és munkatársai ebben a közleményben írják le – alapul véve Yamamotonak a xantofill ciklusra vonatkozó cikkét [18] – az anteraxantin és violaxantin zeaxantinból molekuláris oxigén felhasználásával való képződését is (2. ábra).



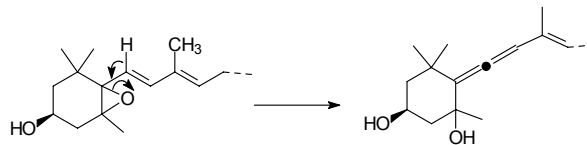
2. ábra. Az 5,6-epoxi-végcsoport képződése Davis szerint

A karotinoid-5,6-epoxidok tovább alakulására pedig két lehetséges utat adtak meg. Piros paprikában a pinakolin átrendeződést, amely a κ -végcsoport kialakulását eredményezi (3. ábra).



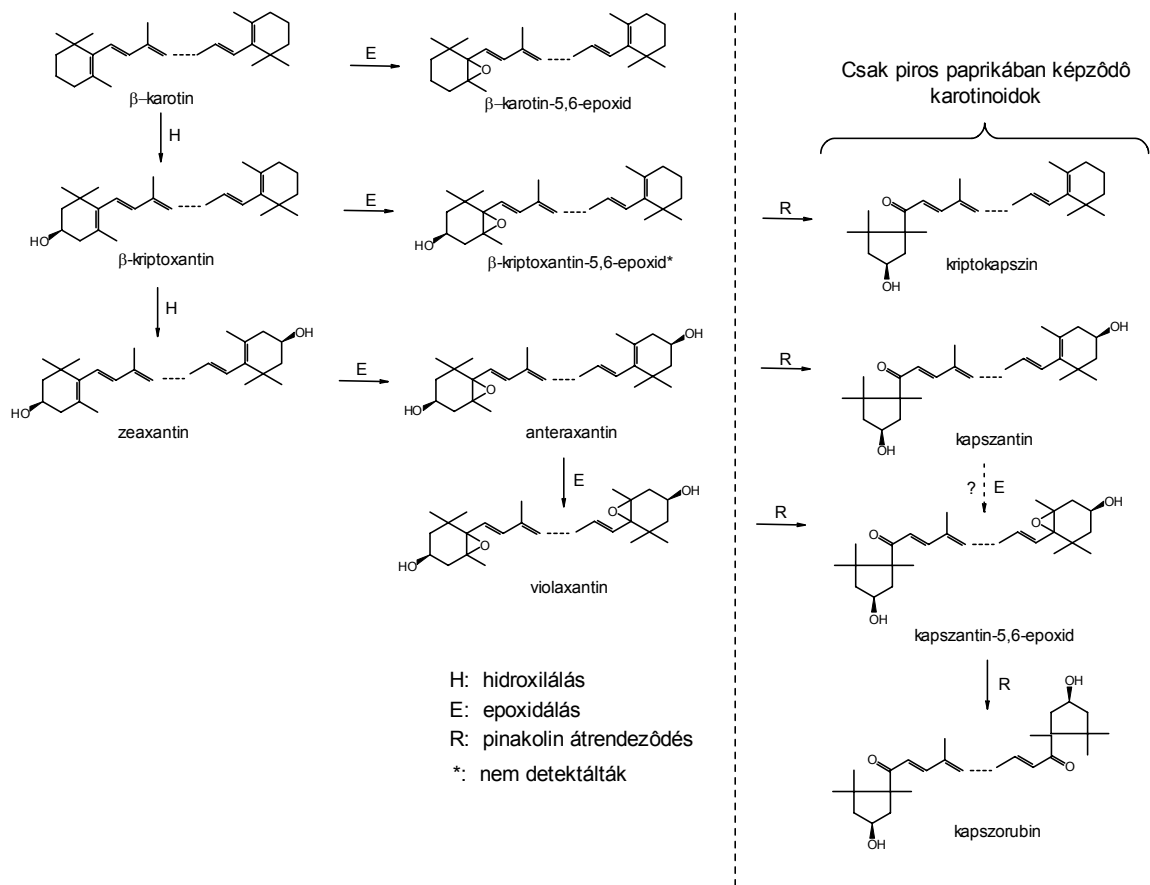
3. ábra. A κ -végcsoport kialakulása

Az átrendeződést katalizáló enzim csak a piros paprikában van jelen, a sárga paprikából hiányzik. A másik lehetséges átalakulás a 3,5-dihidroxi-allén végcsoport kialakulása, melynek során a violaxantinból neoxantin képződik (4. ábra).



4. ábra. Az allén-végcsoport kialakulása

A neoxantin szerkezetét éppen egy évvel korábban sikerült Cholnoky és Weedon munkacsoportjának közösen tisztázni [19].



5. ábra. Feltételezett bioszintézis utak a sárga és piros paprikában Davies szerint [17]

A séma alapján a sárga, vagy narancssárga színű paprikákban (amelyek sohasem pirosodnak meg) a karotinoidok bioszintézise befejeződik a karotinoid-5,6-epoxidok (anteraxantin, violaxantin) képződésével, a piros paprikában a karotinoid-5,6-epoxidok ún. pinakolin átrendeződéssel átalakulnak a megfelelő keto-karotinoiddá: anteraxantinból kapszantin, violaxantinból kapszantin-5,6-epoxidon keresztül kapszorubin, míg β -kriptoxantin-5,6-epoxidból kriptokapszin keletkezik.

Az 1970-es években többen is vizsgálták a különböző paprikafajták karotinoid-összetételét [20-24], jelentősebb eredményt azonban nem értek el. Például Bilal Camara a hetvenes években kezdte el a paprikakarotinoidok vizsgálatát. Előbb csak különböző fajták karotinoid analízisét végezte el [22], később pedig szisztematikusan felderítette a bioszintézisben résztvevő enzimek szerkezetét, és működési mechanizmusát. Izotóppal jelzett anteraxantint és violaxantint használva Camara mutatta ki először, hogy a kapszantin és a kapszorubin ezekből a vegyületekből keletkezik [23, 24].

2. Kromatográfiai előzmények

Az 1970-es évek közepétől a nagynyomású folyadékkromatográfia fejlődésével ez a módszer is egyre nagyobb szerepet kapott a karotinoidok analízisében. A műszeres kromatográfiai módszerek (pl. a HPLC) és ezek detektálási módjainak fejlődése lehetővé tette a korábban nem kimutatható, kis mennyiségben jelenlévő komponensek kimutatását is. A modern szerkezetvizsgáló módszerek elterjedése lehetővé tette e kis mennyiségben jelenlévő komponensek szerkezetének meghatározását is.

Ebben az időben kezdődött intézetünkben a HPLC töltetek fejlesztése, ami nagyban hozzájárult a módszer hazai fejlődéséhez, elterjedéséhez, és lehetővé tette, hogy a HPLC technikát alkalmazzuk a karotinoidok kutatásában is.

A folyadékkromatográfiában alkalmazható adszorbenseknek, a folyadékkromatográfias tölteteknek nagyon sokféle, néha egymásnak ellentmondó követelménynek kell megfelelni. Elsődleges követelmény a nyomásállóság. A legtöbb szerves alapú töltet (szilikagél, alumínium-oxid, stb.) a töltetszemcsék összeroppanása nélkül visel el 50-60 MPa nyomásesést. Ezért használatuk – különösen a szilikagél és szilikagél alapú töltetek alkalmazása – nagyon elterjedt.

A kromatográfias elválasztás a töltet felületén, és pórusaiban történik, az elválasztandó komponensek eltérő szorpciós viselkedésének következtében. A folyadékkromatográfias töltetek felületi struktúrája szerint megkülönböztetik a *teljesen porózus*, illetve a *nemporózus* tölteteket.

A *porózus töltetek* (leggyakoribb a szilikagél) nagy fajlagos felületű (kb. 10-500 m²×g⁻¹) és pórustérfogatú anyagok. Az analitikai kromatográfias célra használt szilikagélek szemcsemérete leggyakrabban 3-10 μm közötti, de alkalmaznak kis szemcseméretű (1,5-2

μm), különösen szűk szitafrakciójú tölteteket is. Félpreparatív, ill. preparatív kromatográfiás célra $10\ \mu\text{m}$ feletti átlagos szemcseméretű töltetek a megfelelőek.

A *nemporózus töltetek* $3\ \mu\text{m}$ -nél kisebb szemcseméretű monodiszperz rendszerek. Leggyakrabban a $1,5\ \mu\text{m}$ szemcseátmérőjű tölteteket alkalmazzák. A töltet fajlagos felülete megegyezik a geometriai felülettel (kb. $2\ \text{m}^2 \times \text{g}^{-1}$). A nemporózus adszorbensekkel töltött oszlopok terhelhetősége ugyan alacsony, és a nyomásesés nagyon magas, de az ilyen oszlopokon végezhető gyors elválasztások és a kitűnő visszanyerés (recovery) e tölteteket olyan új feladatok megoldására teszi alkalmassá, melyek porózus tölteteken, nehézkesen, sokkal lassabban és kisebb érzékenységgel végezhetők el.

2.1. Szilikagél adszorbensek

A porózus szilikagéleket kromatográfiás szempontból jellemezhetjük geometriai sajátosságaik, pórusszerkezetük és a belőlük tölthető oszlopok hatásossága szerint.

A folyadékkromatográfiás gyakorlatban használt *porózus* szilikagélek átlagos pórusmérete $3\text{-}100\ \text{nm}$, pórustérfogata $0,2\text{-}2\ \text{cm}^3 \times \text{g}^{-1}$, fajlagos felülete $10\text{-}500\ \text{m}^2 \times \text{g}^{-1}$ között van. A nyomásesés miatt fontos a szűk szemcseméret-eloszlás, a hatékonyság miatt pedig a minél alacsonyabb átlagos szemcseméret.

A szilikagél töltetek adszorpciós tulajdonságait és szelektivitását elsősorban a felületi szilanolcsoportok és környezetük határozza meg. A porózus, vagy nemporózus szilikagélt a nagyhatásosságú folyadékkromatográfiában közvetlenül viszonylag ritkán alkalmazzák. Leggyakrabban a preparatív és processz kromatográfiában használnak nem modifikált szilikagél adszorbenst, itt is általában csak kompromisszumként, mivel a felületükön modifikált töltetek ára – a szükséges nagy tételekben – magas.

2.2. Porózus szilikagélek jellemzése

Alakjuk alapján megkülönböztetünk tört (irreguláris) és gömb alakú szilikagéleket. Míg az előbbieket nagyipari eljárással, az utóbbiak gyakran kifejezetten a folyadékkromatográfia igényei szerint – viszonylag kisebb tételekben – készülnek. A

korszerű szilikagél töltetektől, helyes töltési technikákkal, a szemcsealaktól függetlenül hatásos kolonnák készíthetők [25, 26].

Szemcseátmérőjük szerint az analitikai HPLC céljaira korábban a 10 µm, jelenleg az 5 µm átlagos szemcseméretű szilikagéleket alkalmazzák rutinszerűen. A szemcseátmérő jelentősen befolyásolja a töltet hatásosságát. Kisebb átmérőjű töltetektől nemcsak kisebb elméleti tányérmagasságú oszlopok tölthetők (nagyobb hatásosság, „keskenyebb csúcs”), de az áramlási sebességgel a tányérmagasság növekedése, a hatásosság romlása (a van Deemter egyenlet „C” együtthatója) is alacsonyabb. Az átlagos szemcseátmérő mellett a töltetek legfontosabb geometriai faktora a szemcseméret-eloszlás. Túl széles frakciójú vagy portartalmú (1 µm-nél kisebb szemcsék) töltetektől hatásos és megfelelő permeabilitású kolonna nem tölthető. A gyártók által megadott átlagos szemcseméret eltérhet az oszlopok permeabilitásából számolt (d) átlagos szemcseátmérőtől [25], amit a

$$d=(F \times \eta \times L \times \Delta p^{-1} \times r^{-2} \times \pi^{-1})^{1/2}$$

képlettel számoltuk, ahol F a térfogati sebesség, η a viszkozitás, L az oszlophossz, Δp a nyomásesés, r a kolonna sugara.

A kromatográfias töltetek *fajlagos felületeként* általában a nitrogén adszorpcióval („BET módszer” S_{sp}) megadott felületet értjük. A fajlagos felületet azonban kromatográfias úton a töltetek átlagos pórusméretének és pórustérfogatának ismeretében is meghatározhatjuk (S_{kr}). Ez utóbbi eljárás ismert molekulaméretű minták kizárásos kromatográfias körülmények között mért áttörési idejének meghatározásán alapul. E szerint a fajlagos felület a

$$S_{kr}=4 \times V_{sp} \times \phi^{-1} \quad [m^2 \times g^{-1}]$$

képlettel számítható, ahol V_{sp} a fajlagos pórustérfogat, φ pedig az átlagos pórusméret. A két felületmeghatározási eljárással mért adatok nagyon jó egyezést mutatnak. A kromatográfias módszerrel mért fajlagos felület értékek átlagban 1,34-szer magasabbak a BET módszerrel kapott értékeknél, az értékek szórása azonban csupán ±7,5%. A kromatográfias úton, töltött oszlopban meghatározható felületből következtethetünk az általánosan használt BET felület értékekre. A két módszer molekuláris szinten tehát a „felületet” azonos módon értelmezi. Ha két szilikagél kromatográfias úton mért felületének aránya például 2:1, akkor várható, hogy az előbbi szilikagél azonos tömegében BET eljárással meghatározott felület is kétszer akkora. Kromatográfias szempontból a

kolonnatérfogat egységben lévő fajlagos felület ($\text{m}^2 \times \text{cm}^{-3}$) a döntő, mert a kész kolonnák eltérő töltési sűrűségűek, így a tömegegységre vonatkoztatott fajlagos felület ($\text{m}^2 \times \text{g}^{-1}$) kevésbé jellemző.

Tapasztalat szerint a kromatográfiában használatos szilikagélek *pórusméreteloszlása* logaritmikus normáeloszlással írható le. Az adszorpciós kromatográfiában általában 6-10 nm között átlagos pórusméretű (ϕ) szilikagéleket alkalmaznak. A pórusméret-eloszlás meglehetősen eltérő lehet. Például a közismert és jó minőségű Spherisorb, Lichrosorb és Partisil töltetek pórusméret-eloszlása eltérő: a Lichrosorb pórusméret-eloszlása a legszélesebb, a Spherisorb-é a legszűkebb [25].

Kromatográfiás szempontból a töltetek pórustérfogatának összehasonlításában az egységnyi kolonnatérfogatra eső pórustérfogat, az ún. pórushányad (ϵ_p) az irányadó (és nem a töltet tömegegységére vonatkoztatott V_{sp} [$\text{cm}^3 \times \text{g}^{-1}$] fajlagos pórustérfogat). A pórushányad értékek a legtöbb szilikagénél közel sem térnek el egymástól annyira, mint a tömegegységre vonatkoztatott V_{sp} értékek. (Nagyobb pórustérfogatú szilikagélekből általában kisebb töltési sűrűségű oszlopok készíthetők.)

Az ϵ_p pórusporozitás (pórushányad) a töltetre jellemző állandó, a kolonna teljes térfogatából a pórusok térfogatára eső részt jelenti. Értékük a kolonnatérfogatra normált, ezért számértékük 0 és 1 közé esik. Értéke a kizárásos kromatográfiában különösen jelentős, mert a kolonna azon térfogathányadát is jelenti, mely az ilyen elválasztások elvégzésére rendelkezésre áll. Az ϵ_0 hézaghányad a töltet minőségén kívül a töltés minőségétől is függ. Egy sorozat azonos szilikagéllal töltött kolonnában a töltés egyenletességére utal, ha a hézaghányad közel azonos. „Tömörebbre” töltött oszlopban ϵ_0 értéke kisebb, mint egy lazábban töltött oszlopban. A pórushányad és a hézaghányad együttesen adja az oszlop teljes porozitását:

$$\epsilon_T = \epsilon_0 + \epsilon_p$$

Irodalmi adatok megerősítik, hogy a totálporozitás értéke a legtöbb HPLC szilikagél esetében 0,8 körüli érték.

A töltött oszlopok *hatásosságát* az elméleti tányérszámmal, ill. annak az áramlási sebességgel történő változásával jellemezzük. A kiértékelést a van Deemter egyenlettel végezzük:

$$H = A + B \times u^{-1} + C_m \times u + C_s \times u$$

ahol **H** az elméleti tányérmagasság, **A**, **B**, és **C** állandók, **u** a lineáris áramlási sebesség.

Az átlagosan 10 μm (vagy nagyobb) szemcseméretű töltetek kiértékelése az egyszerűsített van Deemter egyenlettel történhet:

$$H = A + C_m \times u + C_s \times u$$

Az egyenletnek ez a formája a minimális tányérmagassághoz tartozó áramlási sebességek felett mért tányérmagasságok feldolgozására alkalmas, ahol a tányérmagasságok emelkedése a lineáris áramlási sebesség függvényében közel lineáris.

Az átlagosan 5 μm szemcseátmérőjű töltetek $0,25 - 6,5 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$ sebesség-tartományban, az átlagosan 10 μm -os töltetek pedig $1,5-9 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$ sebességtartományban használatosak. A van Deemter konstansok mértékegységei: **A** [μm], **B** [$\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$], **C** [ms].

Az „**A**” tag az

$$A = 2\lambda d_p$$

képlettel számolható. A töltési faktornak is nevezett (2λ) értéke tehát A/d_p

A „**B**” tag:

$$B = 2 \times \gamma \times D_m$$

ahol γ a labirintusfaktor, D_m a minták diffúziós koefficiense. Az átlagolt $B/D_m = 2\gamma$ értéke

A „**C**” tag

$$C_m = \varphi \times d_p^2 \times D_m^{-1}$$

ahol φ kizárólag a kapacitásarány **k** függvénye.

Halász és Ohmacht megállapították [35, 36], hogy a „gömb” és a „tört” szilikagélek között jelentős hatásosságbeli eltérés nincs. Sajnos egyes gyártók a nagyobb hatásosság érdekében esetenként a nominálisnál kisebb szemcséjű töltetet forgalmazznak. Az ebből készített oszlopok ugyan nagy hatásosságúak, de nyomásesésük is igen magas.

2.3. Fordított fázisú (RP) töltetek előállítása és ellenőrzése

A fordított fázisú töltetek olyan szilikagélek, melyek felületét kémiai reakcióval hidrofóbbá tették. A szilanolcsoportok kémiaiilag átalakíthatók és így a szorbens

kromatográfiai tulajdonságai megváltoztathatók. A szilanol-csoportok mellett elhelyezkedő fémionok a szilanolcsoport savasságát növelik. (Ennek negatív hatása bázikus minták elválasztásakor a legszembetűnőbb.)

A HPLC technikában a legtöbb analitikai elválasztást fordított fázisú tölteteken végzik. Gyakran alkalmazzák a C₁₈ (oktadecil), vagy C₈ (oktil) láncokkal borított tölteteket, de más lánc hosszúságú alkilcsoportokkal (C₁-től C₃₀-ig) borított szilikagélekkel is eredményesen végeznek speciális elválasztásokat. Porózus adszorbenseket hosszú láncú alkilcsoportokkal tökéletesen borítani (az összes felületi szilanolcsoportot elreagáltatni), azok helyigénye miatt („sztérikus okokból”) nem lehet. Ezért az ilyen tölteteket célszerű egy következő reakcióban kis helyigényű szilánnal ismét reagáltatni (metil-, etil-, izopropil-, tercier-butil-szilil csoportok a szokásosak), így az első lépésben el nem reagált szilanolcsoportok száma jelentősen csökkenthető.

Előállításuk során a szilikagél szilanolcsoportjait reagáltatják szerves szilícium vegyületekkel úgy, hogy a felületen $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{SiR}_3$ csoportok alakuljanak ki. Legelterjedtebb a szerves klórszilánok alkalmazása, de használnak alkoxi- és dimetil-amino-szilánokat is. Mivel a legtöbb alkalmazáshoz a nagy felületi borítottságú, azaz lehetőleg csak hidrofób, szilanofil tulajdonságokat nem mutató töltetek az alkalmasak, ezért a tölteteket, gyakran kis helyigényű hidrofób csoportokat tartalmazó szilánokkal (pl. trimetil-klórszilánnal) célszerű ismételt szilanizálni (ún. utánszilánizálás, „endcapping”) [27].

A töltetek borítottságát a legegyszerűbben a töltet százalékos széntartalmával (C%) ellenőrizhetjük. Az előállított, nem utánszilánizált C₁₈ töltetek széntartalma jól korrelál a fajlagos felületükkel: A széntartalom az utánszilánizálással emelkedik, mégpedig minél effektívebb utánszilánizálást alkalmaztunk, annál magasabb a széntartalom.

„Klasszikusnak” számító eljárás fordított fázisú töltetek minősítésére a *metilvörös teszt*: standardizált körülmények között benzolos metilvörös oldatból mennyi festék adszorbeálódik a töltetre, illetve annak szabad, hozzáférhető szilanol csoportjaira.

Töltetek maradék szilanol aktivitását célszerűen bázikus minták elválasztásával lehet ellenőrizni. E módszer eredményei kromatográfiai szempontból mindenképp értékesebbek, mint a más fizikai kémiai eljárással nyert eredmények, mivel a mindennapi kromatográfiai gyakorlattal megegyező, vagy ahhoz nagyon közelálló viszonyok között mérik a maradék szilanol aktivitást.

III. EREDMÉNYEK

1. HPLC töltetek vizsgálata

1.1. Fordított fázisú (RP) töltetek ellenőrzése

Az ODS-fázisok előállítása során, az oktadecil-triklórszilán felvitele után négy különböző utánszilanizálást alkalmaztunk:

1. trimetil-klórszilán gőzzel autoklávban („auto”),
2. főzés trimetil-klórszilánnal toluolban refluxálva („TMCS”),
3. hexametil-diszilazánnal toluolban refluxálva („HMDS”),
4. katalizált szilanizálószerrel: hexametil-diszilán, trimetil-klórszilán, piridin, toluolban refluxálva („HTP”).

A metilvörös tesztet reflexiós fotometria alkalmazásával félkvantitatív eljárásá fejlesztettük. Tapasztalatunk szerint a kromatográfiás viselkedés és a metilvörös teszt eredményei egy-egy töltetsorozaton belül jól egyeznek, így gyártásközi ellenőrzésre jól használhatók. Különböző szilikagélekből készült töltetek összehasonlítása nem volt teljesen eredményes, feltehetően az eltérő szemcseszerkezetű porok eltérő fényvisszaverő tulajdonságai miatt.

Valamennyi fázisból kolonnát töltöttünk és elvégeztük a szokásos ellenőrzési kísérleteket (porozitás vizsgálatok, oszlophatásosság ellenőrzése).

A porozitás méréseket a szilikagéleknél is alkalmazott módszerekkel diklór-metán eluensben polisztirol standardok alkalmazásával kizárásos kromatográfiával végeztük. A fordított fázisú töltetek porozitása minden esetben eltért a kiindulási szilikagék porozitásától. A szilanizálás során a töltet pórusai méretükben, térfogatukban csökkentek, ennek megfelelően a pórusporozitás, a fajlagos felület is csökkent. Egy jól utánszilanizált töltet átlagos pórusátmérője akár 30%-kal is kisebb a kiindulási szilikagél pórusátmérőjéhez képest.

Az utánszilanizálás nagy mértékben befolyásolja az oszlopok töltési minőségére jellemző „A” együtthatót. Úgy is értelmezhetjük az eredményeket, hogy jól utánszilanizált

töltetekből könnyebb hatásos oszlopot tölteni. A van Deemter egyenlet „C” együtthatójára az utánszilanzálásnak jelentős hatása nincs.

Töltetek maradék szilanol aktivitását célszerűen bázikus minták elválasztásával lehet ellenőrizni. Vizsgálatainkhoz anilin és o-fenilén-diamin mintavegyületeket alkalmaztunk. A nem, vagy csak gyengén utánszilanzált tölteteken metanol eluensben mindkét vegyület retenciója jelentős ($k > 50$). A nagyon jól utánszilanzált töltetek esetén („HMDS”, „H-T-P”) az anilin retenciója már igen kicsi ($k < 0,1$). Az o-fenilén-diamin alkalmasabb mintavegyület a felületi szabad szilanolcsoportok mértékének ellenőrzésére. Az o-fenilén-diamin retenciója az utánszilanzálás mértékétől függően 4,3 – 0,06 között volt.

1.2. A pórusszerkezet módosítása

A nagypórusú $\phi > 10$ nm szilikagélek egyrészt előállíthatók speciális reakciókkal, másrészt kisebb pórusméretű szilikagélek utólagos hidrotermális kezelésével. Ebben az esetben autoklávban, magas hőmérsékleten és nyomáson vízgőz hatására a szilikagélek pórusai a nagyobb méretek felé eltolódnak és egyéb jellemzőik (pórus térfogat, fajlagos felület) is ezzel együtt változnak [28].

6. ábra

A pórusméret (d_p) és a fajlagos felület (S) változása a hőmérséklet függvényében

A reakció (a pórusméret növekedése) legjelentősebben a hőmérséklettől függ. A pórusméret és a fajlagos felület egymással ellentétesen változik. Az 6. ábra a pórusméret-fajlagos felület összefüggést három különböző reakcióidővel végzett kísérlet sorozatra (8 óra, 16 óra, 30 óra) tartalmazza. Külön mérésorozattal azt is megállapítottuk, hogy 30 óra reakcióidő elegendő, ha a reakciót 200°C fölött végezzük. Hosszabb reakcióidő alatt már nem változik sem a pórusméret, sem a fajlagos felület. Az eljárással elérhető legnagyobb pórusméret kb. 40 nm, melyhez kb. 20 m² grammonkénti fajlagos felület tartozik. A pórustérfogat változása nem egyenletes, kb. 30 nm átlagos pórusméretig a pórustérfogat gyakorlatilag nem változik, afölött azonban a pórusszerkezet gyorsan összeomlik, a pórustérfogat töredékére csökken.

A pórusméret-eloszlás a hidrotermális reakció során alig változik. Sem a különböző idejű, sem a különböző hőmérsékleten kezelt szilikagélek relatív pórusméret-eloszlása nem változott jelentősen.

1.3. Különleges technológiákkal készült fordított fázisú töltetek

1.3.1. Szilárd fázisú reakciókkal készített töltetek

Fordított fázisú töltetek előállíthatók oly módon is, hogy a szilikagél felületére adszorbeáljuk a szilánt, melyet a felülethez kívánunk rögzíteni, majd a hőmérséklet emelésével és a reakcióban keletkező kismolekulájú melléktermékek folyamatos eltávolításával segítjük elő a reakciót. Ha a reakciót alkoxiszilánokkal végezzük (pl. esetünkben oktil-trietoxiszilánnal, „OCTEO”) akkor a felületi reakció során kilépő vegyület etilalkohol, melyet könnyűszerrel eltávolíthatunk [29].

A felület kémhatását különböző koncentrációjú kénsavoldattal történt öblítés, majd szárítás útján állítottuk be. A kémhatást az így előkezelt szilikagél 5%-os vizes szuszpenziójában mértük. A szilánt benzolos oldatból vittük fel a szilikagélre, majd a benzolt eltávolítva, nitrogénáramban hőkezeltük a szilikagél mintát.

Az előállított töltetknél utánszilanzálás nem történt. Mivel a kiindulási szilikagél fajlagos felülete ismert volt, így a töltetek széntartalmából (%C) a felületi borítottság egyszerűen számolható:

$$\sigma = \%C \times 10^6 \times \{12 \times n \times 100 [1 - (\%C \times MW \times 8.33 \times 10^{-4} \times n^{-1}) \times S]^{-1} \quad [\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}]$$

- n a szénatomok száma a szénláncban (esetünkben 8)
%C a töltet széntartalma szén-hidrogén elemanalízis alapján
MW a szilán molekulatömege (leszámítva a felülettel reagáló csoportokat (=175))
S a fajlagos felület [$\text{m}^2 \times \text{g}^{-1}$]

Alkoxiszilánok és szilikagélek reakciói bázikus és savas katalizátorokkal is elősegíthetők (szilikagél szuszpenziók szilanizálási reakcióiban gyakran alkalmazott katalizátor például a p-toluol-szulfonsav). A szilárdfázisú reakció esetében kézenfekvő volt, hogy a szilikagél felület kémhatását előzetes savas, vagy lúgos kezeléssel (mosással) állítsuk be. A felületi kémhatás igen jelentős hatással van a reakcióra (7. ábra).

7. ábra

A szilikagél felület kémhatásának hatása szilikagél oktadecil-trietoxiszilán (OCTEO) reakciójára.

Körülmények: 150°C; 4 óra; 15% OCTEO benzolban.

A felületi borítottság – kémhatás összefüggés minimumgörbe összefüggés szerint változik. A legalacsonyabb borítottságot – és ezzel együtt a legalacsonyabb retenciokat – a semleges pH körüli tartományban kaptuk. Amíg egy 1,7-es kémhatására beállított szilikagélre közel $4 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}$ oktilcsoportot lehetett felvinni, 5,5-ös pH-n már csak kb. $2,3 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}$ -t. Lúgos tartományban a felületi borítottság a várakozásnak megfelelően ismét nőtt. Itt azonban a kísérleteknek határt szab a szilikagélek mérsékelt lúgállósága. A legmagasabb pH, melyen még kísérletet végeztünk 9,2 volt. Az elérhető borítottság azonban itt sem nagyobb, mint egy kb. pH 5-re beállított szilikagél esetében. Az alkoxiszilánok szilárdfázisú reakciója esetén ezért a reakció bázikus közegben történő kivitelezése nem célszerű.

A szükséges reakcióhőmérséklet és reakcióidő természetesen az alkalmazott szilán függvénye. OCTEO esetében a legjobb eredményeket 150°C hőmérsékleten és 4 óra reakcióidővel lehetett elérni.

1.3.2. Utánszilánizált fázisok gyors előállítás (kvázi „one pot” módszer)

Eljárást dolgoztunk ki kémiaailag kötött fázisú töltetek nagy mennyiségben, viszonylag kevés oldószer és energia felhasználásával történő előállítására [30]. A találmány lényege, hogy a „fő” szilánizálás (pl. reakció oktadecil-triklórszilánnal, vagy γ -cianopropil-trietoxi-szilánnal) és az utánszilánizálás között a töltetet csak egy gyors öblítésnek vetjük alá (toluol, diklór-metán, metanol, toluol), majd ismét toluolban szuszpendálva történik az utánszilánizálás. Az így készült töltetek összefoglaló jellemzése az 1. és 2. táblázatban látható.

1. táblázat „Gyors” módszerrel előállított fordított fázisú töltetek minősítése

| Kísérlés száma | Szén tartal- lom | Retenciók (k') és tányérmagasság (H ; μm) $1 \text{ mm} \times \text{sec}^{-1}$ lineáris áramlási sebességnél | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|--|---------|--------|-----|----------|-----|-------|-----|-----------|-----|
| | | <i>o</i> - Fenilén diamin | Lutidin | Benzol | | Antracén | | Pirén | | Benzpirén | |
| | % | k' | k' | k' | H | k' | H | k' | H | k' | H |
| 1 | 17,4 | 0,07 | 0,50 | 0,20 | 29 | 0,64 | 32 | 0,95 | 34 | 1,84 | 36 |
| 2 | 17,6 | 0,05 | 0,40 | 0,23 | 24 | 0,65 | 28 | 1,00 | 30 | 2,04 | 32 |
| 3 | 18,0 | 0,02 | 0,20 | 0,20 | 17 | 0,60 | 18 | 1,00 | 19 | 1,92 | 19 |

Megjegyzés: az 1-2 töltetek 10 μm szemcseméretű szilikagélből, a 3. töltet 6 μm szemcseméretű szilikagélből készült.

2. táblázat „Gyors” módszerrel előállított ciano fázisú töltetek jellemzése

| Kísérlet száma | Szén-tartalom % | Retenciók (k') és tányérmagasság (H ; μm) $u= 1,5 \text{ mm} \times \text{sec}^{-1}$ sebességnél | | | | | |
|----------------|-----------------|---|-----------------------|----------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| | | Benzol | | o-Nitro-toluol | | 2,4-Dinitro-toluol | |
| | | k' | H [μm] | k' | H [μm] | k' | H [μm] |
| 1 | 4,5 | 0,1 | 18 | 0,8 | 19 | 3,1 | 21 |
| 2 | 4,7 | 0,1 | 22 | 0,9 | 23 | 3,2 | 27 |

Megjegyzés: az (1) töltet 6 μm szemcseméretű szilikagélből, a (2) töltet 10 μm szemcseméretű szilikagélből készült.

Az eljárást később továbbfejlesztettük. Az első lépésben a szilanizáláshoz kizárólag alkoxiszilánokat alkalmazva, elegendő az első szilanizálás után a terméket csupán egyszer toluollal öblíteni és rögtön ezután sor kerülhet az utánszilanizálásra egy különösen reakcióképes utánszilanizáló eleggyel. Az eljárással jelenleg is nagy mennyiségben készül preparatív célra RP HPLC töltet.

1.4. Az utánszilanizálás hatása fordított fázisú HPLC elválasztásokra

A legtöbb elválasztási feladat esetében egy fordított fázisú töltetet annál jobbnak tartanak, minél egyenletesebben borított a felülete, és minél kevesebb szabad és hozzáférhető szilanolsoport marad a töltet felületén. A fenti megállapítás igaz közepesen, vagy erősen poláris vegyületek, különösen bázikus vegyületek elválasztása esetén. Vannak azonban olyan kromatográfiás elválasztási feladatok is, ahol a kevésbé, vagy egyáltalán nem utánszilanizált fordított fázisú töltet alkalmazása előnyös, amikor a hidrofób kölcsönhatás mellett a szilanofil kölcsönhatás is fontos szerepet játszik [31, 32, 33].

Bizonyos vegyületsoportok, például bázikus anyagok, aromás szénhidrogének retenciója egy fordított fázisú tölteten nem csak a töltet hidrofobicitásától, hanem a szabad szilanolsoportok számától is függ.

Készítettünk két C_{18} töltetet. Az egyik esetben a szilikagél az oktadecil triklórszilánnal gondosan szárított toluolban főztük, a másik esetben a szilikagél hozzáadása előtt vizet adtunk a szilán/toluol elegyhez és az először opalizáló emulziót addig főztük, amíg

kitisztult. Ekkor tettük az elegyhez a szilikagélt. Az első eljárás szerinti töltetet „monomer”, a másodikat „oligomer” fázisnak neveztük.

Mindkét fenti fázis egy-egy részletét különböző erősséggel utánszilanzáltuk. Végül is mind a monomer, mind az oligomer töltetből rendelkezésre állt egy *nem*, egy *gyengén* (csak trimetil-klórszilánnal), és egy *jól* (hexametil-diszilazán/trimetil-klórszilán/piridin eleggyel) utánszilanzált változat.

Tölteteink jellemzésére [melléklet 3. cikk] az „Engelhardt-tesztet” alkalmaztuk: különféle, semleges, savas és bázikus vegyületek retencióját mértük metanol/víz eluensben. (Az Engelhardt-teszt érzékenységének növelése érdekében az elválasztásokat metanol:víz = 1:1 eluensben végeztük. Az eredetileg előírtól eltérően nem alkalmaztunk puffer tartalmú eluenst.) Semleges és savas mintavegyületeink retenciója – a várakozásoknak megfelelően – a fázis hidrofób jellegének növekedésével (a javuló utánszilanzálással, a széntartalom enyhe emelkedésével) emelkedett. Ellenkezően változott viszont a bázikus anyagok retenciója: az utánszilanzálás növekvő mértékével az „Engelhardt-teszt” bázikus mintavegyületeinek retenciója jelentősen csökkent (pl. anilin: 3,10 → 1,50 → 0,81, vagy N,N-dimetil-anilin: >50 → 11,5 → 6,6 (3. táblázat).

3. táblázat

Széntartalom és az „Engelhardt-teszt” vegyületeinek retenciója (k') különböző mértékben utánszilanzált tölteteken

| | Monomer fázisok | | | Oligomer fázisok | | |
|--------------------|-----------------------|----------------|------------|-----------------------|----------------|------------|
| | <i>Nem</i> | <i>Gyengén</i> | <i>Jól</i> | <i>Nem</i> | <i>Gyengén</i> | <i>Jól</i> |
| | utánszilanzált töltet | | | utánszilanzált töltet | | |
| Széntartalom (%) | 14,0 | 15,4 | 15,5 | 17,3 | 17,5 | 17,9 |
| Fenol | 0,77 | 0,79 | 0,82 | 0,75 | 0,78 | 0,66 |
| Etil-benzoát | 5,4 | 6,0 | 6,2 | 5,5 | 6,3 | 5,2 |
| Toluol | 5,5 | 6,5 | 7,1 | 6,3 | 7,9 | 6,5 |
| Etil-benzol | 10,3 | 12,1 | 13,6 | 11,6 | 14,2 | 12,3 |
| Anilin | 3,1 | 1,5 | 0,81 | 4,2 | 1,0 | 0,88 |
| o-Toluidin | 3,5 | 2,1 | 1,3 | 5,8 | 1,4 | 1,2 |
| p-Toluidin | 9,0 | 4,9 | 2,7 | 9,2 | 4,1 | 2,7 |
| N,N-Dimetil-anilin | >>> | 11,5 | 6,6 | >>> | 11,7 | 7,9 |

A szabad szilanolcsoportok hatását jellemző másik kísérletben két semleges tulajdonságú anyagot választottunk el. A nagy π elektron sűrűségű mintavegyület benz[e]pirén, a laza π elektronszerkezetű mintavegyület hexaklór-benzol volt. Víztmentes, vagy vízben szegény eluensben (esetünkben metanolban) a nagyobb „sűrűségű” π elektronrendszerrel rendelkező molekula retenciója egy töltetsoron belül azon a tölteten lesz a legnagyobb, ahol a szabad szilanolcsoportok száma is a legnagyobb. A kis és laza π elektronrendszerrel rendelkező molekula esetén a retenció elsődlegesen a hidrofób kölcsönhatások mértékétől függ, a hozzáférhető szabad szilanolok száma a retenciót jelentősen nem fogja befolyásolni. Várható tehát, hogy a két mintavegyület retenciója a töltet hidrofobicitásának növekedésével (erősebb utánszilanzálás alkalmazásával) eltérő módon és irányban fog változni.

A két mintavegyületre metanol eluensben mért retenciókat a 4. táblázat tartalmazza: a benz[e]pirén, melynek retenciója a hidrofób és szilanofil kölcsönhatásoktól egyaránt függ, az utánszilanzálás erősségének növekedésével, (a szabad szilanol csoportok számának csökkenésével) kb. 20 %-kal csökkent. A töltettel döntően csak hidrofób kölcsönhatásba lépő hexaklór-benzol retenciója kis mértékben emelkedett, - esetleg nem emelkedett - követve a töltetek széntartalom változását.

4. táblázat

Benz(e)pirén és hexaklórbenzol retenciója (k') eltérően utánszilanzált tölteteken

| | Monomer fázisok | | | Oligomer fázisok | | |
|-------------------------|-----------------|----------------|-------------|--|-------------|-------------|
| | <i>Nem</i> | <i>Gyengén</i> | <i>Jól</i> | Nem Gyengén Jól utánszilanzált töltet | | |
| Benz[e]pirén | 1,73 | 1,42 | 1,38 | 1,82 | 1,53 | 1,31 |
| Hexaklór-benzol | 1,19 | 1,29 | 1,40 | 1,45 | 1,48 | 1,48 |
| <i>Széntartalom (%)</i> | <i>14,0</i> | <i>15,4</i> | <i>15,5</i> | <i>17,3</i> | <i>17,5</i> | <i>17,9</i> |

A π elektronrendszer szerepének fontosságát jól mutatta a sok konjugált kettőskötést tartalmazó karotinoid vegyületek elválasztása, az elválasztás szelektivitásának függése az utánszilanzálástól. Az elválasztásokat metanol eluensben végeztük. Mivel ilyen körülmények között több poláris karotinoid (karotinok egy vagy több hidroxi- és epoxi-csoporttal) retenciója túl alacsony és egymáshoz közeleső volt (5. táblázat), megismételtük az elválasztást 6% víz - 94% metanol eluensben is (6. táblázat). A poláris karotinoidok

retenciója a nem utánszilanzált tölteteken volt a legnagyobb, míg az apoláris karotin vegyületek (kriptoxantinok, karotin szénhidrogének, mint az α - és β -karotin) retenciója a jól utánszilanzált tölteteken volt magasabb. A gyengén utánszilanzált töltetek viselkedése - várakozás szerint - a nem utánszilanzált és a jól utánszilanzált töltetek viselkedése közé esett: a poláris karotinoidok retenciója hasonló, mint a jól utánszilanzált tölteten, az apoláris karotinok retenciója pedig a nem utánszilanzált tölteten tapasztalt retencióhoz állt közel.

5. táblázat.

Karotinoidok retenciója (k') metanol eluensben

| | | Monomer fázisok | | | Oligomer fázisok | | |
|----|-----------------------------|---------------------------|---------|--------|---------------------------|---------|--------|
| | | Nem utánszilanzált töltet | Gyengén | Jól | Nem utánszilanzált töltet | Gyengén | Jól |
| 1 | Neoxantin | 0,46 | 0,34 | 0,34 | 0,36 | 0,25 | 0,30 |
| 2 | Violaxantin | 0,71 | 0,44 | 0,44 | 0,63 | 0,35 | 0,38 |
| 3 | Auroxantin 5 | 0,73 | } 0,59 | 0,54 | 0,72 | } 0,50 | } 0,51 |
| 4 | Auroxantin 6 | 0,80 | | 0,58 | 0,78 | | |
| 5 | Lutein epoxid | 0,98 | 0,63 | } 0,66 | 0,84 | } 0,53 | } 0,54 |
| 6 | Anteraxantin | 1,06 | 0,68 | | 0,91 | | |
| 7 | Lutein | 1,41 | 0,93 | } 0,98 | 1,21 | } 0,79 | } 0,80 |
| 8 | Zeaxantin | 1,54 | 0,99 | | 1,34 | | |
| 9 | β -karotin diepoxid | 2,65 | 3,02 | 3,75 | 2,77 | 3,41 | 3,73 |
| 10 | α -kriptoxantin | 3,21 | 3,30 | 4,01 | 3,55 | 3,45 | 3,77 |
| 11 | β -kriptoxantin | 3,52 | 3,60 | 4,34 | 3,91 | 3,82 | 4,13 |
| 12 | β -karotin monoepoxid | 4,67 | 5,74 | 7,51 | 5,75 | 7,25 | 7,97 |
| 13 | α -karotin | 7,31 | 9,85 | 13,6 | 10,72 | 14,25 | 15,85 |
| 14 | β -karotin | 7,98 | 10,60 | 14,60 | 11,88 | 15,55 | 17,28 |

A mintavegyület π elektronrendszere és a töltet szilanofil kölcsönhatásra való hajlamának összefüggésére hívja fel a figyelmet egyes karotinoid izomerek eltérő retenciója is, melyekben a kettőskötések helyzete eltérő (például Lutein epoxid és Anteraxantin, Lutein és Zeaxantin). E vegyületepárosokat jól utánszilanzált tölteteken nem sikerült elválasztani a szokásos fordított fázisú rendszerekben. Ugyanakkor a nem utánszilanzált tölteteken jó elválasztásokat értünk el. A leírt effektusokat a legjobban egy

bonyolult karotin elegy gradiens elúciós technikával történt elválasztása mutatja. Az elegyben karotin szénhidrogének, egy és két alkoholos –OH csoportot tartalmazó vegyületek, valamint alkoholos- és epoxi- csoportokat egyaránt tartalmazó vegyületek voltak. Az azonos gradienssel futtatott elválasztásokon jól látszik, hogy az első csúcsok később, az utolsók előbb jelennek meg a nem utánszilanzált fázison, mint a jobban, illetve legjobban utánszilanzált fázison. (A nem utánszilanzált fázison tehát a teljes nettó analízis idő - az idő az első anyag eluálódásától az utolsó anyag eluálódásáig - rövidebb.) Mégis az előbb említett kritikus párok elválasztása csak a nem utánszilanzált tölteten megfelelő, az utánszilanzáltakon részleges, vagy egyáltalán nincs elválasztás (8. ábra).

6. táblázat. Karotinoidok retenciója (k') metanol:víz = 94:6 eluensben

| | Monomer fázisok | | | Oligomer fázisok | | |
|------------------------|-------------------------------------|----------------|------------|-------------------------------------|----------------|------------|
| | <i>Nem</i> utánszilanzált töltet | <i>Gyengén</i> | <i>Jól</i> | <i>Nem</i> utánszilanzált töltet | <i>Gyengén</i> | <i>Jól</i> |
| Neoxantin | 1,8 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 1,1 | 1,1 |
| Violaxantin | 2,7 | 1,7 | 1,7 | 2,3 | 1,4 | 1,4 |
| Auroxantin 5 | 2,9 | 2,0 | 2,2 | 2,4 | 1,7 | 1,8 |
| Auroxantin 6 | 3,1 | 2,1 | 2,3 | 2,6 | 1,8 | 1,9 |
| Lutein epoxid | 4,1 | 2,6 | 2,8 | 3,4 | 2,2 | 2,2 |
| Anteraxantin | 4,5 | 2,7 | 2,8 | 3,7 | 2,3 | 2,2 |
| Lutein | 6,6 | 4,1 | 4,4 | 5,5 | 3,6 | 3,5 |
| Zeaxantin | 7,2 | 4,3 | 4,4 | 6,0 | 3,7 | 3,5 |
| α -kriptoxantin | 18,3 | 18,7 | 23,5 | 20,2 | 21,1 | 21,9 |
| β -kriptoxantin | 20,2 | 20,3 | 25,3 | 22,1 | 22,9 | 23,7 |

Általánosságban elmondható, hogy nem utánszilanzált fázisokon a poláris karotinoidok retenciója magasabb, mint a jól utánszilanzált fázison, viszont a jól utánszilanzált tölteten ennek ellenkezőjét tapasztaltuk (az apoláris karotinok retenciója nagyobb, mint a nem utánszilanzált fázison). A gyengén utánszilanzált C_{18} tölteten a poláris karotinoidok retenciója hasonló, mint a jól utánszilanzált fázison, a nem poláris karotinoidok retenciója pedig a nem utánszilanzált fázisokon mért retencióhoz áll közel. A gyengén utánszilanzált töltet tehát sem a poláris, sem az apoláris karotinok elválasztására nem optimális.

8. ábra

Karotinoidok elválasztása gradiens elúcióval nem utánszilánizált (A), gyengén utánszilánizált (B) és jól utánszilánizált (C) monomer fázisokon. Csúcsszámolás a melléklet 3. cikkben található.

Körülmények: A eluens: metanol:víz = 88:12; B eluens: metanol; C eluens: acetón:metanol = 1:9.
Gradiens program: 100% A 2 percig, 100% A → 100% B 16 perc alatt, 100 % B 2 percig, 100% B → 100% C 7 perc alatt, 100% C 6 percig. Detektálás: 450 nm.

Külön érdekes a karotinoidek analízise szempontjából néhány egymástól általában nehezen elválasztható párosra a csúcspontok (R) értékek alakulása (7. táblázat). Fontos eredmény, hogy a sok esetben előforduló, de híresen nehéz Lutein-Zeaxantin elválasztás a nem utánszilanzált tölteten valósítható meg [31].

7. táblázat. Csúcspontok (R) néhány karotinoid párosra

| | Monomer C ₁₈ | | | Polimer C ₁₈ | | |
|--|-------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
| | Nem utánszilanzált | TMCS utánszilanzált | HTP utánszilanzált | Nem utánszilanzált | TMCS utánszilanzált | HTP utánszilanzált |
| Neoxantin- <i>Violaxantin</i> | 2.50 | 0.89 | 1.05 | 2.00 | 0.76 | 0.48 |
| <i>Violaxantin-Auroxantin 5</i> | 0.42 | 1.40 | 0.95 | 0.25 | 1.11 | 0.50 |
| <i>Auroxantin 5-Auroxantin 6</i> | 0.51 | 0 | 0.48 | 0.33 | 0 | 0.42 |
| <i>Lutein-epoxid-Anteraxantin</i> | 0.57 | 0.31 | 0 | 0.44 | 0 | 0 |
| <i>Lutein-Zeaxantin</i> | 0.82 | 0.28 | 0 | 0.66 | 0 | 0 |
| <i>β-Karotin diepoxid-α-Kriptoxantin</i> | 3.27 | 1.10 | 1.02 | 1.72 | 0 | 0 |
| <i>α-Kriptoxantin-β-Kriptoxantin</i> | 1.23 | 1.14 | 1.05 | 0.69 | 1.17 | 0.97 |
| <i>α-Karotin-β-Karotin</i> | 1.39 | 1.08 | 0.93 | 0.78 | 1.02 | 1.06 |

Megvizsgáltuk az utánszilanzálás hatását a poliaromások elválasztására [33]. Míg az utánszilanzálás hatására a töltetek széntartalma emelkedett, a mintavegyületek retenciója csökkent (9. ábra) Látható tehát, hogy a PAH-ok retenciójában mind a hidrofób,

mind a szilanofil kölcsönhatásoknak szerepe van hasonlóan, mint a korábban ismertetett karotin vegyületek elválasztásában.

9. ábra

Az utánszilanizálás hatása poliaromás szénhidrogének retenciójára 9 nm (a) és 14,4 nm (b) pórusméretű szilikagélből készített töltetknél

A poliaromás szénhidrogének elválasztására a legalkalmasabbak a mezoporózus szilikagélekre (átlagos pórusméret ~ 20 nm) felvitt, *nem utánszilanizált* C₁₈ töltetek. Utánszilanizálással a töltet széntartalma ugyan nőtt, de az aromás szénhidrogének retenciója és szelektivitása csökkent. Különösen alkalmasnak mutatkoztak az ún. oligomer állófázisok. Az így készült töltetek borítottsága nagyobb, mint a monomer fázisoké, az aromás szénhidrogének retenciója és az elválasztás szelektivitása is jobb (*10. ábra*).

10. ábra

Poliaromás szénhidrogén keverék elválasztása

Column: 250 x 4.6 mm, Packing: C₁₈-PAH, 5µm, Eluent: A: H₂O, B: MeOH, C : CH₃CN
Gradient: 0-1 min 40% A, 50% B, 10% C; 1-15 min to 20% A 60% B 20% C; 15-30 min to 10 %
A 60% B 30% C; 30-35 min to 100% C; 35-52 min 100% C, Detect.: 254 nm.

Peaks: 1. Benzene, 2. Toluene, 3. Carbazole, 4. Azulene, 5. Naphtalene, 6. Acenaphtylene, 7. Acenaphtene, 8. Fluorene, 9. Phenanthrene, 10. Anthracene, 11. 4,5-Methylenephen-anthrene, 12. Fluoranthene, 13. Pyrene, 14. Benzo/b/anthracene, 15. Benzo/b/fluorene, 16. 11-H-Benz/a/fluorene, 17. Benzo/a/anthracene, 18. Chrysene, 19. 1,3,5-Triphenylbenzene, 20. Benzo/b/fluoranthene, 21. Benzo/k/fluoranthene, 22. Dibenzo/a,c/anthracene, 23. Benzo/a/pyrene, 24. Dibenzo/a,h/anthracene, 25. Benzo/g,h,i/perylene, 26. Indeno/1,2,3-cd/pyrene

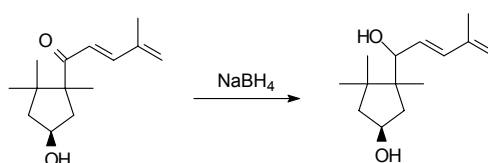
2. Karotinoidok meghatározása növényi mintákból HPLC-vel

2.1. Karotinoidok azonosítása bonyolult sokkomponensű mintákban

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

2.1.1. Oxo karotinoidok:

A nátrium borohidrid a polién aldehideket és ketonokat a megfelelő alkoholokká redukálja standard körülmények között [35, 42, 34].



11. ábra. A κ -végcsoport redukciója

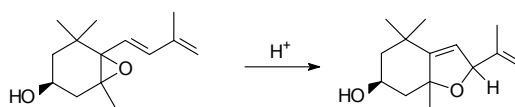
A redukciós termékeket rendszerint könnyű megkülönböztetni az anyavegyülettől az eltérő polaritásuk miatt. Ha a karbonil csoportok konjugációban vannak a poliénlánccal, a redukciót hipszokróm eltolódás kíséri (7-28 nm) a karbonil csoport pozíciójától függően. A megváltozott polaritás és az elnyelési maximum diagnosztikus értékű az oxo és nem-oxo karotinoidok megkülönböztetésére. A t_R értékek és a csúcs intenzitások a β -citraurin, kapszantin valamint a redukciós termékek esetében eltérőek, míg a nem-oxo karotinoidok esetében változatlanok a redukció előtt és után (8. táblázat). Megfelelő példa erre az 1. sz. ábra [melléklet 1. sz. cikk], amely kapszorubin, violaxantin és zeaxantin tartalmú elegy kromatogramját mutatja redukció előtt és után. A kromatogramon látható, hogy csupán a kapszorubin redukálódott kapszorubollá borohidriddel, amely bizonyítja az oxo jelleget. A csúcsmagasságok aránya a kapszorubin és kapszorubol esetében 500 nm-nél (8. táblázat) mutatja, hogy a karbonil csoport konjugációban van a kromoforral.

8. táblázat
A csúcsmagasságok relatív értékei a 428 nm-en mért magasságokhoz viszonyítva

| Vegyület neve | Vegy. száma | t _R min | Csúcsmagasság a 428 nm-es értékhez viszonyítva | | | | | Enyelési maximum (nm) benzolban |
|----------------------------|-----------------|--------------------|--|--------|--------|--------|--------|---------------------------------|
| | | | 500 nm | 480 nm | 402 nm | 380 nm | 340 nm | |
| β-Citraurin | I | 8.0 | 1.30 | 1.56 | 0.64 | | | 492 469 |
| β-Citraurin alkohol | II | 5.7 | 0.06 | 0.33 | 0.82 | | | 462 434 413 |
| Kapszantin | III | 11.3 | 2.71 | 2.82 | 0.78 | 0.30 | 0.24 | 510 484 |
| 13- <i>cisz</i> Kapszantin | 13- <i>cisz</i> | 14.7 | 2.03 | 2.78 | 0.80 | 0.60 | 1.08 | 504 478 362 |
| Kapszantol | IV | 8.1 | 0.73 | 1.73 | 0.85 | 0.33 | 0.10 | 488 459 434 |
| Kapszorubin | V | 5.9 | 4.04 | 4.25 | 0.80 | 0.38 | 0.19 | 522 488 458 |
| Kapszorubol | VI | 3.3 | 0.28 | 1.11 | 0.90 | 0.42 | 0.10 | 480 450 422 |
| Violaxantin | VII | 8.2 | | 0.75 | 0.54 | 0.23 | 0.04 | 483 453 426 |
| Auroxantin | VIII | 10.4 | | 0.1 | 1.15 | 0.77 | 0.12 | 436 409 387 |
| Zeaxantin | IX | 18.5 | | 1.34 | 0.47 | 0.22 | 0.09 | 493 463 438 |
| Anteraxantin | X | 13.4 | | 0.82 | 0.54 | 0.27 | 0.08 | 488 458 434 |
| Mutatoxantin | XI | 15.0 | | 0.16 | 0.72 | 0.38 | 0.08 | 465 437 414 |
| „Neoxantin” | XII | 5.3 | | 0.53 | 0.57 | 0.27 | 0.05 | 478 448 420 |
| Neokróm | XIII | 5.9 | | 0.12 | 0.72 | 0.34 | 0.06 | 459 432 407 |
| Lutein | XIV | 18.4 | | 1.23 | 0.59 | 0.25 | 0.07 | 488 458 433 |
| 13- <i>cisz</i> -Lutein | 13- <i>cisz</i> | 19.5 | | 0.62 | 0.61 | 0.30 | 0.38 | 480 450 428 |
| β-Karotin | XV | 29.5 | | 1.22 | 0.49 | 0.21 | 0.09 | 493 463 438 |

2.1.2. 5,6-Epoxi-karotinoidok

Az 5,6-epoxidok és diepoxidok híg savval kezelve furanoid oxiddá alakulnak [34, 35].



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

Ez a gyors átrendeződés lényeges hipszokrom eltolódást és fokozott polaritást eredményez. Az 1. ábra [melléklet 1. cikk] nem csak a modell oldat (1A) redukcióját, hanem a savkezelést (1B) is mutatja, ahol csak a violaxantin (VII) alakul difuranoid származékká (VIII) és a kromatogram jellegzetes változása mutatja az 5,6-epoxy csoportok jelenlétét a violaxantin molekulában. Nyilvánvaló, hogy a savkezelés a violaxantint difuranoid származékká alakítja, a nátrium borohidrid pedig a kapszorubint kapszorubollá redukálja, míg a savkezelés illetve a redukció nincs hatással a zeaxantinra (IX). Tehát a

csúcsokat a következőképpen azonosíthatjuk: 1 kapszorubin (V), 2 violaxantin (VII) és 3 zeaxantin (IX).

2.1.3. 5,8,5',8'-diepoxi karotinoidok (difuranoid oxidok)

A difuranoid oxidokat a karotinoidok többségétől a rövid abszorpciós maximum alapján lehet megkülönböztetni. Így a difuranoid oxidok nem mutatnak elnyelést 480 nm-nél, melyet általában a karotinoidok meghatározásánál használnak, viszont magas elnyelési értéket mutatnak 380 nm-nél. Például, az auroxantin és zeaxantin fő elnyelési maximumai kb. 40 nm-el térnek el (8. táblázat), amely jelentős különbséget eredményez a csúcsok intenzitásában 480 és 380 nm-en.

2.1.4. *Cisz*-karotinoidok magas *cisz*-peakkel

13-*cisz*, 15-*cisz* és néhány di-*cisz* karotinoid ultraibolya spektrumában az úgynevezett *cisz*-peak jelenik meg 300-350 nm-es tartományban [36]. A távolság a *cisz*-peak és az all-*transz* vegyület leghosszabb λ_{\max} helyzete között 140-150 nm. A *cisz*-peak intenzitása ($E_{\text{cisz-peak}}$) 50-60%-al alacsonyabb mint $E_{480\text{nm}}$. Ezt illusztrálja a 2. ábrán [melléklet 1. cikk] egy HPLC kromatogram, ami 480 nm-en (folyamatos vonal) és 340 nm-en (szaggatott vonal) készült. A 480 és 340 nm-en mért csúcsok aránya az *össz-transz* vegyületre 10, a 9-*cisz*re 10, és a 13-*cisz* formára 2.5 (8. táblázat). Ez egyértelműen bizonyítja hogy a 3-as csúcs egy 13-*cisz* izomert reprezentál.

2.1.5. Példa a módszer alkalmazására

Az egyes karotinoidok azonosítását szemlélteti a mellékletben szereplő cikkben a 3. ábrán látható kromatogram, amely egy növényi extraktum (*Eloдея canadensis*) elszappanosított mintájából készült. A szaggatott vonal a savas kezelés utáni kromatogram. A két kromatogram erősen különbözik egymástól, jelezve az epoxi-karotinoidok jelenlétét. Az 1-es (neoxantin-X) és 2-es (neoxantin; 9-*cisz*-neoxantin-X) csúcsból az 1' (neokróm epimer) és 2' (neokróm epimer) keletkezett, a 3 (violaxantin), a 4 (9-*cisz*-violaxantin) és az 5 (13-*cisz*-violaxantin) csúcsokból a 3' (auroxantin epimer), 4' (auroxantin epimer) csúcsok, a 6 (anteraxantin) és 7 (9-*cisz*-anteraxantin) csúcsokból a 6' (mutatoxantin epimer) és 7' (mutatoxantin epimer) csúcsok keletkeztek az epoxidból savas kezelés hatására furanoid-oxiddá átalakulás következtében.

Az 1, 2 és 1', 2'; 3, 4, 5 és 3', 4'; 6, 7 és 6', 7' csúcsok közötti megfelelő retenciós eltolódás jellemző az epoxi-csoport és furanoid-csoport közötti polaritás különbségre, ami a modell-vegyületeknél (8. táblázat) is látható. A savazás előtti és utáni kromatogramban

mérhető csúcsterület arányok (480 nm) erősen különböznek az 5,6,5',6'-diepoxi (3, 4, 5 csúcsok), 5,6-epoxi (1, 2, 6, 7 csúcsok) és a nem-epoxi karotinoidok (8, 9, 10 csúcsok) esetében:

$$\begin{aligned} (3 + 4 + 5)/(3' + 4') &\geq 50 \\ (1 + 2)/(1' + 2') &\geq 7 \\ (6 + 7)/(6' + 7') &\geq 10 \\ 8/8' &\cong 1,2 \\ 9/9' &\cong 0,7 \\ 10/10' &\cong 1,2 \end{aligned}$$

A 480 és 380 nm-en (*) mért csúcsterület arányok még egyértelműbben bizonyítják, hogy a 3',4'[(3' + 4')/(3' + 4')* \cong 0.01] difuranoid-oxidokat, az 1',2',6',7'[(1' + 2')/(1' + 2')* \cong 0.2, (6' + 7')/(6' + 7')* \cong 0.2] pedig monofuranoid-oxidokat, míg a 8' és 10'[(8')/(8')* \cong 2, (10')/(10')* \cong 10] nem-epoxid típusú karotinoidokat reprezentálnak.

A 340 nm-en mért csúcsmagasság értékek azt mutatják, hogy az 5 és 9 csúcsok 13- vagy 15-*cisz* izomereket jelenthetnek. Ezen csúcsok 480 és 340 nm-en (**) mért csúcsterületeinek aránya sokkal alacsonyabb, mint a többi [5/(5)** \cong 2,9/(9')** \cong 2], ami szintén ezt bizonyítja.

A nátrium borohidrides redukció nem okozott retenciós változásokat, ami arra utal, hogy az *Elodea canadensis* mintája nem tartalmaz oxo-karotinoidokat.

2.2. Az azonosítási módszer alkalmazása paprikamintákra

Az előző (2.1.) pontban leírt módszert alkalmaztuk paprikaminták karotinoidtartalmának meghatározására.

A piros paprika termékek festék koncentrációjának meghatározása régóta a teljes karotinoid tartalom kolorimetriás [37], majd fotometriás és spektrofotometriás mérése [38, 39] alapján történt. Az oszlopkromatográfiás, [40] papír- és vékonyréteg kromatográfiás [41] eljárások túl bonyolultnak bizonyultak ipari célokra. A „redukciós eljárás” [42] lehetővé tette a piros és teljes (piros+sárga) festéktartalom kromatográfiás eljárás nélküli meghatározását, viszont nem szolgál elegendő információval az egyedi karotinoidokról, ami az ipari és mezőgazdasági kutatásoknál nagyon fontos lehet. Itt bemutatjuk, hogy a HPLC felhasználható olyan karotinoid analízisre, mely a kutatók igényeinek is eleget tesz [melléklet 2. cikk].

2.2.1. Elszappanosítás

A HPLC analízishez az epifázikus karotinoidokat el kell szappanosítani, hogy önálló vegyületekként azonosíthassuk. A heterogén és homogén fázisú elszappanosítást is kipróbáltuk [43]. Minimális veszteséget találtunk (5-10%) az elszappanosítás utáni karotinoid tartalomban (9. táblázat).

9. táblázat. Paprikaminták karotinoidtartalma különböző módszerekkel mérve

| Minta | Szín index ^c (10 ⁻³) | Benedek szám | | Redukciós eljárás | | HPLC eljárás | |
|-------|--|------------------------------------|---|--|------------------------|--|------------------------|
| | | Extraktum (g kg ⁻¹) | Szappanosí- tott extraktum (g kg ⁻¹) | Összes pigment (g kg ⁻¹) | Piros részek (%) | Összes pigment (g kg ⁻¹) | Piros részek (%) |
| OR 1 | 20 | 14.2 | 12.6 | 15.7 | 68.8 | 12.5 | 72.9 |
| OR 2 | 40 | 26.6 | 24.0 | 29.0 | 69.2 | 26.6 | 74.5 |
| OR 3 | 60 | 46.7 | 40.6 | 49.8 | 67.4 | 36.9 | 71.5 |
| OR 4 | 80 | 53.1 | 48.7 | 56.9 | 68.6 | 48.3 | 72.4 |
| OR 5 | 100 | 75.2 | 66.5 | 82.0 | 68.6 | 66.4 | 72.2 |
| OR 6 | 40 | 26.2 | 23.1 | 28.3 | 75.0 | 23.6 | 69.4 |
| OR 7 | 60 | 41.9 | 37.5 | 44.6 | 68.0 | 38.8 | 69.2 |
| OR 8 | 80 | 56.0 | 50.2 | 61.6 | 68.2 | 52.4 | 67.4 |
| OR 9 | 100 | 63.8 | 58.9 | 68.0 | 60.0 | 63.5 | 64.5 |
| GP 1 | - | 7.2 | 6.5 | 6.9 | 66.7 | 6.91 | 64.1 |
| GP 2 | - | 3.4 | 3.1 | 3.4 | 59.4 | 3.06 | 59.7 |
| P 1 | - | 17.6 | 17.3 | 19.0 | 54.3 | 16.5 | 56.1 |

OR: oleorezin; GP: paprika por; P: paprika termés;

^c Az üzemi minőségkontrol eredménye

2.2.2. Karotinoidok azonosítása

A csúcsok azonosítása egyrészt autentikus mintákkal történő együttkromatografálással, másrészt a korábban említett származékképzési reakciókkal (savazás, redukció), valamint különböző hullámhosszokon mért kromatogramokkal történt.

A mellékletben szereplő cikkben [melléklet 2. cikk] az 1a és 1b ábra 510, 480 és 428 nm-en mért kromatogramokat mutat. Az 1, 2, 5, 6 és 13a csúcsok eszerint konjugált oxo-csoportot tartalmaznak, mivel 510 nm-en erős abszorpciót mutatnak, míg 428 nm-en gyengét. Ezt erősítette meg a NaBH₄-el történt redukció után készített kromatogram (2. ábra [melléklet 2. cikk]), ahol is az 1, 2, 5, 6 és 13 csúcsok ennek megfelelő retenció

csökkenést mutattak. Ezután az eredeti extraktumot savas kezelésnek vetettük alá, hogy a mintában előforduló 5,6-epoxidok furanoid-oxidokká alakuljanak, amelyek szintén λ_{\max} és t_R változást okoznak (3. ábra [melléklet 2. cikk]). A kromatogramon látszik, hogy a 2 és 4 csúcsok 5,6-epoxi karaktert mutatnak. A 4. ábrán [melléklet 2. cikk] olyan mintának a kromatogramja látható, amit savas kezelésnek és NaBH_4 redukciónak egyaránt alávetettünk. Ez egyértelműbben mutatja, hogy a 2, 7 és 8 csúcsok szintén 5,6-epoxi karotinoidek. A 428 nm-en készült kromatogram (5. ábra [melléklet 2. cikk]) mutatja, hogy a 2', 6', 7', 8', és 9' csúcsok furanoid oxidok, amelyek az 5,6-epoxidokból keletkeztek.

Ezen paprikaminta karotinoideit tehát 4 csoportra oszthatjuk: a) oxo- és 5,6-epoxi csoportokat egyaránt tartalmaznak (2 csúcs); b) oxo csoportokat tartalmaznak (1, 5, 6, 7, 8, 13 csúcsok); c) 5,6-epoxi karakterrel rendelkező karotinoidek (4, 6, 8 csúcsok); d) sem oxo sem epoxi karakterrel nem rendelkeznek (3, 9, 10, 11, 14, 15 csúcsok).

Ezek alapján a csúcsok többségét standard anyagokkal azonosítani tudtuk, viszont a 3, 5 és 10 valamint a 7' csúcsokra csak karakterisztikus jellemzést adhattunk. Ezek pontos szerkezetigazolása a későbbiekben megtörtént.

2.2.3. Mennyiségi kiértékelés

A mennyiségi kiértékelést a csúcsterületek mérésével, a kantaxantin belső standardhoz viszonyítva végeztük el. Széles koncentráció arányban (0,1-10) elvégeztük a terület arány kalibrációt a fő karotinoidek, így a kapszorubinra, a kapszantinra, a zeaxantinra és a β -karotinra. Példaként a kapszantin kalibrációját mutatjuk be (13. ábra).

13. ábra A kapszantin kalibrációs görbéje

Az elért felbontás és a csúcsok alakja lehetővé tette a minták kvantitatív kiértékelését 7 karotinoid esetében, amit a 10. táblázatban foglaltunk össze. A kvantitatív kiértékelés részletei a függelékben lévő cikk 316-321. oldalain található.

10. táblázat
Oleorezinek és paprikaporok fő karotinoidjainak %-os megoszlása

| Minta | Összes pigment (g kg ⁻¹) | Az össz-karotinoid tartalom százalékában | | | | | | |
|-------|--------------------------------------|--|--------------|------------|-----------|---------------|-----------------|-----------|
| | | Kapszorubin | Violaxanthin | Kapszantin | Zeaxantin | Kriptokapszin | β-Kriptokapszin | β-Karotin |
| OR 1 | 12.5 | 4.56 | 3.13 | 67.76 | 14.00 | 0.60 | 4.00 | 6.32 |
| OR 2 | 26.6 | 5.30 | 3.76 | 68.74 | 12.62 | 0.49 | 3.96 | 5.15 |
| OR 3 | 36.9 | 4.25 | 3.33 | 66.56 | 13.50 | 0.68 | 4.85 | 6.78 |
| OR 4 | 48.3 | 4.91 | 2.84 | 66.85 | 13.40 | 0.66 | 4.49 | 6.81 |
| OR 5 | 66.4 | 5.62 | 3.46 | 66.04 | 13.55 | 0.56 | 4.25 | 6.52 |
| OR 6 | 23.6 | 7.76 | 2.54 | 59.45 | 11.45 | 2.07 | 5.89 | 10.81 |
| OR 7 | 38.8 | 7.60 | 2.81 | 59.74 | 11.89 | 1.88 | 5.59 | 10.51 |
| OR 8 | 52.4 | 7.61 | 3.21 | 57.78 | 12.60 | 2.04 | 5.84 | 10.95 |
| OR 9 | 63.5 | 4.30 | 3.17 | 58.85 | 16.12 | 1.31 | 5.37 | 10.90 |
| GP 1 | 6.04 | 5.46 | 6.62 | 54.80 | 24.25 | 0.41 | 3.89 | 4.55 |
| GP 2 | 3.06 | 5.23 | 5.23 | 57.51 | 18.95 | 0.98 | 5.88 | 6.21 |

Ezzel a módszerrel 16 csúcsot detektáltunk, amelyek közül 4-et nem tudtunk az eddig ismert paprika karotinoidok közül egyikkel sem azonosítani.

A kvantitatív kiértékelés pontosságát illetve a mérés reprodukálhatóságát mutatja a 11. táblázat.

11. táblázat
Érett paprika karotinoid összetétele

| Karotinoid | Pigment tartalom (g kg ⁻¹) | Teljes pigment százalék (%) | Standard eltérés (g kg ⁻¹) |
|--|--|-----------------------------|--|
| Kapszorubin | 37.45 | 9.54 | 1.25 |
| Kapszantin epoxid | 10.15 | 2.59 | 0.52 |
| Violaxantin és „Pigment-1” | 30.98 | 7.89 | 2.32 |
| „Pigment-2” | 15.93 | 4.06 | 2.04 |
| Kapszantin és „Pigment-3” | 149.35 | 38.09 | 3.68 |
| Anteraxantin és 13- <i>cis</i> -kapszantin | 19.73 | 5.02 | 1.40 |
| „Pigment-4” | 16.44 | 4.19 | 0.84 |
| Zeaxantin | 15.70 | 4.00 | 0.31 |
| Kriptokapszin | 7.07 | 1.80 | 0.54 |
| β-Kriptoxantin | 16.56 | 4.22 | 0.45 |
| β-Karotin | 73.04 | 18.60 | 1.84 |
| Összes | 392.2 | 100.00 | 9.56 |
| Piros részek | 220.1 | 56.1 | 4.41 |

2.3. Karotinoid-összetétel vizsgálata különböző paprikafajtákban

A különböző paprikafajtákkal kapcsolatos vizsgálatainkat 1986-ben kezdtük. Hosszadalmas munka során választottuk ki az elválasztáshoz leginkább megfelelő HPLC tölteteket, amelyek az abban az időben az intézetünkben gyártott Chromsil C₁₈ (Labor MIM) töltet családba tartoztak. Ezek a töltetek ekkor már elegendően stabilak és reprodukálhatóak voltak ahhoz, hogy átfogóbb felderítő munkába kezdjünk ebben a témában is. A kromatográfiás rendszerünk is sokkal megbízhatóbb, és hatékonyabb lett erre az időre az elektronikus vezérlésű gradiensképzővel és az új típusú pumpával. Szilikagél, aminofázisú, cianofázisú és C₁₈-as Chromsil tölteteket vizsgáltunk olyan szempontból, hogy milyen a stabilitásuk a gradienselúciós körülmények között, milyen a bonyolult paprika extraktum elválasztása, és milyen könnyen reprodukálható, regenerálható a töltet. A teljes analízisidőt ugyanis jelentősen megnövelheti, ha a gradiens

utáni visszamosási fázis sok időt igényel. Minden gradienselúciós módszernél lényeges ez a visszamosás, de különösen ilyen esetben, amikor egy úgynevezett nemvizes gradiens lépés is szükségeltetik. A C₁₈-as töltetet láttuk a leginkább használhatónak sorozatmérések végrehajtására. Egy olyan gradiens programot dolgoztunk ki, amellyel a karotinoidok teljes polaritás tartományát a viszonylag poláris, több funkciós csoportot tartalmazó vegyületektől a teljesen apoláris szénhidrogén karotinoidokig sikerült átfogni. Az utánszilanzált töltettel nem tudtuk a zeaxantin és lutein szétválasztását megoldani, ezért ezek elválasztására egy másik típusú, ún. nem utánszilanzált töltetet alkalmaztunk.

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

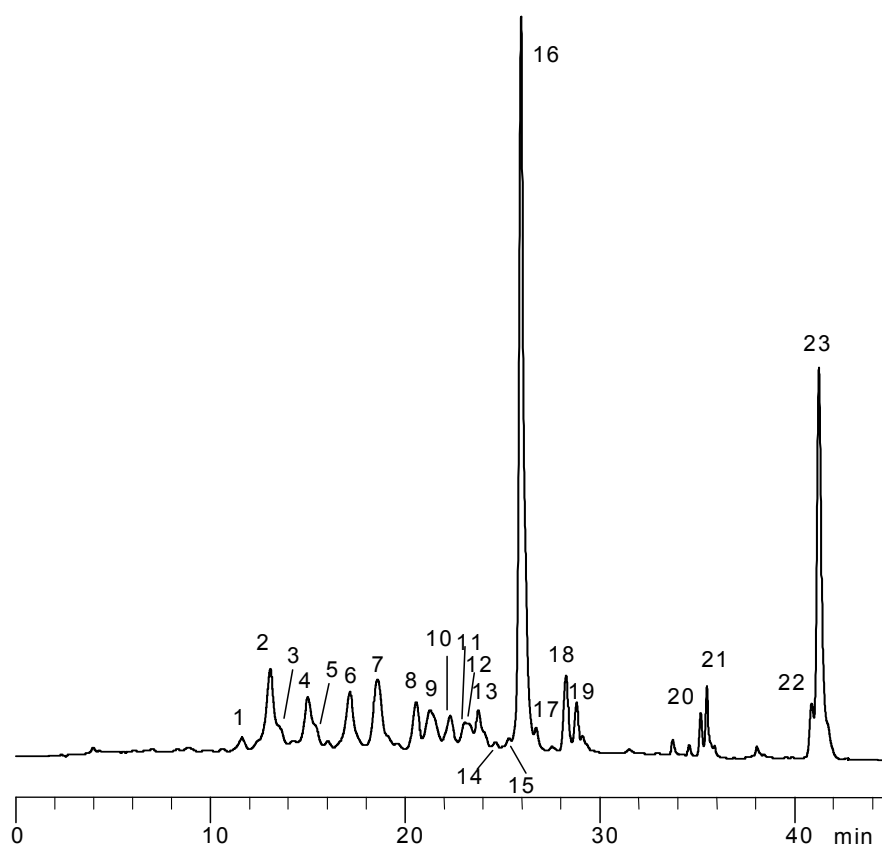
- a) Az extraktum, vagy egyéb minta csúcsait a rendelkezésünkre álló autentikus (MS, CD, NMR spektroszkópiával jellemzett) standard mintákkal az alkalmazott két HPLC rendszeren retenciók alapján azonosítottuk.
- b) A teljes extraktum „savazását”, illetve redukcióját elvégeztük az 5,6-epoxi- és a ketokarotinoidok feltételes azonosítására [44].
- c) UV/VIS detektor alkalmazásánál különböző hullámhosszon végzett detektálással [44], diódasoros detektor használatánál a csúcsok spektruma alapján feltételesen azonosítottuk a furanoidokat, ketokarotinoidokat, illetve *cisz*-izomereket.

Ezzel a módszerrel megvizsgáltuk a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*) [45], a fekete fűszerpaprika (*C.a.* var. *longum nigrum*) [46], a piros paradicsompaprika (*C.a.* var. *lycopersiceforme rubrum*) [47], valamint a Szentesi Kosszarvú (*C.a.* var. *longum ceratoides*) [48] és Bovet-4 jelű paprika (*C.a.* var. *abbreviatum pendens*) [49] karotinoid-összetételének változását az érés során, és következtetéseket vontunk le a paprikakarotinoidok bioszintézisének mechanizmusára. Minden esetben hat érési fokozatban, hat különböző színű paprikát dolgoztunk fel. A későbbiekben még az ún. „kaliforniai paprika” (*C.a.* var. *grossum* cv. Kaliforniai wonder) különböző színű változatainak karotinoidanalízisét is elvégeztük [50]. Részletes adatsorok a sárga paradicsompaprikára (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*), a fekete fűszerpaprikára (*C.a.* var. *longum nigrum*), valamint a Szentesi Kosszarvú paprikára (*C.a.* var. *longum ceratoides*) a mellékletben szereplő különlenyomatokban található.

A paprikafajták különböznek külső megjelenésükben (alak, nagyság, szín), ízükben (pl. csípősségükben) egymástól, a karotinoid-összetétel minden fajta esetében hasonló, és csak a paprika színétől függ. A három jellegzetes színű paprika, a zöld (ezt a klorofill okozza), a sárga és a piros szín eltérő és jellemző karotinoid-összetételt mutat.

Természetesen az érés során a színek fokozatosan átalakulnak, és az ilyen átmeneti állapotokban az összetétel is sokkal bonyolultabb képet mutat. A jellemző, különböző karotinoid-összetételeket öt kromatogramon mutatom be. A különböző paprikafajták részletes karotinoidanalízise, és az ebből levonható következtetések a függelékben szereplő [melléklet 4. 5. 6. cikkek] közleményekben található meg. Mivel az analízisek és az új szerkezetű karotinoidok izolálása párhuzamosan történt, így az újonnan izolált vegyületek közül több is szerepel ezekben a közleményekben, esetenként azonban még hibásan.

Az éretlen (zöld) paprikában, függetlenül attól, hogy az érés végső stádiumában sárga, vagy piros színű lesz-e, mindig a kloroplasztra jellemző karotinoidokat, luteint és β -karotint találunk fő komponensként. Kisebb mennyiségben a neoxantin és a 9-*cis*-neoxantin is megtalálható (14. ábra).



14. ábra. Zöld (éretlen) paprika extraktumának kromatogramja

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

Az érés során, a klorofill eltűnésével a karotinoidok bioszintézise áttevődik a kromoplasztba [39]. A sárga paradicsompaprikában a bioszintézis a karotinoid-5,6-epoxidok képződésével befejeződik, violaxantin és anteraxantin a fő komponensek és ezek furanoidjai (5,8-epoxidok) is megtalálhatók. Az érett sárga paprikában - ellentétben a piros paprikával - nagyobb mennyiségben található ϵ -végcsoporthoz tartozó karotinoidok (α -karotin, α -kriptoxantin, lutein, lutein-5,6-epoxid) [melléklet 4. cikk].

A sárga paradicsompaprikában az érés során végig nagyobb mennyiségben fordul elő lutein és α -kriptoxantin, mint zeaxantin és β -kriptoxantin [melléklet 4. cikk]. A teljesen érett paprikában már az α -karotin is nagyobb mennyiségben található, mint a β -karotin. A sárgára érő paprikában nem sikerült kimutatnunk sem κ -, sem 3,6-epoxi- β , illetve 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoporthoz tartozó karotinoidokat (15.sz. ábra). Így azt a következtetést vontuk le, hogy e két utóbbi végcsoporthoz keletkezése összefüggésben van a κ -végcsoporthoz tartozó bioszintézisével.

15. ábra. Érett sárga paradicsompaprika extraktumának kromatogramja

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

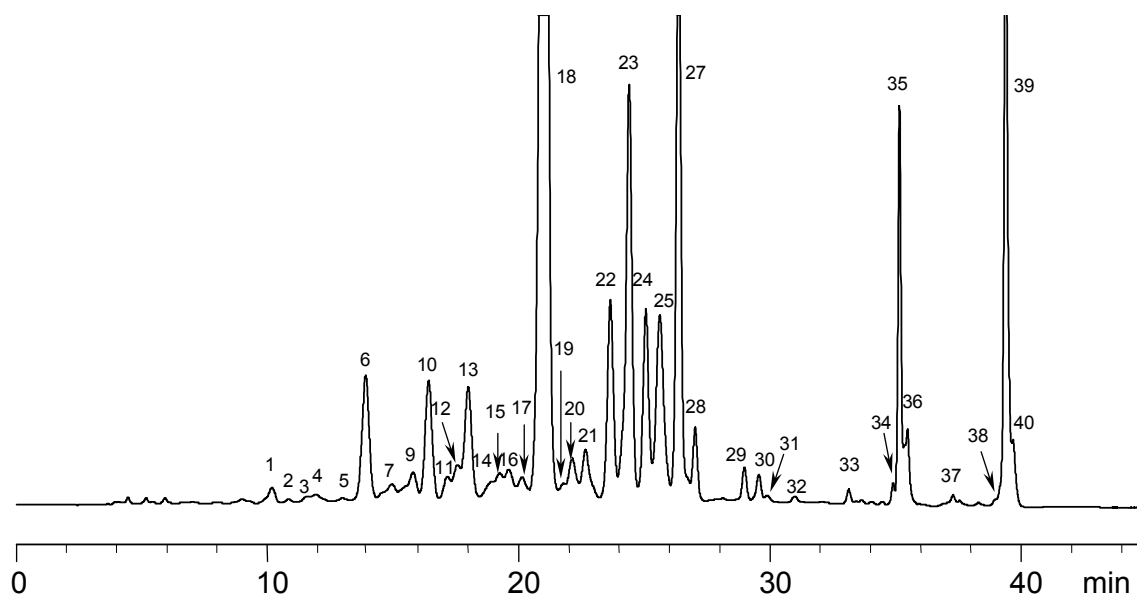
Klasszikus oszlopkromatográfia és HPLC kombinálásával sárga paradicsompaprikában kimutattuk a β -kriptoxantin-5,6-epoxid (a kriptokapszin prekursora) jelenlétét, de kis mennyisége miatt izolálni nem tudtuk [45]. Ezért a későbbiekben előállítottuk a szemiszintetikus β -kriptoxantin-epoxidokat és megállapítottuk, hogy a sárga paprikában található β -kriptoxantin-epoxid a (3*S*,5*R*,6*S*)- β -kriptoxantin-5,6-epoxiddal azonos [51].

A pirosra érő paprikák, a fekete fűszerpaprika (*C.a. var. longum nigrum*) és a piros paradicsompaprika (*C.a. var. lycopersiceforme rubrum*) karotinoid-összetételét fajtától függetlenül hasonlóan találtuk, a karotinoid-tartalom és a karotinoidok egymáshoz viszonyított aránya természetesen eltérést mutatott (16. és 17. ábra).

16. ábra. Fekete fűszerpaprika (*C.a. var. longum nigrum*) kromatogramja

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

[#] csak később azonosítva



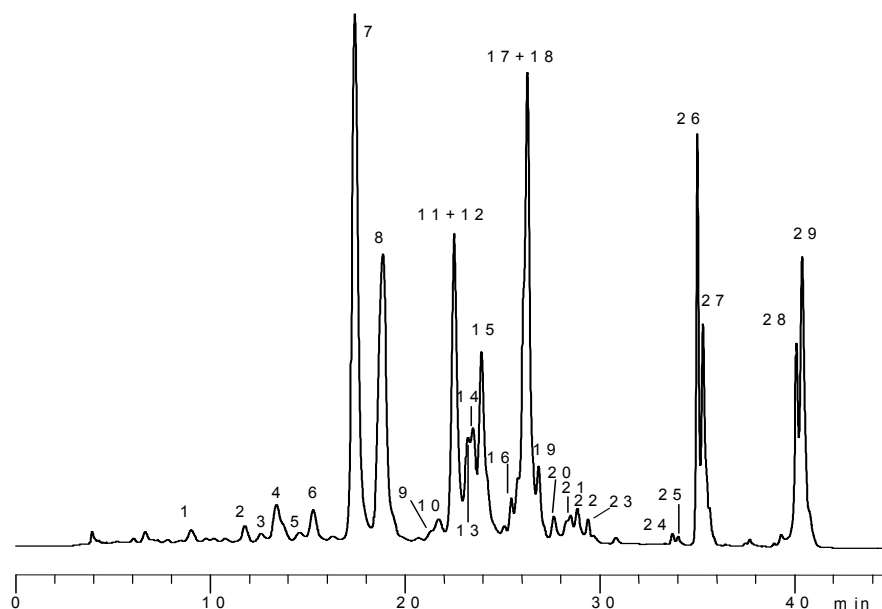
17. ábra. Érett piros fűszerpaprika extraktumának kromatogramja

Csúcsok: **1:** 5,6-diepicapsokarboxanthin; **2:** 5,6-diepilatoxanthin; **6:** capsorubin; **7:** 6-epikarboxanthin; **8:** neoxanthin; **9:** capsanthin 5,6-epoxide; **10:** 5,7-diepokarboxanthin; **11a:** yellow mixt.; **12:** viola-xanthin; **13:** capsanthin 3,6-epoxide; **14:** luteoxanthin 2^c; **15:** luteoxanthin 1^c; **16:** cucurbitaxanthin B; **17:** cucurbitachrome; **18:** capsanthin; **19:** capsanthone; **20:** antheraxanthin; **21:** 8*S*-mutatoxanthin; **22:** 8*R*-mutatoxanthin; **23:** cucurbitaxanthin A; **24:** 9(9')-cis-capsanthin; **25:** 13(13')-cis-capsanthin; **26:** lutein; **27:** zeaxanthin; **28:** nigroxanthin; **29:** 9-cis-zeaxanthin; **30:** 13-cis-zeaxanthin; **31:** 15-cis-zeaxanthin; **33:** cryptocapsin; **34:** α-cryptoxanthin; **35:** β-cryptoxanthin; **36:** cis-cryptoxanthin; **38:** α-carotene; **39:** β-carotene; **40:** cis-β-carotene

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

A vizsgált paprikafajták közül a Szentesi sárga paradicsompaprika sosem pirosodott meg - azaz nem képződtek ketocsoportot tartalmazó karotinoidok - a fűszerpaprika és a piros paradicsompaprika már az érés elején elkezdett pirosodni, a keto-karotinoidok képződése már ekkor megkezdődött [melléklet 6. cikk]. A Szentesi Kosszarvú paprikában és a Szentesi Bovet-4 jelű paprikában - amelyek az érés elején zöld vagy sárga színűek, és csak később kezdenek pirosodni - az érés kezdetén a sárga paprikára jellemző karotinoidok (lutein, neoxantin), és karotinoid-arányok (zeaxantin/lutein, β-

karotin/ α -karotin, β -kriptoxantin/ α -kriptoxantin) található meg, igen alacsony összkarotinoid-tartalom mellett. A pirosodás megindulása után növekszik meg nagyobb mértékben az összkarotinoid-tartalom, a karotinod-összetétel pedig megegyezik a piros fűszerpaprikára jellemző összetétellel [41-49].



18. ábra. Érett sárga kaliforniai paprika extraktumának kromatogramja [50]

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

A későbbiek során megvizsgáltuk a különböző színű, ún. kaliforniai paprika karotinoid összetételét is. A zöld és piros színű paprikák az előzőekben említetthez hasonló összetételt mutattak. Találtunk egy lila színű variánst is, ezt a színt azonban a paprika bőrében lévő antocianidin festékek okozzák, a karotinoid-összetétel a zöld színű paprikáéhoz hasonlított a legjobban. A sárga kaliforniai paprikában néhány új, eddig ismeretlen csúcs tűnt fel (18. ábra). Diódasoros detektor alkalmazásával, és az extraktum redukciójával ezeket a csúcsokat (peak 16, 19, 20) feltételelesen, mint apo-karotinoidokat azonosítottuk. Időközben japán kutatók piros paprikából izolált apo-karotinoidok szerkezetazonosításáról számoltak be [52].

Az elmúlt 10 évben sok közlemény jelent meg, amely különböző piros paprikafajták karotinoidanalízisével foglalkozott [53-62]. Megállapítható, hogy egyetlen kromatográfias rendszer sem közelítette meg az általunk elért elválasztást. Nagyon kevés azon publikációk száma is, amelyben 3,6-epoxi-vegyületek azonosításáról számoltak be [61-62], 3,5,6-trihidroxi-karotinoidokat pedig munkacsoportunkon kívül senki sem azonosított, vagy izolált paprikából.

2.4. A paprika újabb minor karotinoidjainak célzott vizsgálata

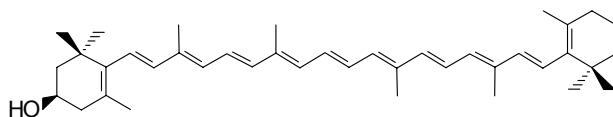
Célul tűztük ki a paprikában kis mennyiségben jelenlévő, eddig még nem azonosított karotinoidok izolálását és pontosabb szerkezetazonosítását. Alapul véve a korábban felvázolt [63] bioszintézis sémát, feltételeztük, hogy további 3,6-epoxi- β -, illetve 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoporthoz tartozó karotinoidoknak kell jelen lenniük a piros paprika extraktumában. Ezen kívül minden piros paprika extraktumban feltűnt egy jellegzetes csúcs (16. ábra: peak 30), melynek izolálását szintén célul tűztük ki.

2.4.1. β -Kriptoxantin-epoxidok előállítása

Az előző fejezetben szerepelt sárga paradicsompaprika extraktumában klasszikus oszlopkromatográfia és HPLC kombinálásával kimutattuk a β -kriptoxantin-5,6-epoxid (a kriptokapszin prekursora) jelenlétét, de kis mennyisége miatt izolálni nem tudtuk [45]. Mivel a β -kriptoxantin-5,6-epoxid teljes szerkezet leírása még nem történt meg, elhatároztuk, hogy előállítjuk a szemiszintetikus vegyületet, β -kriptoxantin monoperoxi-ftálsavval történő reakciójával. A karotinoid-5,6-epoxidok monoperoxi-ftálsavval történő előállítása jól ismert reakció a karotinoidkémiaiban. A reakció során kétféle sztereoizomer, az (5*R*,6*S*)-, illetve az (5*S*,6*R*)-epimer keletkezik. A reagens savas jellege miatt azonban mindig keletkeznek karotinoid-5,8-epoxidok (furanoidok) is, melyek a céltermékek izolálását megnehezítik.

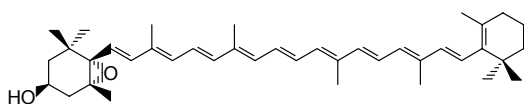
Csak egy epoxidálható végcsoporthoz tartozó (pl. kapszantin, lutein), vagy szimmetrikus (pl. zeaxantin) karotinoidok esetén a keletkező két vagy három epimer elkülönítése többnyire nem okoz problémát. Az általunk kiindulási anyagnak választott β -kriptoxantin nem szimmetrikus szerkezetű, és két epoxidálható β -végcsoporthoz tartozik.

Így a reakció során elvileg négy monoepoxid epimer ($5R,6S$, $5S,6R$, $5'R,6'S$ és $5'S,6'R$), valamint négy diepoxid-epimer ($5R,6S,5'R,6'S$, $5R,6S,5'S,6'R$, $5S,6R,5'R,6'S$ és $5S,6R,5'S,6'R$) keletkezhet. Ezenkívül, mindegyik 5,6-epoxi-végcsoportból további két furanoid-epimer képződhet, $E-Z$ -izomerizáció is lejátszódhat, amely így egy rendkívül komplex rendszert eredményez. Ezért nem is tűztük ki célul az összes lehetséges vegyület izolálását, célunk elsősorban a természetben is előforduló ($3S,5R,6S$)- β -kriptoxantin-5,6-epoxid izolálása és szerkezetének meghatározása volt.

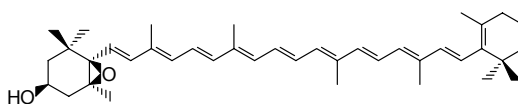


β -Kriptoxantin

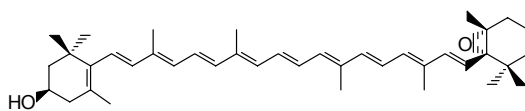
270 mg β -kriptoxantin-acetát éteres oldatát reagáltattuk frissen készített monoperoxi-ftálsav oldattal, az epoxidálás előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követtük. A reakcióelegyet feldolgozva, majd elszappanosítva, ismételt preparatív oszlopkromatográfiát alkalmazva, három β -kriptoxantin-monoepoxidot (**I-III**) és két diepoxidot (**IV-V**) izoláltunk kristályos állapotban, és határoztuk meg konfigurációjukat [51].



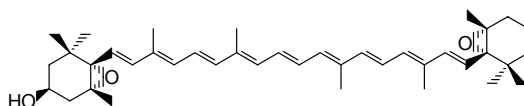
($3S,5R,6S$)- β -Kriptoxantin-5,6-epoxid (**I**)



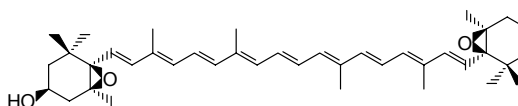
($3S,5S,6R$)- β -Kriptoxantin-5,6-epoxid (**II**)



($3R,5'R,6'S$)- β -Kriptoxantin-5',6'-epoxid (**III**)



($3S,5R,6S,5'R,6'S$)- β -Kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**IV**)

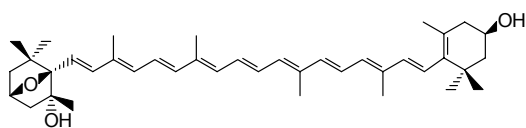


($3S,5S,6R,5'S,6'R$)- β -Kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid (**V**)

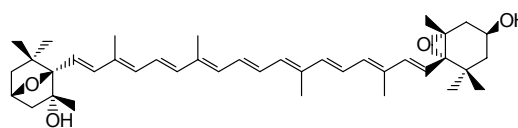
A (3*S*,5*R*,6*S*)- β -kriptoxantin-5,6-epoxidot (**I**) különböző rendszereken együtt-kromatografálva a sárga paradicsompaprikából származó vegyülettel, a kettő azonosságát állapítottuk meg, amely megerősíti azt a megfigyelést, hogy a természetben mindig a (3*S*,5*R*,6*S*) konfigurációval rendelkező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

2.4.2. 3,6-Epoxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok

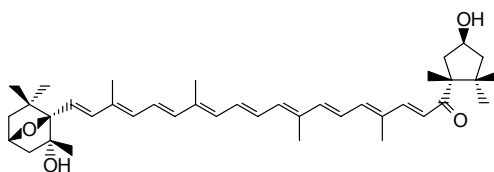
Az első 3,6-epoxi-végcsoportot (7-oxabicyclo[2.2.1]heptil) tartalmazó karotinoidok, az eutreptiellanone, az α -cryptoeutreptiellanone és a β -cryptoeutreptiellanone tengeri algából (*Eutreptiella gymnastica*) való izolálásáról a nyolcvanas évek közepén számoltak be Liaaen-Jensen és munkatársai [64]. 1986-ban, gyakorlatilag egy időben közölték Matsuno és munkatársai [65] a cucurbitaxantin A (**4**) és cucurbitaxantin B (**5**) sütőtökből, Szabolcs és munkatársai [63] pedig a kapszantin-3,6-epoxid (**6**) és a cucurbitaxantin A (**4**) piros paradicsompaprikából való izolálását és szerkezetazonosítását.



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



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

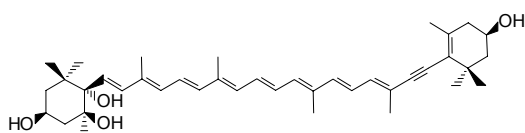


Kapszantin-3,6-epoxid (**6**)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*)-3,6-epoxi-5,6-dihidro-5,3'-dihidroxi- β , κ -karotin-6'-on

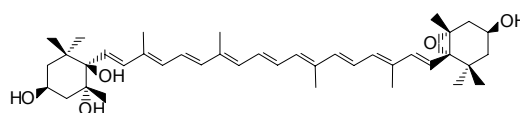
Hosszadalmas munkával sikerült ezen vegyületek szerkezetazonosítását elvégezni, a paprikamintákban való jelenlétét igazolni [66-68].

2.4.3. 3,5,6-Trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidok

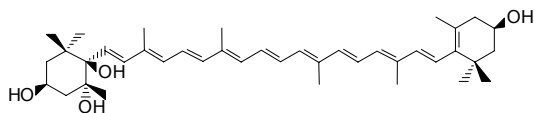
A 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportot tartalmazó karotinoidok különböző gyümölcsökben való jelenlétéről már a 70-es évek elején beszámoltak Gross és munkatársai [69]. A szerkezetazonosítást nem végezték el, csupán UV-VIS és tömegspektrometriai adatok alapján feltételezték a szerkezetet. 1977-ben Eugster és munkatársai karpoxantint (**9**) izoláltak érett csipkebogyóból (*Rosa pomifera*) [70], karpoxantint (**9**) és 6-epikarpoxantint (**10**) tigris liliom (*Lilium tigrinum*) szirmából és porzójából [70], latoxantint (**11**) sárga rózsa (*Rosa foetida*) szirmából [71], valamint neoflort és 6-epineoflort a *Trollius europaeus* nevű alpesi növény szirmából [72]. A karpoxantin (**9**), latoxantin (**11**), és neoflor 3,5,6-trihidroxi-β-végcsoportjára a (3*S*,5*R*,6*R*), míg a 6-epi-vegyületekre (**10**) a (3*S*,5*R*,6*S*)-konfigurációt adták meg.



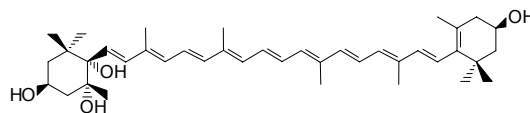
Heteroxanthin (**8**)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*R*)-7',8'-didehidro-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



Latoxanthin (**11**)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*S*)-5',6'-epoxi-5,6,5',6'-tetrahidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol

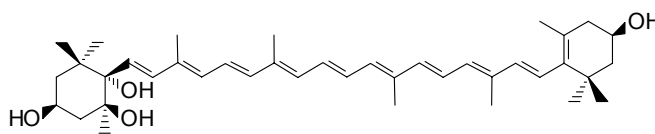


Karpoxanthin (**9**)
(3*S*,5*R*,6*R*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol



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

Nem sokkal ezután számoltak be Szabolcs és munkatársai a piros paprikából izolált karpoxantinról (**14**), melynek konfigurációjára az NMR mérések alapján a (3*S*,5*S*,6*S*)-t javasolták [63], amely ellentétben állt Eugster elképzeléseivel.



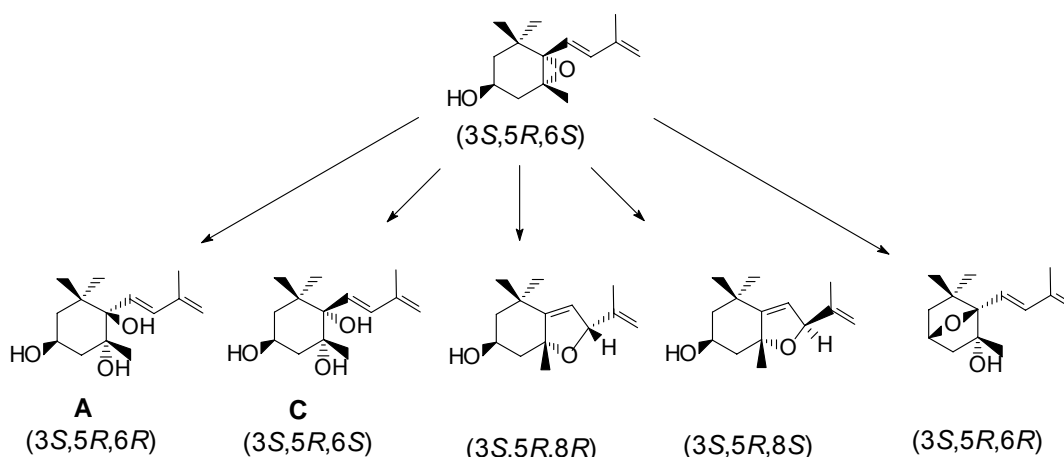
Karpoxanthin (**14**)
(3*S*,5*S*,6*S*,3'*R*)-5,6-dihidro-β,β-karotin-3,5,6,3'-tetrol

A fűszerpaprika hipofázisos extraktumából a már korábban izolált karpoxantinon (**14**) kívül további három vegyületet sikerült izolálnunk, és a konfigurációját meghatároznunk [73].

Újabb eredményeink is ellentétben álltak az Eugster által korábban javasoltakkal, így elhatároztuk, hogy az izolált vegyületek konfigurációjának egyértelmű bizonyításához előállítjuk a további három lehetséges epimert. A szemiszintetikus 3,5,6-trihidroxi-vegyületek adatai megerősítették a természetes 5,6-diepikapszokarpoxantin (*3S,5S,6S*) konfigurációját [74].

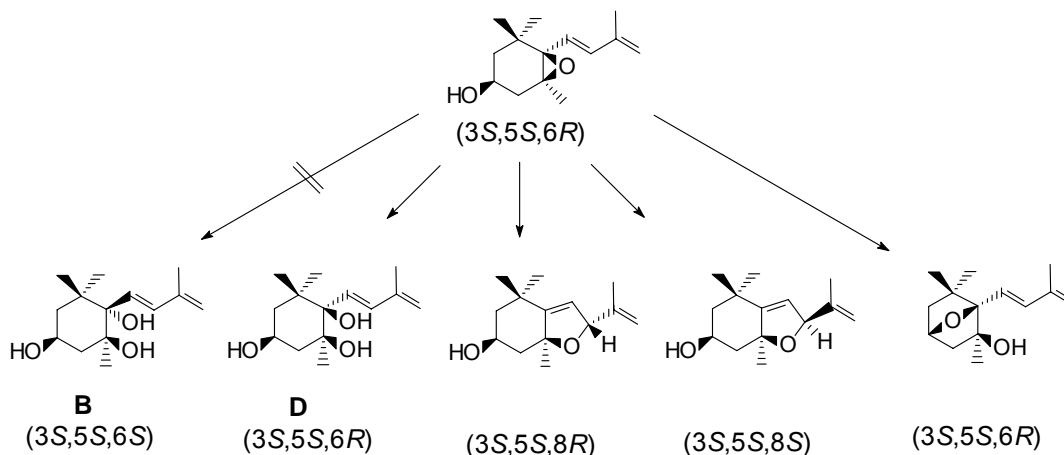
További bizonyítékot szolgáltatottak HPLC vizsgálataink, melynek során a paprikából izolált vegyület elkülönült a szemiszintetikus komponensektől (*19. ábra*)

Saját eredményeink, valamint Eugster korábban közölt eredményei azt mutatják, hogy a karotinoid-5,6-epoxidok savkatalizált gyűrűnyitása csak az 5,6-epoxi-végcsoport konfigurációjától függ, és független a másik végcsoporttól. Így (3*S*,5*R*,6*S*)-3-hidroxi-5,6-epoxi végcsoportot tartalmazó karotinoidból kiindulva minden esetben (3*S*,5*R*,6*R*)- és (3*S*,5*R*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-vegyület keletkezik, a főtermék (3*S*,5*R*,8*R*)- és (3*S*,5*R*,8*S*)-5,8-epoxi-karotinoidok mellett, és (3*S*,5*R*,6*R*) konfigurációjú 3,6-epoxi-karotinoid is detektálható (20. ábra).



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

A (3*S*,5*S*,6*R*)-3-hidroxi-5,6-epoxi-végcsoportot tartalmazó karotinoidból kiindulva, a főtermék (3*S*,5*S*,8*R*)- és (3*S*,5*S*,8*S*)-5,8-epoxi-karotinoidok mellett minden esetben csak egy, (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5,6-trihidroxi-vegyület, és (3*S*,5*S*,6*R*) konfigurációjú 3,6-epoxi-karotinoid keletkezik. A természetben előforduló (3*S*,5*S*,6*S*)-3,5,6-trihidroxi-karotinoid ilyen körülmények között a reakcióelegyben nem mutatható ki (21. ábra).



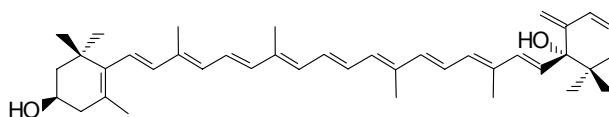
21. ábra. A (3*S*,5*S*,6*R*)-5,6-epoxi-végcsoport savkatalizált gyűrűnyitásának termékei

2.4.4. γ -Végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálása [90,91]

Már a különböző piros paprikafajták HPLC analízisének feltűnt egy csúcs, amely következetesen megjelent a kromatogramban közvetlenül a zeaxantin után (16. ábra: peak 30), és a rendelkezésre álló standard anyagainkkal azonosítani nem tudtuk. Ezért célul tűztük ki izolálását és szerkezetének meghatározását. Mivel a vegyületet először ún. „fekete„ paprikából izoláltuk, így nigroxantinnak neveztük el. A nigroxantin szerkezetének és konfigurációjának kiderítése azonban hosszadalmas feladat volt [76].

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

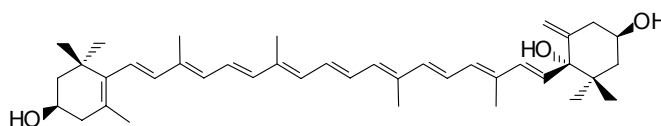
NMR vizsgálataink a Veszprémi Egyetem NMR Laboratóriumában kezdődtek, majd később Bernben folytatódtak.



Nigroxantin

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

Közel tíz évvel a nigroxantin kimutatása és izolálása után sikerült egy újabb, γ -végcsoportot tartalmazó karotinoidot izolálnunk, melyet prenigroxantinnak neveztünk el [77].

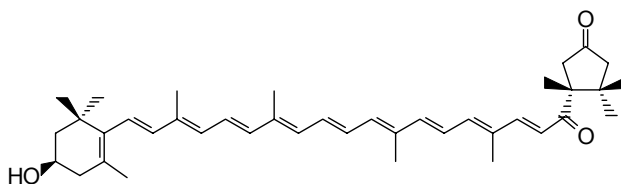


Prenigroxantin

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

2.4.5. Kapszanton izolálása

A kapszanton, kriptokapszon és a kapszorubon jelenlétét a vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum*) porzójában több mint 20 évvel ezelőtt román szerzők írták le, de az izolálást és szerkezetazonosítást nem végezték el. Rüttimann és munkatársai [14] a kapszantin és kapszorubin szintézise kapcsán előállították a szintetikus kapszantont, kriptokapszont és kapszorubont, és elvégezték a spektroszkópai jellemzésüket is. Növényi forrásból származó kapszanton izolálásról az irodalomban nem találtunk utalást.



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

A nigroxantin izolálása során figyeltünk fel arra, hogy a frakcióban mindig található egy piros kísérő festék, amelynek izolálását szintén célul tűztük ki. 22 kg ún. „fekete” fűszerpaprika metanolos extraktumából sikerült 0,8 mg kristályos anyagot nyernünk. A vegyület UV-VIS spektruma (493 nm benzolban), megegyezett az irodalomban [14] leírttal, és a tömegspektrum ($[M]^+ = 582$) is a 3'-oxocsoport jelenlétére utalt. Az izolált anyagot együtt kromatografálva az intézetünkben korábban Szabolcs és munkatársai által [79] kapszantinból Oppenauer oxidációval előállított szemiszintetikus kapszantonnal, egy csúcsot kaptunk, amely szintén az azonosságot erősítette meg [78].

A későbbiek során fűszerpaprikában és más pirosra érő paprikákban is kimutattuk a kapszanton jelenlétét.

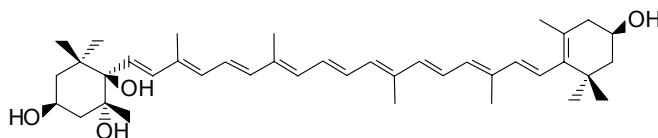
2.5. Egyéb növényi források vizsgálata 3,6-epoxi- β - és 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok izolálására

Munkánk további részében újabb adatokat kívántunk nyerni a 3,6-epoxi-karotinoidok és a 3,5,6-trihidroxi-karotinoidok más növényekben való előfordulására, konfigurációjára, hogy további felvilágosítást kapjunk a bioszintézisben betöltött

szerepükre. Így tehát olyan növényi forrásokat kerestünk, amelyek κ -végcsoportú karotinoidokat tartalmaznak. Az irodalomban kevés olyan növény szerepel, amelyben kapszantin, kapszorubin jelenlétét írták le, és Magyarországon is elérhető. Simpson és munkatársai [80] a spárga (*Asparagus officinalis*) bogyójának karotinoidanalízisét végezték el még a hetvenes években, és kapszantint mutattak ki benne. Neamtu és munkatársai különböző vadgesztenye fajták (*Aesculus*) vékonyréteg-kromatográfias vizsgálata során találtak a porzóban kapszantint, kapszantont, kapszorubint és kapszorubont [81]. Eugster és munkatársai pedig a tigris liliom (*Lilium tigrinum*) szirmában mutatták ki és izolálták a kapszantint és különböző *cis*-izomerjeit.

2.5.1. Tigris liliom (*Lilium tigrinum*)

Eugster és munkatársai a nyolcvanas évek közepén számoltak be a tigris liliom szirmának és porzójának részletes karotinoidanalíziséről [70] melynek során 29 karotinoidot különítettek el, és jellemeztek. Extrém kis mennyiségben egy ismeretlen karotinoidot is izoláltak, és karpoxantinnek azonosították a későbbi munkák során.



Karpoxantin (9)

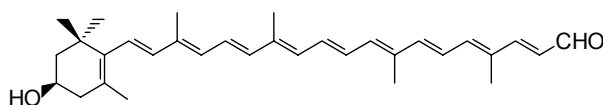
Mivel az Eugster által izolált karpoxantin (9) konfigurációja nem egyezett meg a piros paprikából izolált vegyület konfigurációjával, így célul tűztük ki a liliom szirmában előforduló 3,5,6-trihidroxi-vegyületek izolálását is.

1100 g szirm metanolos extraktumát vizsgáltuk. Elvégeztük a többi frakció, illetve a tigris liliom porzójának karotinoidanalízisét is HPLC-vel, de 3,6-epoxi-karotinoidot nem sikerült egyik frakcióban sem kimutatnunk [82].

2.5.2. Vadgesztenye (*Aesculus*) virág porzójának vizsgálata

Román szerzők korábban különböző *Aesculus* fajták (*Aesculus parviflora*, *A. rubicunda*) porzójának főfestékét kapszantonnak írták le [81]. Mivel az analízist

vékonyréteg-kromatográfiával, az azonosítást pedig csak UV-VIS spektroszkópiával végezték, így ésszerűnek tűnt az újbóli analízist elvégezni. HPLC analízissel megvizsgáltuk a fehér (*Aesculus hippocastanum*) és a piros virágú (*Aesculus pavia*) vadgesztenye rügyének, porzójának és szirmának karotinoid-összetételét. Már az analízis kezdetén kimutattuk, hogy a fő komponens nem kapszanton. Mintegy 250 g porzó extrakciójával sikerült 1,8 mg fő komponenst, 0,8 mg luteint és 0,5 mg β -citaurint kristályos állapotban izolálnunk. Az ismeretlen vegyület (all-*E*,3*R*)-3-hidroxi-6'-apo- β -karotin-6'-al-nak bizonyult, melyet aesculaxantin-nak neveztünk el [83].



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

A két vadgesztenyefajta, a fehér virágú *Aesculus hippocastanum* és a piros virágú *Aesculus pavia* rügyének, porzójának és virágszirmának teljes karotinoidanalízisét is elvégeztük HPLC-vel [84]. Mindkét fajtánál azonos karotinoid-összetételt találtunk. A rügyben luteint, a porzóban az aesculaxantint találtuk fő komponensként, ezenkívül β -karotint, β -kriptoxantint, a lutein *cisz*-izomerjeit, lutein-5,6-epoxidot, az aesculaxantin *cisz*-izomerjeit, β -citaurint, 9-*cisz*-violaxantint, 9-*cisz*-neoxantint és neoxantint azonosítottunk, autentikus mintával történő összekromatografálással. A különböző színű és csíkozású szirmok is hasonló karotinoidokat tartalmaztak, a fő komponens luteinen, lutein-5,6-epoxidon és β -karotinon kívül neoxantint, 9-*cisz*-neoxantint, violaxantint, luteoxantint a lutein *cisz*-izomerjeit, valamint β -kriptoxantint. Egyik növényi szervben sem sikerült κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidot kimutatnunk. Vizsgálataink így azt erősítették meg, hogy szükség van a korábban csak UV-VIS spektrumuk alapján azonosított karotinoidok újbóli izolálására, és modern spektroszkópiás módszerekkel történő szerkezetvizsgálatára.

2.5.3. *Asparagus officinalis* bogyójának vizsgálata [100]

A hetvenes évek közepén számoltak be Simpson és munkatársai a spárga (*Asparagus officinalis*) bogyójának vizsgálatáról [80]. Nagymértékű hasonlóságot találtak

a piros paprika és a spárga bogyó kromoplasztjának szerkezetében, amely a karotinoid-összetételben is megmutatkozott.

A rendelkezésre álló kis mennyiségű mintából csak oszlopkromatográfiával kombinált HPLC analízist tudtunk végezni. Így nemcsak a származékképzési reakciók (redukció, savazás) segítettek az azonosításban, hanem oszlopkromatográfia után az egyes frakciókat is részletesen tudtuk vizsgálni. Bár diódasoros detektor alkalmazásával és autentikus mintákkal való együttkromatografálással kapszantint, kapszantin-5,6-epoxidot és kapszorubint ki tudtunk mutatni nagyobb mennyiségben, sem 3,5,6-trihidroxi- sem 3,6-epoxi-karotinoidot nem tudtunk azonosítani [85].

2.6. Tökök HPLC analízise

2.6.1. Olajtökök analízise

A tökök a paprikához hasonlóan régóta vizsgált fontos karotinoidforrások világszerte.

Az olajtökök sokrétű felhasználása indokolta, hogy a mag présmaradékának egyik értékes, gyógyászati szempontból is fontos vegyületcsoportját, a karotinoidokat részletesebben megvizsgáljuk. A présmaradék karotinoid-összetételét, az egyes komponensek mennyiségét oszlopkromatográfias módszerrel és HPLC-vel határoztuk meg.

A 30-as évek közepén Zechmeister és munkatársai a közönséges tök (*Cucurbita pepo*) virágának szíromleveleiből β -karotint, kriptoxantint (valószínűleg β - és α -kriptoxantin keveréket), luteint, zeaxantint és egy ismeretlen színezéket izoláltak, melyet „petaloxantin”-nak neveztek. Külön vizsgálták a virág zöld és sárga részét, s megállapították, hogy a zöld drog karotinoidjainak fő komponense a lutein (54%), a sárga drog pedig főként zeaxantint (70%) tartalmaz.

Szabolcs és munkatársai 1970-ben elvégezték a közönséges tök (*Cucurbita pepo*) szíromleveleinek és portokjának karotinoid-analízisét [86]. 1986-ban Matsuno és munkatársai sütőtök termésének húsos részét tanulmányozták [65]. A kukurbitaxantin A-t munkacsoportunk is izolálta 1986-ban piros paradicsom-paprikából (*Capsicum annum* var. *lycopersiciforme rubrum*) [63]. A kukurbitaxantin B-t „fekete” paprikából (*Capsicum annum* var. *longum nigrum*) izoláltuk 1990-ben [66, 46]. 1990-ben Neamtu és munkatársai különböző tökfajták levelének, virágának és termésének karotinoid-

összetételét vizsgálták [87]. Megállapították, hogy a levelekben főként β -karotin és lutein van jelen, a virágok főként zeaxantint, β -kriptoxantint, β -karotint, és luteint tartalmaznak, a termések fő karotinoidjai pedig a β -karotin, a lutein és a zeaxantin.

Saját HPLC-analízisünk eredményeként az extraktumból vett mintát kromatografálva 450 nm és 322 nm hullámhosszokon detektálva összesen 22 csúcsot észleltünk (22. *ábra*). A 22 komponens közül 14-et sikerült azonosítanunk (12. *táblázat*). A preparatív oszlopkromatográfiás analízishez hasonlóan itt is találtunk nem azonosítható komponenseket (ld.: *táblázat*, „alacsony hullámhosszúak”). Ezekről nem tudtuk eldönteni, hogy esetleg újszerű, eddig ismeretlen karotinoidok-e, vagy az olajpréselés során keletkezett degradációs műtermékek.

22. ábra: Az olajtök présmaradékából nyert extraktum HPLC-kromatogramja 450 és 322 nm-en

A 12. *táblázat* adataiból látható, hogy a présmaradékból nyert extraktum fő karotinoidjai a lutein és a β -karotin. A *táblázatban* feltüntetett színezékeket retenciós idejük és UV/VIS-spektrumaik alapján azonosítottuk (7. *ábra* [melléklet 7. cikk]).

Érdekességként említhető meg, hogy a présmaradék karotinoidjainak luteintartalma, valamint Zechmeister és munkatársai által vizsgált tökvirág zöld részének luteintartalma [88] jó egyezést mutatott.

Mennyiségi kiértékelés: A százalékos karotinoid-összetétel meghatározásához a diódasoros detektor software által adott lehetőséget kihasználva olyan kromatogramot készítettünk, amelyben minden komponens a saját elnyelési maximumán szerepel (6. ábra [melléklet 7. cikk]). Ezzel jelentősen csökkentettük az eltérő spektrumokból adódó óriási hibalehetőséget. Ezután az integráló software segítségével határoztuk meg a %-os összetételt az ismert vegyületeknél mólextinkciós korrekciót alkalmazva (12. táblázat).

12. táblázat

Cucurbita pepo styriaca magjából nyert présmaradék karotinoid-összetétele

| Csúcscsám | Név | % |
|-----------|-----------------------------|-------|
| 1. | „ Alacsony hullámhosszúak” | 9,92 |
| 2. | | 0,47 |
| 3. | | 0,42 |
| 4. | | 0,18 |
| 5. | Violaxantin | 2,44 |
| 6. | Luteoxantin | 2,34 |
| 7. | Auroxantin epimer | 0,16 |
| 8. | Auroxantin epimer | 0,39 |
| 9. | Auroxantin epimer | 0,98 |
| 10. | Lutein-epoxid | 3,39 |
| 11. | Flavo- és Krizantemaxantin | 1,94 |
| 12. | Lutein | 52,45 |
| 13. | „ Alacsony „ | 0,24 |
| 14. | 9- és 9'-cisz-Lutein | 5,79 |
| 15. | 13-, 13'- és 15-cisz-Lutein | 3,01 |
| 16. | „ Alacsony „ | 0,44 |
| 17. | α -Kriptoxantin | 3,26 |
| 18. | β -Kriptoxantin | 1,99 |
| 19. | Nem azonosított | 0,20 |
| 20. | Nem azonosított | 0,31 |
| 21. | α -Karotin | 0,58 |
| 22. | β -Karotin | 10,12 |

UV/VIS-spektroszkópia útján (2. ábra [melléklet 7. cikk]) meghatároztuk a hipofázikus és epifázikus színezékek arányát, H:E = 56%:44%. A présmaradékban lévő olaj az epifázikus frakcióba került.

További részletes eredmények a mellékletben szereplő közleményben található.

2.6.2. Sütőtök

Nemcsak főzésre és sütésre alkalmas termésfaluk miatt népszerűek, hanem magjuk is hasznosítható becses olajtartalma miatt. Jelentős tokoferol-mennyiségük is. A kobaktermés bélállományából kitűnő ízű leves főzhető, ilyenkor a magban található értékes vegyületek java kioldódik. A kipréselt magmaradvány (pogácsa) sem értéktelen melléktermék, takarmányadalékként hasznosítható, mindemellett karotinoid-összetétele is figyelemre méltó [89]. Vagyis a tökfajok termésének minden része hasznosítható. Értékes anyagai közül kiemelkedő táplálkozásélettani jelentőségük van a karotinoidoknak [90-92].

Miután a tökre egyébként is jellemző az intenzív karotinoid-szintézis, felvetődött a kérdés: vajon a tök magjában lévő, viszonylag nagy méretű sziklevel csírázással meginduló fejlődése során – különböző csíráztatási körülmények között – hogyan alakulnak ki a jellemző karotinoidok, milyen mennyiségi arányok jellemzik a mesterségesen öregített, a fényhiányban nevelt szikleveleket a szórt fényen (szokásos környezeti feltételek között) nőttékhez képest [117]. Ez azért is érdekes lehet, mert adatokat kapunk arra, hogy a sziklevel milyen változásokon megy át főképpen raktározásról fotoszintézisre való áttéréskor.

A virágzáskor leszedett kifejlett lomblevél (természetes körülmények között nevelt növényről gyűjtve) közel kétszer annyi luteint tartalmaz, mint β -karotint, továbbá jellemző rá a neoxantin jelenléte. Viszont a fényen nevelt növények sziklevelében több β -karotin van, mint lutein. Az intenzív fényviszonyok között érvényesülő szeneszencia idején hasonló aránnyal jellemezhetők. A sötétben végbemenő sziklevel-szeneszencia következtében a lutein aránya több mint kétszerese a β -karotinéénak, ez az arány hasonló a lombleveles állapothoz.

Jellemző, hogy a sötétben nevelt egyedekről származó és erős fényen öregedő sziklevelben lényegesen több a violaxantin mennyisége, de a lutein-epoxidé is több, ami arra utal, hogy erős fény hatására a violaxantin és a lutein oxidációs származékai (általában a polárosabb karotinoidok) gyarapodnak. Hasonló, de kisebb mértékű változás minden fényen öregedő sziklevelnél észlelhető. A közönséges körülmények között felnevelt növényről származó lomblevélre különösen a lutein-epoxid aránynövekedése és a – már korábban említett – neoxantin jelenléte jellemző leginkább. Zeaxantint és anteraxantint a lomblevélből sem tudtunk kimutatni. A violaxantin jelenléte mindenképpen arra utal, hogy

a xantofill-ciklus a violaxantin irányába megy végbe, de a fotooxidáció védelmében fő szerepet a nagy mennyiségben található lutein játssza. Valószínű, hogy bőséges tartalékot képez ahhoz, hogy egyirányú változás (a lutein-út) eredményeképpen – szenescencia és/vagy (itt nem vizsgált) fénystressz hatására – oxidációs terméké alakuljon a következő sorrend szerint: lutein, lutein-epoxid, luteoxantin és/vagy neoxantin.

3. Adalékok a karotinoidok biológiai hatásainak felderítéséhez

Állati és emberi eredetű minták karotinoid és A-vitamin tartalmának meghatározása

3.1. Karotinoidok biológiai jelentősége

A karotinoidok az élővilág számtalan egyedében, elsősorban a színes gyümölcsökben, illetve zöldségfélékben megtalálható, 40 szénatomos, kiterjedt konjugációval rendelkező poliizoprének. Kis mennyiségben szinte minden növényben megtalálhatók és jelen vannak az emberi és több állati szervezetben. Karotinoidok szintézisére csak néhány mikroba, különféle algák és a magasabbrendű növények szervezete képes. Az emberi és állati szervezetek a táplálékkal jutnak a számukra fontos, esetenként nélkülözhetetlen karotinoidokhoz, melyek néhány állati szervezetben jellegzetes pigmentekké alakulnak át. A karotinoidoknak az állati és az emberi szervezetben kifejtett hatásaira először azok a kísérletek hívták fel a figyelmet amelyek azt igazolták, hogy a vegyületcsalád alapvegyületének tekinthető béta-karotinnak A-vitamin hatása van.

A további kísérletek azt mutatták, hogy az A-provitaminhatás nemcsak a béta-karotin, hanem minden olyan karotinoid esetén megfigyelhető volt, amelynek molekulája végcsoportként legalább egy szubsztituálatlan béta-ionon gyűrűt tartalmaz. Az ilyen szerkezeti tulajdonsággal rendelkező karotinoidokból felszívódásuk után a C(15)=C(15') kötés szelektív oxidációjával a végcsoportok szerkezetétől függően egy vagy két retinal molekula keletkezhet. Az utóbbi évtizedekben azonban folyamatosan nőtt azoknak a közleményeknek a száma, amelyek azt igazolják, hogy a béta-karotin az emberek számára több, mint egy provitamin. Így például számos epidemiológiai vizsgálat eredménye igazolta, hogy a karotin tartalmú növényi táplálékok (így például a paradicsom, paprika, sárgarépa, stb) fogyasztása, illetve a szérum karotinoidszint emelkedése csökkenti néhány daganatos megbetegedés, kardiovaszkuláris problémák, illetve a szürkehályog (katarakta) előfordulásának gyakoriságát.

Ugyanakkor számos vizsgálat eredménye alátámasztja azt a feltételezést, hogy a megfigyelt összefüggések függetlenek a karotinoidok A-provitamin hatásától. A karotinoidok A-provitamin hatása mellett az irodalomban jól dokumentált azok szinglet oxigén quencher, antioxidáns, immunstimuláló, valamint citoprotektív és anticarcinogén hatásai. A vegyületek daganatellenes hatásának manifesztációját az utóbbi, nem A-provitamin hatásaik eredőjeként írják le.

A magyarországi étkezési szokásokban jelentőséggel bíró paprika karotinoidjai, a kapszantin, a kapszorubin és a zeaxantin, epidemiológiai vizsgálatok alapján feltételezhető kemopreventív, illetve kemoterápiás hatásának vizsgálata ezideig részletesen nem vizsgált területe a karotinoidok biológiai hatásvizsgálatainak. Így az epidemiológiai vizsgálatok eredményei és az Intézetben rendelkezésre álló tiszta növényi hatóanyagok hatásának vizsgálata mint elméleti mint egészségügyi szempontból értékes eredményeket szolgáltathat.

3.2. Kromatográfias előzmények

A karotinoidok és ezzel együtt sok más vegyülettípus analízisében óriási fejlődést hozott a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia fejlődése, megbízható, reprodukálható rutin mérési módszerré válása. Az A-vitamin és karotinoidok HPLC módszerrel történő analízise során néhány fontos problémát meg kell oldani. Kezdetben elsősorban szilikagél töltetet használtak. Az igazi áttörést a kémiaiilag kötött fordított fázisú (RP) töltetek elterjedése jelentette.

Több izokratikus módszert írtak le ilyen töltetek alkalmazásával [93-95]. Az izokratikus módszer nem alkalmas a karotinoidok teljes polaritástartományát átfogó mérésekre, de egyes vegyületekre, és azok izomerjeire kiváló felbontást tudnak elérni [96].

Sikeresen alkalmaztak gradiens elúciós módszert különböző növények, elsősorban gyümölcsök és zöldségfélék karotinoid-összetételének meghatározására, majd ezt kombinálva retinol szint mérésére például halszövetekben [97] vagy anyatejben [98].

A karotinoidok és az A-vitamin eltérő elnyelési maximumából adódó detektálási problémát többféleképpen próbálták meg áthidalni. Különböző hullámhosszakon készült kromatogramokból rekonstruáltak egy közös kromatogramot [99]. Érdekes megoldásként differenciál-kromatogramot készítettek [100]. Párhuzamosan több hullámhosszon detektálva egyszerre mérték a különböző spektrummal rendelkező vegyületeket [101]. Ilyenkor természetesen minden hullámhosszhoz egy-egy külön belső standardot kellett használni.

Jelentősen könnyítette az egyes kromatográfias csúcsok azonosítását a fotodiódasoros detektor megjelenése. Ezzel egyre több karotinoidot és retinoidot tudtak kimutatni vérszérumból is [102-103]. Ezt részben az újabb detektorok nagyobb érzékenységének is tulajdonították. Ugyanakkor nem tisztázott, hogy a sok kis

menyiségben jelenlévő vegyület közül melyik lehet esetleg a mintaelőkészítés során keletkezett műtermék, vagy esetleg a szervezetből származó metabolit.

3.3. HPLC módszer

Mivel intézetünkben a karotinoidok kutatásának több évtizedes hagyománya van, természetesnek tűnik, hogy ezen vegyületek analízise is komoly hagyományokkal bír. A 70-es évek közepe óta a nagynyomású folyadékkromatográfias módszer fejlesztésével, új töltetek előállításával foglalkozó csoport is működik, ami nagyban elősegítette, hogy a karotinoidok analízisében a HPLC módszer korán szerepet játsszon.

A nagynyomású folyadékkromatográfias módszer alkalmazása során több problémát kell megoldani. Az egyik legfontosabb a kromatográfias csúcsok azonosítása, mert a karotinoidok hőre, fényre érzékeny vegyületek, ezért standardok nemigen kaphatók néhány gyakoribb vegyület kivételével. Ezen a téren nagyon nagy előnyt jelent az a bizonyos több évtizedes hagyomány. Az izolálási munkák során sok vegyületet állítottak elő, amelyeket kromatográfias standardként tudunk használni.

Bonyolult elegyekben történő azonosításhoz ez viszont még nem elegendő. Ezért egy származékképzésen és az egyes karotinoidok finom spektrumában meglévő különbségeken alapuló módszert dolgoztunk ki karotinoidok nagynyomású folyadékkromatográfias módszerrel történő azonosítására [44]. Ennek során kihasználtuk, hogy az 5,6-epoxi karotinoidok enyhe savas behatásra 5,8-epoxi karotinoidokká, úgynevezett furanoidokká alakulnak. A furanoidok retenciója pedig eltér az eredeti epoxidokétól, így a kromatogramokban jellemző csúcseltolódásokat kaptunk. Hasonlóképpen alkalmazható az a tény is, hogy a keto-karotinoidok enyhe redukciója a megfelelő hidroxikarotinoidokat eredményezi. Ez az átalakulás pedig szintén retencióváltozással jár. Míg a furanoidképzés során csökken, addig a redukció során nő a retenció a fordított fázisú kromatográfias rendszer alkalmazása során.

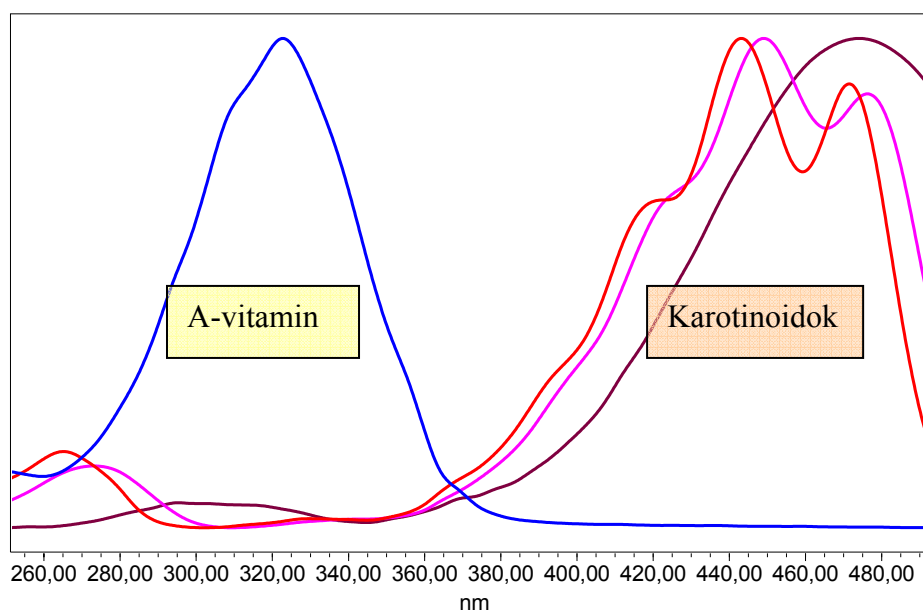
A következő probléma a természetes forrásokból származó karotinoidok kromatográfias analízisében, hogy sok hasonló vegyület létezik eléggé széles polaritásskálát átölelve. Ezek egyidejű analízisére jól reprodukálható gradiens elúciós HPLC módszert kellett kidolgozni, ami lehetővé teszi minél több karotinoid egymástól történő elválasztását. Ugyanakkor képes a teljes apoláris szénhidrogén típusú karotinoidtól a több hidroxil és keto csoportokat tartalmazó poláris vegyületekig az összes megjelenő

karotinoid egy kromatogramból történő analizisére. Ezt a problémát paprikaminták vizsgálata során sikerült megoldanunk, amikor is több, mint 50 karotinoid csúcsot sikerült asszignálni [45].

A vérszérumból történő meghatározásra kezdetben mi is szilikagél, ill. egyéb poláris állófázisokat (amino-, és ciano-) használtunk, amelyek az α – és β - végcsoportú karotinoidok elválasztására alkalmasabbnak tűntek [104]. Az ilyen direkt fázisú kromatográfias módszernél viszont nehezebb a gradiens elúció reprodukálható megvalósítása.

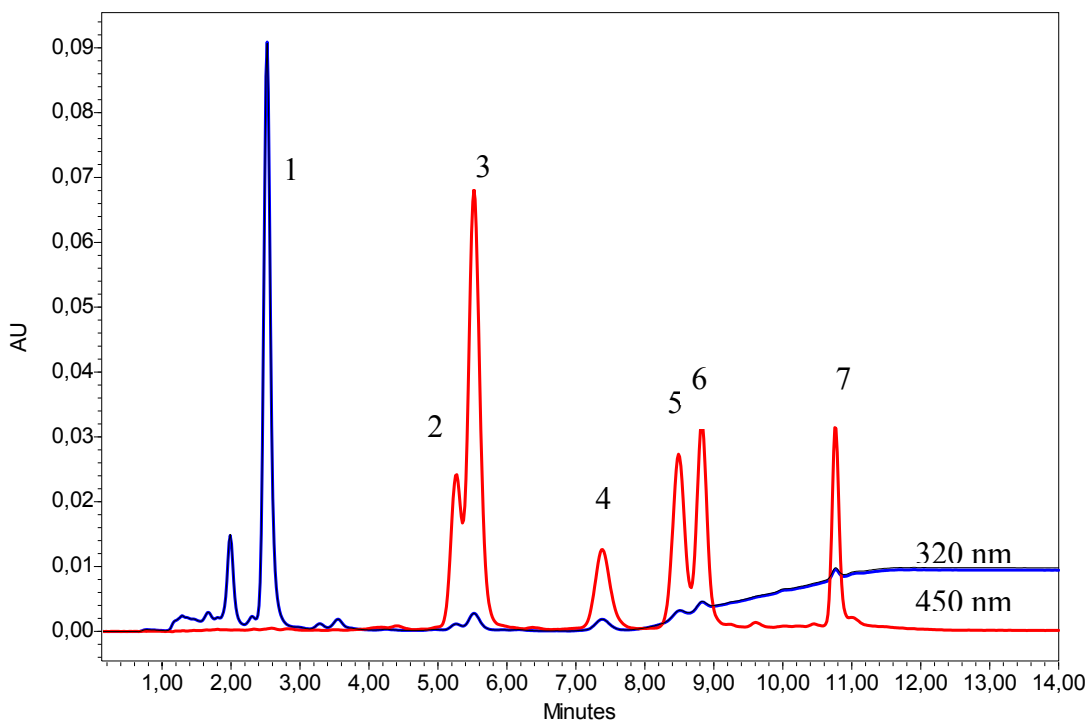
Az az α - és β - végcsoportú karotinoidok elválasztására ezért speciális fordított fázisokat kerestünk. Ezzel megtarthattuk a C_{18} -as töltetknél tapasztalt jó reprodukciót. Az előzőekből kitűnik, hogy egyfajta mechanizmusú kromatográfiával ez nem megoldható. A két probléma egyidejű megoldására valóban egy kevert mechanizmusú kromatográfias eljárás bizonyult jónak. Úgynevezett „non-encapped” C_{18} töltetet vizsgáltunk meg néhány vegyület szelektivitására. Ezen töltetknél a fellépő maradék szilanolcsoportok jelentősen befolyásolják a kromatográfias mechanizmust, ami ebben az esetben az előnyös α – és β -végcsoportú karotinoidok elválasztását eredményezi.

Fontos nem csak a prekursor karotinoidok, hanem a ténylegesen jelen levő A-vitamin szint mérése is. Ennek a vegyületnek a karotinoidokkal egy kromatogramból történő meghatározása egy újabb problémát vet föl. Az A-vitamin spektruma (λ -max ~ 325 nm) ugyanis jelentősen eltér a karotinoidokétól (λ -max ~ 450 nm) (23. ábra).



23. ábra A-vitamin és karotinoidok spektruma

Ezért olyan gradiens-elúciós eljárást kellett kidolgozni, amikor az A-vitamin nem szuperponálódik egyetlen karotinoid csúcsával sem, és ezzel lehetővé válik programozható hullámhosszakon dolgozó UV-Vis spektrofotometriás detektor alkalmazása [105]. Ezzel mindegyik vegyületcsoportot a saját elnyelési maximumán, vagy annak közvetlen közelében lehet detektálni (24. ábra).



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

Csúcsok számozása: 1: A-vitamin, 2: Lutein, 3: Zeaxantin, 4: Kantaxantin, 5: α -kriptoxantin, 6: β -kriptoxantin, 7: β -karotin

További fontos szempont, hogy az analízisidő ne legyen túl nagy, hiszen sok minta sorozatmérését is szolgálnia kell. Miután 12-15 perces analízisidőt sikerült elérni (25. ábra), ez már alkalmasnak bizonyult szérumból és egyéb szövetmintákból történő sorozatmérések végrehajtására is [106].

25. ábra A-vitamin és karotinoidok mérése vérszérumból

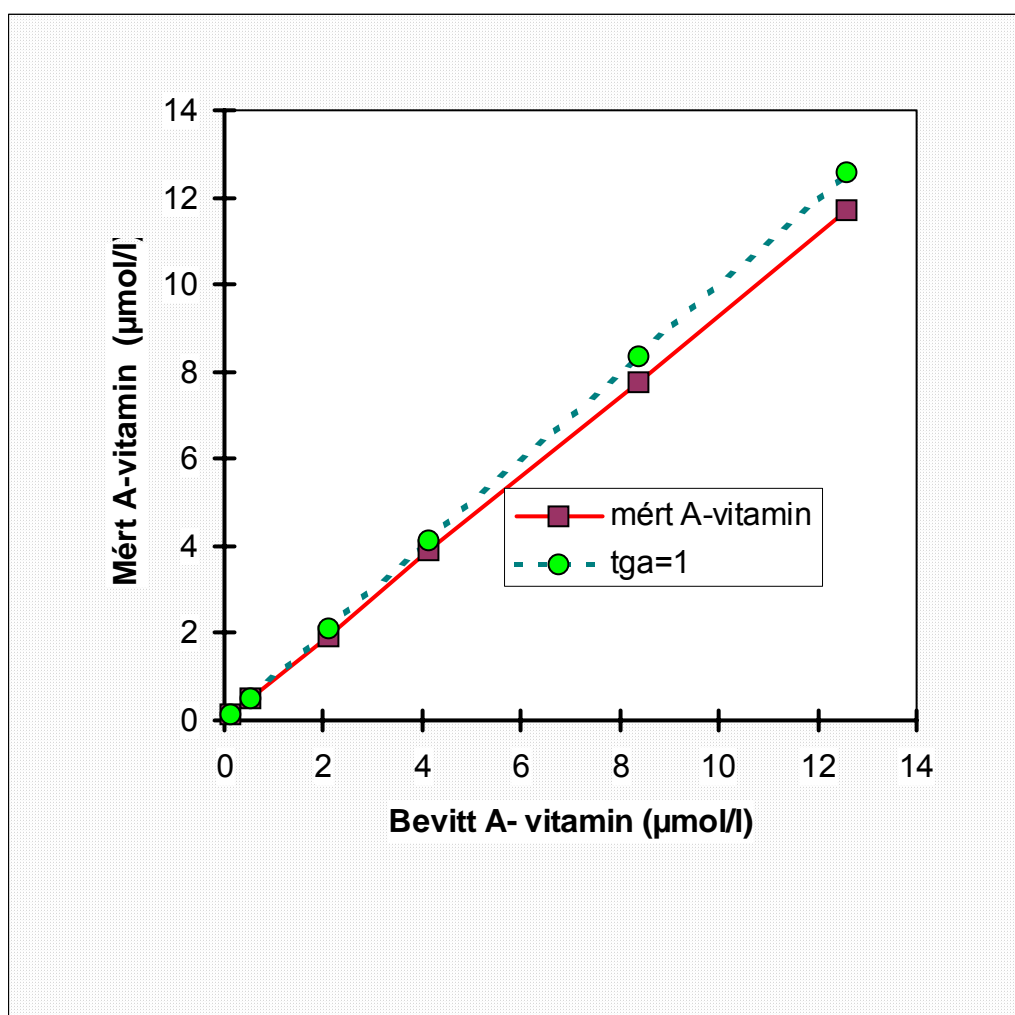
A mérés pontosságára és reprodukálhatóságára jellemző adatok:

A kromatográfiás rendszer saját hibája: CV. = ± 0.96 %

A teljes mérés hibája extrakcióval együtt: CV. = ± 4.78 %

Az A-vitaminra számolt recovery (26. ábra): **94** %

26. ábra Az A-vitamin visszanyerése:



Az antioxidáns status méréséhez fontos a tokoferol-szint ismerete is. Ezért elkezdtük a fenti módszer továbbfejlesztését ebben az irányban is. Ilyenkor az említett polaritás és detektálási problémák duplán jelentkeznek [112].

Az általunk kidolgozott HPLC módszerrel vérérumból és különböző szövetmintákból (máj, gyomor, tojás stb) több méréssorozatot végeztünk el állatkísérletekben, és humán beteganyagokból is [107-111]. Vizsgáltuk előfordulásukat, koncentrációikat, és változásukat néhány szövetben, illetve néhány betegségben. Ezek a felderítő munkák reményeink szerint hozzájárultak a karotinoidok és az antioxidáns státusban szerepet játszó A-vitamin esetében a különböző nekik tulajdonított hatások, biológiai funkcióik pontosabb megismeréséhez

IV. MÓDSZEREK, ANYAGOK, KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

1. HPLC töltetek készítése, ellenőrzése (II. 1. fejezet)

Anyagok: A kiindulási szilikagél „Chromsil” (Labor MIM, Budapest) 10 nm pórusátmérővel és 350 m²/g fajlagos felülettel. Oktadecil-triklór-szilán, hexametildiszilazán és trimetil-klórszilán Wacker-Chemie GmbH, München. Trietilamin, benzopirén, hexaklór benzol, fenol, etilbenzoát, toluol, etilbenzol, anilin, o-toluidin, p-toluidin, N,N-dietilanilin Fluka (Buchs, Svájc). Karotinoid standard minták saját kollekciónból. Az oldószerek (toluol, széntetraklorid, diklórmétán, metanol és víz) frissen desztilláltan kerültek felhasználásra.

Töltetek előállítása:

Oktadecil fázisok:

Monomer fázis: gömblombikban 20 g szilikagélt (140°C-on 12 órát szárítva), 120 ml toluolban kevertünk, 8.2 ml oktadecil-triklór-szilánt és 4.3 ml trietilamint adtunk hozzá. A szuszpenziót 2 óra refluxálás után leszűrtük, kétszer mostuk toluollal, diklórmétánnal, metanollal, metanol/víz (6:4) és vákummal szárítottuk 140°C-on.

Polimer fázis: 10 ml oktadecil-triklór-szilán, 20 ml széntetraklorid, 2 ml acetone és 0.5 ml víz elegyét felforraltuk és 15 percig refluxáltattuk. A kezdetben opálos keverék majdnem kitisztult. Ekkor 50 ml benzolt adtunk hozzá és további 30 percig refluxáltattuk. 20 g szilikagélt adtunk a most már tiszta folyadékhoz és újabb 15 percig refluxáltattuk. Ugyanazt a mosási folyamatot alkalmaztuk, mint a monomer fázisoknál.

Utánszilanzálás:

TMCS módszer: 10 g ODS fázist szuszpendáltattunk 70 ml száraz toluolban, 8 ml trimetil-klórszilán és 8 ml trietilamint adtunk a keverékhez, felforraltuk és refluxáltattuk 4 órán át. A mosás az előbb említettekkel azonos módon történt.

HTP módszer: egy igen hatékony, utánszilanzáló reagens keveréket használtunk [113]. Hexametildiszilazán, trimetilklórszilán és piridin elegyét adtuk az ODS fázishoz az előbb leírtakkal azonos módon. A reakcióidő 2 óra volt.

Kromatográfiai körülmények:

Minden töltetből 2 kolonnát töltöttünk. Egy 150 x 4.6 mm méretűt a retenció tesztekhez, és egy 250 x 4.6 mm-est a karotinoidok elválasztásához. Az ú.n. szuszpenziós töltési eljárást alkalmaztuk 400 bar nyomással. A méréseket Gynkotek gyártmányú Model 300 típusú pumpával és Model 250B típusú gradiensképzővel végeztük és Model SV-7 (Glenco, USA) injektort alkalmaztunk. A detektor házilag átépített Beckman spektrofotométer volt. Az aromás vegyületek elválasztását metanol/víz 1:1 arányú keverékével végeztük. A karotinoidok elválasztását terner gradiens elúciós körülmények között a következő eluensokkal végeztük:

A: 12% víz/metanol

B: metanol

C: 10% acetone/metanol

Gradiens program: 100% A 2 perc, 50% A 50% B 8 perc alatt, 100% B 8 perc alatt, 100% B 2 perc, 100% C 7 perc alatt, 100% C 6 perc.

2. Karotinoidok azonosítása bonyolult sokkomponensű mintákban (II.2.1. és II.2.2. fejezetek)

Anyagok:

Analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk, az autentikus karotinoid minták a saját készletünkéből származnak. Acetonos oldatokat injektáltunk és -20°C -on fénytől védve tároltuk.

Redukció:

Az oxo-karotinoid 10^{-5} M koncentrációjú oldatát benzol - 96%-os etanol 1:1 arányú elegyében nátrium borohidrid feleslegével kezeltük 20°C -on 1 órán át. A szokásos feldolgozás [41] után a száraz maradékot acetonban oldottuk (kb. 10^{-4} M) a HPLC analízishez.

Savas kezelés:

A 10^{-5} M koncentrációjú 5,6-epoxy karotinoidokat 0,01%-os éteres sósavban tartottuk 20°C -on 30 percig. Ezt követően savmentesre mostuk és a fent említett módon feldolgoztuk.

HPLC körülmények:

A folyadékkromatográfiás eljáráshoz az alábbi műszereket alkalmaztuk: Liquochrom Model 307 (Labor MIM) kromatográf, a stop-flow injektor (Labor MIM), Carl-Zeiss rekorder (Type K 201), házilag készített UV detektor [114] és keverőkamra. Az elválasztásokat $10\ \mu\text{m}$ -es részecske méretű fordított fázison végeztük gradiens elúcióval [115]. A mintákat acetonos oldatból injektáltuk.

Oszlop: üvegborítású fém oszlop 200×4 mm-es átmérővel,

Töltet: Nucleosil 10C_{18} (Macherey-Nagel)

Áramlási sebesség $1.32\ \text{cm}^3/\text{min}$, a gradiens után $1.43\ \text{cm}^3/\text{min}$;

Eluens: A: 100:40 (v/v) aceton-víz, majd

B: 100:5 aceton-víz,

Injektálás: $5-10\ \text{mm}^3$.

Detektálási hullámhosszok: 510, 480, 450, 428, 402 és 340 nm.

Paprika extrakció, mintakészítés:

Az extrakció Benedek leírása (1958) alapján történt és a $100\ \text{cm}^3$ benzol oldatból $20-40\ \text{cm}^3$ került vákuum alatt bepárlásra 45°C -on. A maradékot feloldottuk $50\ \text{cm}^3$ éterben és $5\ \text{cm}^3$ 30%-os metanos KOH oldatban, nitrogén atmoszférában szobahőmérsékleten 16 órán át állni hagytuk a karotinoid észterek hidrolízise céljából. Ezután a két fázist választó tölcserbe töltöttük, étert és kevés vizet adtunk hozzá. Az éteres fázist elválasztás után lúgmentesre mostuk és Na_2SO_4 -al szárítottuk. Leszűrés után kantaxantin benzolos oldatát adtunk hozzá ($2\ \text{mg}/100\ \text{cm}^3$). Vákuummal 35°C -on bepároltuk és a párlási maradékot $1-2\ \text{cm}^3$ acetonban oldottuk HPLC analízis céljára. Az oleorezinek esetében $20-40\ \text{cm}^3$ 0,5%-os benzolos oldatot szappanosítottunk ugyanilyen körülmények között.

3. Paprikafajták, és kapcsolódó minták vizsgálata (II. 2.3. – 2.9. fejezetek)

Anyagok:

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

A növények extrakcióját minden esetben szobahőmérsékleten, metanollal (3x) mint dehidratálószerrel, majd dietil-éterrel végeztük. A karotinoid-észterek hidrolízise heterogén fázisban 30%-os KOH metanolos oldatával történt. A vegyületek izolálására, tisztítására a klasszikus (Zechmeister-i) oszlopkromatográfiát alkalmaztuk.

Az extrakciós folyamatoknál használt oldószerek (metanol, hexán, toluol, benzol) nagy kiszerezésű (200 l) technikai vegyszerekből frissen desztillálva készültek.

HPLC Körülmények:

Kolonna: 250 x 4,6 mm, Chromsil C_{18} , 6 μ m, utánszilanzált és nem utánszilanzált

Eluens: A: 12 % H₂O MeOH-ban

B: MeOH,

C: 30 % CH₂Cl₂ MeOH-ban

Gradiens program: 0-2 min: 100% A; -10 min: 80% A/20 % B-re; -18 min: 50% A/50 % B-re; -25 min: 100% B-re; -27 min: 100 % B; -34 min: 100 % C-re; -41 min: 100% C (lineáris lépések).

Detektálás: UV-VIS Beckman, (házilag átépített UV-VIS detektor); Beckman 166 UV-Vis detektor; HP 1050; HP ChemStation program; detektálási hullámhosszak: 380, 410, 430, 450 és 480 nm-en), illetve diódasoros detektorral (Waters 991; 300-500 nm között) történt.

4. Tököfélék analízise (II.3. fejezet):

Extrakció:

Olajtök: 400g sötétzöld színű granulált présmaradékot (1991. december 20-tól 1992. január 15-ig -20°C -on tárolva) dörzsmozsárban elporítottunk, majd az anyagot 3-szor egy-egy éjszakán át N_2 -atmoszférában metanollal (600ml : 400ml : 400ml) állni hagytuk. A metanolos extraktumokat egyesítettük, majd a színezéktartalmat választótölcsérben hexánba vittük át. A metanolos kezeléseket után az anyagot 600ml éterrel egy éjszaka állni hagytuk. Büchner-tölcséren történő átszűrés után a szüredéket 300ml éterrel mostuk. Az éteres oldatokat egyesítettük, metanolmentesítés után megszáritottuk (vízmentes Na_2SO_4), bepároltuk. Az olajos maradékot hexánban vettük fel, s egyesítettük a metanolos frakciók hexánba történő átvitelekor nyert oldattal. Bepárlása után a maradékot éterben oldottuk, majd 30%-os KOH-os metanollal heterogén fázisban elhidrolizáltuk [116]. A hidrolizátum lúg- és klorofillmentesre mosása után nyert oldat karotinoidjait (különböző polaritású fitoxantinok és karotinoid szénhidrogének) megoszlattuk 90%-os vizes metanol és petroléter között. A hipofázikus karotinoidok azonos térfogatú (250ml) törzsoldatainak extinkcióját mérve, a frakciók aránya: H:E = 56%:44%.

Sütőtök: A rögzített szikleveleket felaprítottuk, majd kétszer 3 óráig metanollal és kétszer 3 óráig dietil-éterrel sötétben, nitrogén-atmoszférában állni hagytuk. A vízmentesített, majd egyesített extraktumokat hexánba vittük át. A hexános oldat felét heterogén, éteres fázisban 30%-os kálium-hidroxiddal hidrolizáltuk. Lúgmentesre mosás után készítettük belőle a HPLC-mintákat.

HPLC-analízis

Mintakészítés: Az olajtök extrakciója során nyert hexános törzsoldatból 2ml-t 40°C -on vakuumban bepároltunk. A száraz párlási maradékot 1ml MeOH:Aceton 7:3 arányú elegyében feloldottuk. Az így kapott oldatból injektáltunk 15-15 μl -t.

Kromatográfiai körülmények:

Készülék: Gynkotek HPLC-pumpa terner gradiens-programozóval, Waters diódasoros detektor, Rheodyne injektor.

Kolonna: 25cm x 4,6cm, Chromsil- C_{18} 6 μm .

Eluens: A: 6% H_2O / MeOH

B: MeOH

C: 20% CH_2Cl_2 / MeOH

Gradiens program: 100% A 6 percig, 100% B 6 perc alatt,
100% B 2 percig, 100% C 8 perc alatt,
100% C 12 percig

Áramlási sebesség: 1,2 ml/min

Detektálás: 320-tól 500 nm-ig 3 nm-enként

Kvalitatív kiértékelés: A csúcsok azonosítását részben a saját kollekciónkból vett autentikus mintákkal, részben a korábbi karotinoid-méréseink során megismert retenciós viselkedésük és a diódasoros detektor által készített spektrumok összehasonlítása alapján végeztük el.

5. Állati és emberi minták mérése

Extrakció:

2 ml szérumból a fehérjéket etilalkohollal kicsaptuk, majd centrifugálás után hexánnal kétszer extraháltuk. A belső standard hozzáadása után az extraktumot 40°C-on vákuumban bepároltuk, majd 0,5 ml metanol:diklórometán 5:1 arányú elegyében feloldottuk. Az oldatból 25 µl-t injektáltunk.

HPLC:

Készülék: Gynkotec terner gradiens pumpa,
Waters 996 diódasoros detektor
Beckman-166 programozható hullámhosszú UV–VIS detektor

Kolonna: 150 x 4,6 mm, Chromsil–C₁₈ 6µm not endcapped

Eluens: A: 4% H₂O/MeOH;
B: MeOH;
C: 40% CH₂Cl₂/MeOH

Gradiens: 100% A 0,5 perc; 100% B 3. percre ; 100% B 4,5. percig;
100% C 8,5. percre; 100% C 12. percig

Áramlás: 1,2 ml/min.

Mennyiségi kiértékelés: Belső standard módszerrel.

Belső standardként kantaxantint használtunk, mely egy szintetikus, viszonylag stabil karotinoid.

Adatfeldolgozás: Beckman Gold software és Waters 991 software.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

Vizsgáltuk a sárga paradicsompaprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiceforme flavum*), a fekete fűszerpaprika (*C.a.* var. *longum nigrum*), a piros paradicsompaprika (*C.a.* var. *lycopersiceforme rubrum*), valamint a Szentesi Kosszarvú (*C.a.* var. *longum ceratoides*) és Bovet-4 jelű paprika (*C.a.* var. *abbreviatum pendens*) karotinoidösszetételének változását az érés során. Elvégeztük az ún. „kaliforniai paprika” (*C.a.* var. *grossum* cv. Kaliforniai wonder) különböző színű változatainak a karotinoidanalízisét is. Ezek eredményeként a következő vegyületeket sikerült elsőként azonosítani, illetve izolálni, és szerkezetüket igazolni:

Sárga paradicsompaprikában β -kriptoxantin-5,6-epoxidot

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

cikloviolaxantin, *cucurbitaxantin A*, *cucurbitaxantin B*, *kapszantin-3,6-epoxid*, *cucurbitakróm epimerek*

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

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

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

kapszantin-5,6-epoxidot

Asparagus falcatus bogyójából *5,6-diepikarpoxantint és kapszoneoxantint*

Vadgesztenyefajták szirmából egy új karotinoidot az *aesculaxantint*

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

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

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

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

VI. IRODALOM

- [1] Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *MTA Matematikai és Természettudományi Értesítője* **44**, 404-419 (1927)
- [2] Cholnoky, L.: *Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Értesítője* **5**, 1 (1933)
- [3] Zechmeister, L., Cholnoky, L.: *Liebigs Ann. Chem.* **455**, **465**, **478**, **487**, **489**, **516**, **523**, **530**, **543** (1927-1940)
- [4] Karrer, P.: *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **5**, 1 (1948)
- [5] Karrer, P., Krause-Voith E.: *Helv. Chim. Acta* **31**, 802 (1948)
- [6] Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *MTA Kém. Oszt. Közl.* **5**, 419 (1955)
- [7] Cholnoky, L., Szabolcs, J., Nagy, E.: *MTA Kém. Oszt. Közl.* **11**, 57 (1959)
- [8] Cholnoky, L., Szabolcs, J., Cooper, R. D. G., Weedon, B. C. L.: *Tetrahedron Letters* **19**, 1257 (1963)
- [9] Entschel, R., Karrer, P.: *Helv. Chim. Acta* **43**, 89 (1960)
- [10] Barber, M. S., Jackman, L. M., Warren, C. K., Weedon, B. C. L.: *Proc. Chem. Soc.* **1960**, 19.
- [11] Cholnoky, L., Szabolcs, J.: *Naturwissenschaften* **44**, 513 (1957)
- [12] Cholnoky, L., Szabolcs, J.: *Experientia* **16**, 483 (1960)
- [13] Bowden, R. D., Cooper, R. D. G., Harris, C. J., Moss, G. P., Weedon, B. C. L., Jackman, L. M.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* **1983**, 1465
- [14] Rüttimann, A., Englert, G., Mayer, H., Moss, G. P., Weedon, B. C. L.: *Helv. Chim. Acta* **66**, 1939 (1983)
- [15] Curl, A. L.: *J. Agric. Food Chem.* **12**, 522 (1964)
- [16] Curl, A. L.: *J. Agric. Food Chem.* **10**, 504 (1962)
- [17] Davies, B. H., Matthews, S., Kirk, J. T. O.: *Phytochemistry* **9**, 797 (1970)
- [18] Yamamoto, H., Chichester, C. O.: *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 303 (1965)
- [19] Cholnoky, L., Györgyfy, K., Rónai, Á., Szabolcs, J., Galaskó, G., Mallams, A. K., Waight, E. S., Weedon, B. C. L.: *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 1256
- [20] Valadon, L. R. G., Mummery, R. S.: *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **82**, 407 (1977)
- [21] Buckle, K., Rahman, F.: *J. Chromatography* **171**, 385 (1979)
- [22] Camara, B., Moneger, R.: *Phytochemistry* **17**, 91 (1978)
- [23] Camara, B.: *FEBS Letters*, **118**, 2 (1980)
- [24] Camara, B.: *Pure Appl. Chem.* **57**, 675 (1985)

- [25] Ohmacht R., Halász I.: Eigenschaften kommerziell erwerblicher Silikagele in der schnellen Flüssigkeits-Chromatographie. *Chromatographia* **14**, 155 (1981)
- [26] Ohmacht R., Halász I.: Effizienz kommerziell erwerblicher Silikagele ($d_p \sim 5\mu\text{m}$ und $10\mu\text{m}$) in der Flüssigkeits-Chromatographie. *Chromatographia* **14**, 216 (1981)
- [27] Ohmacht R.: Preparation and Investigation of Reversed Phase Packing Materials *Magyar Kémiai Folyóirat* **89**, 229 (1983)
- [28] Ohmacht R., Matus Z.: Hydrothermal Treatment of Silica Gel. *Chromatographia* **19**, 473 (1984)
- [29] Ohmacht R., Matus Z.: Chromatographic Packings Made by Solide Phase Synthesis. *Chromatographia* **23**, 254 (1987)
- [30] Ohmacht R., Matus Z.: Chemically bonded stationary phases for chromatography *Hung. Pat.* **190**, 682 (1988)
- [31] Matus Z., Ohmacht, R.: Selectivity of Some Aromatic Hydrocarbons and Carotenoids on C_{18} Packings Made with Different Endcapping Procedure. *Chromatographia* **30**, 318 (1990)
- [32] Ohmacht, R., Kele, M., Matus Z.: HPLC Separation of exhaust-gases of a two-stroke engine. *J. Chromatogr. Sci.*, **31**, 65 (1993)
- [33] Ohmacht, R., Kele, M., Matus, Z.: Reversed Phase C_{18} Packings for the Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **39**, 668 (1994)
- [34] Moss G. P. and Weedon B. C. L.: in „*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*”, Goodwin T. W., ed., Academic Press, London, 1976; Vol. I., p. 164.
- [35] Liaaen-Jensen, S.: in „*Carotenoids*”, O. Isler, ed., Birkhäuser Verlag, Basel, 1971; p. 89.
- [36] Zechmeister L.: „*Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes*”, Springer, Vienna, 1962
- [37] Moster, J. B., Prater, A. N.: in „*Color of capsicum spices*” Part I. *Fd Technol.* **6**, 459-469 (1952)
- [38] Benedek, L.: *Z. Lebensmittelunters. u. – Forsch.* **107**, 228-232 (1958)
- [39] Pohle, W. D., Gregory, R. L.: in „*Color of capsicum spices*” *Fd Technol.* **14**, 245-247 (1960)
- [40] Cholnoky, L., Györgyfy, K., Nagy, E., Pánczél, M.: *Magy. Tud. Akad. Kém. Tudom. Osztály. Közl.* **5**, 419-441 (1955)

- [41] Vinkler, M., Kiszél-Richter, M.: *Acta Alimentaria* **1**, 41-58 (1972)
- [42] Baranyai, M., Szabolcs, J.: *Acta Alimentaria* **5**, 87-105 (1976)
- [43] Davies, B. H. (1976): *Carotenoids*. – in: Goodwin, T. W. (1976): *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press, London. Vol. 2. pp. 65-67
- [44] Matus, Z., Baranyai, M., Tóth G., Szabolcs, J.: Identification of oxo, epoxy and some *cis*-carotenoids in high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **14**, 337 (1981)
- [45] Matus, Z., Deli, J., Szabolcs, J.: Carotenoid Composition of Yellow Pepper during Ripening: Isolation of β -Cryptoxanthin 5,6-Epoxy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 1907-1914 (1991)
- [46] Deli, J., Matus, Z., Szabolcs, J.: Carotenoid Composition in the Fruits of Black Paprika (*Capsicum annuum* Variety *longum nigrum*) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2072-2076 (1992)
- [47] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of Red Paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during Ripening; Biosynthesis of Carotenoids in Red Paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 1517-1523 (2001)
- [48] Deli, J., Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Szentesi Kosszarvú during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 711-716 (1996)
- [49] Deli, J., Tóth, G.: Carotenoid Composition of the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Bovet 4 during Ripening. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung A*, **205**, 388-391 (1997)
- [50] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G.: Separation and Identification of Carotenoids from Different Coloured Paprika (*Capsicum annuum*) by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography. *European Food Research and Technology* **213**, 301-305 (2001)
- [51] Molnár, P., Deli, J., Matus, Z., Tóth, G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of the Mono- and Diepoxides of β -Cryptoxanthin. *Helvetica Chimica Acta* **80**, 221-229 (1997)
- [52] Maoka, T., Fujivara, Y., Hashimoto, K., Akimoto, N.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1601 (2001)
- [53] Almela, L., Lopez-Roca, J., Candela, M. E., Alcazar, M. D.: *J. Chromatography* **502**, 95 (1990)

- [54] Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernandez, J.: *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 1190 (1994)
- [55] Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernandez, J.: *J. Agric. Food. Chem.* **42**, 2260 (1994)
- [56] Howard, L. R., Smith, R. T., Wagner, A. B., Villalon, B., Burns, E. E.: *J. Food Sci.* **59**, 362 (1994)
- [57] Levy, A., Harel, S., Palevitch, D., Akiri, B., Menagem, E., Kanner, J.: *J. Agric. Food Chem.* **43**, 362 (1995)
- [58] Márkus, F., Daood, H. G., Kapitány, J., Biacs, P. A.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 100 (1999)
- [59] Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H., Villalon, B.: *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 1713 (2000)
- [60] Breithaupt, D. E., Schwack, W.: *Eur. Food. Res. Technol.* **211**, 52-55 (2000)
- [61] Hornero-Mendez, D., Mínguez-Mosquera, M. I.: *J. Agric. Food. Chem.* **46**, 4087 (1998)
- [62] Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Akimoto N.: *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 3965 (2001)
- [63] Parkes K. E. B., Pattenden G., Baranyai M., Molnár P., Szabolcs J., Tóth G.: *Tetrahedron Letters* **27**, 2535 (1986)
- [64] Fiksdahl, A., Bjørnland, T., Liaaen-Jensen, S.: *Phytochemistry* **23**, 649 (1984)
- [65] Matsuno, T., Tani, Y., Maoka, T., Mautso, K., Komori, T.: *Phytochemistry* **25**, 2837 (1986)
- [66] Deli, J., Molnár, P., Tóth, G., Baumeler, A., Eugster, C. H.: Cycloviolaxanthin (=3*S*,5*R*,6*R*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-3,6:3',6'-Diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro-β,β-carotin-5,5'-diol), ein neues Carotinoid aus Paprika (*Capsicum annum*). *Helvetica Chimica Acta* **74**, 819-824 (1991)
- [67] Deli, J., Molnár P., Matus, Z., Tóth, G. Steck, A: Reisolation of Carotenoid 3,6-Epoxides from Red Paprika (*Capsicum annum*). *Helvetica Chimica Acta* **79**, 1435-1443 (1996)
- [68] Deli, J., Matus, Z., Molnár, P., Tóth, G., Décsy, Z., Eugster, C. H.: Epoxidierung von Cucurbitaxanthin A: Herstellung von Cucurbitaxanthin B und seines 5',6'-Epimeren. *Helvetica Chimica Acta* **76**, 952-956 (1993)
- [69] Gross, J., Carmon, M., Lifshitz, A., Sklarz B.: *Phytochemistry* **14**, 249 (1975)
- [70] Marki-Fischer, E., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **68**, 1704, 1708 (1985)

- [71] Marki-Fischer, E., Buchecker, R., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **67**, 2143 (1984)
- [72] Marki-Fischer, E., Eugster, C. H.: *Helv. Chim. Acta* **73**, 1637 (1990)
- [73] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Isolation of Carotenoids with 3,5,6-Trihydroxy-5,6-dihydro- β -end Groups from Red Paprika (*Capsicum annuum*). *Helvetica Chimica Acta* **81**, 1233-1241 (1998)
- [74] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of Capsokarboxanthins and 3,6-Epoxycapsanthins. *Helvetica Chimica Acta* **81**, 1242-1253 (1998)
- [75] Molnár, P., Deli, J., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Partial Synthesis and Characterization of Karboxanthins and Cucurbitaxanthin A Epimers. *Helvetica Chimica Acta* **82**, 1994-2002 (1999)
- [76] Deli, J., Matus, Z., Molnár, P., Tóth, G., Szalontai, G., Steck, A., Pfander, H.: Nigroxanthin (3',4'-Didehydro- β,γ -carotene-3,6'-diol), a New Carotenoid Isolated from Paprika (*Capsicum annuum* var. *longum nigrum*). *Chimia* **48**, 102-104 (1994)
- [77] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G., Traber, B., Pfander, H.: „Prenigroxanthin” [(all-*E*,3*R*,3'*S*,6'*S*)- β,γ -Carotene-3,3'6'-triol], a Novel Carotenoid from Red Paprika (*Capsicum annuum*). *Tetrahedron Letters* **42**, 1395-1397 (2001)
- [78] Deli, J., Matus, Z., Molnár, P., Tóth, G., Steck, A., Pfander, H.: Isolation of Capsanthone ((all-*E*,3*R*,5'*R*)-3-Hydroxy- β,κ -carotene-3',6'-dione) from Paprika (*Capsicum annuum*). *Chimia* **49**, 69-71 (1995)
- [79] Szabolcs, J.: *A piros paprika polién-ke-tonjainak vizsgálata*. Kandidátusi értekezés, Pécs, 1964
- [80] Simpson, D. J., Baqar, M. R., Lee, T. H.: *Ann. Bot.* **41**, 1101 (1977)
- [81] Neamtu, G., Salajan, G., Bilaus, C., László, T., Simpson, K. I.: *Rev. Roum. Biochim.* **13**, 209, (1976)
- [82] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Pfander, H.: Isolation and Characterization of 3,5,6-Trihydroxy-Carotenoids from Petals of *Lilium tigrinum*. *Chromatographia* **48**, 27-31 (1998)

- [83] Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth G., Steck, A., Niggli, U. A., Pfander, H.: Aesculaxanthin, a New Carotenoid Isolated from Pollens of *Aesculus hippocastanum*. *Helvetica Chimica Acta* **81**, 1815-1820 (1998)
- [84] Deli, J., Matus, Z., Tóth, G.: Comparative Study on the Carotenoid Composition in the Buds and Flowers of Different *Aesculus* species. *Chromatographia* **51**, S179-182 (2000)
- [85] Deli, J., Matus, Z., Tóth, G.: Carotenoid Composition in the Fruits of *Asparagus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2793-2796 (2000)
- [86] Szabolcs, J., Rónai, Á., Tóth, Gy.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **66**, 229 (1970)
- [87] Neamtu, G., Stanescu, U., Tabacaru, C.: *Stud. Cercet Biochim* **33**, 111 (1990)
- [88] Zechmeister, L., Béres, T., Újhelyi, E.: *Ber. Deutsch, Chem. Ges.* **68**, 1321 (1935)
- [89] Matus Z., Molnár P., Szabó L. Gy.: *Acta Pharmaceut. Hung.* **63**, 247-256, 1993
- [90] Rabinowitch, H. D., Sklan, D., Budowski, P.: *Physiol. Plant.* **54**, 369-374, 1982
- [91] Young, A. J.: *Physiol. Plant.* **83**, 702-708, 1991
- [92] Mosamoto, K., Kinoshita, T., Shimazaki, K.: *Plant Cell Physiol.* **34**, 935-938, 1993
- [93] Miller, K. W. & Yang, C. S.: An isocratic high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analysis of plasma retinol, alpha-tocopherol, and various carotenoids. *Anal. Biochem.*, **145**, 21-6, (1985)
- [94] Hess, D., Keller, H. E., Oberlin, B., Bonfanti, R. & Schüep, W.: Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **61**, 232-238, (1991)
- [95] Barua, A. B., Furr, H. C., Janick-Brukner, D. & Olson, J. A.: Simultaneous analysis of individual carotenoids, retinyl esters, and tocopherols in serum by isocratic non-aqueous reversed-phase HPLC. *Food Chem.*, **46**, 419-424, (1993)
- [96] Krinsky, N. I., Russet, M. D., Handelman, G. J. & Snodderly, D. M.: Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J. Nutr.*, **120**, 1654-61, (1990)
- [97] Guillou, A., Choubert, G. & de la Noüe, J.: Separation and determination of carotenoids, retinol, retinal, and their dehydro forms by isocratic reversed-phase HPLC. *Food Chem.*, **476**, 93-99, (1993)

- [98] Giuliano, A. R., Neilson, E.M., Yap, H-H., Baier, M. & Canfield, L. M.: Quantitation of and inter/intra-individual variability in major carotenoids of mature human milk. *J. Nutr. Biochem.*, **5**, 551-556, (1994)
- [99] Steghens, J-P., van Kappel, A. L., Riboli, E., Collombel, C.: Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and α -tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr. B*, **694**, 71-81, (1997)
- [100] Kitahara, K., Masuda, T., Nishimura, Y., Tonegava, M., Yamashita, J. & Satoh, H.: Identification of serum carotenoids using a multiwavelength UV-VIS Detector. *Bull. Tokyo Med. Coll.*, **17**, 7-15, (1991)
- [101] Khachik, F., Beecher, G. R., Goli, M. B., Lusby, W. R. & Daitch, C. E.: Separation and quantification of carotenoids in human plasma. *Methods in Enzymology*, **213**, 205-219, (1992)
- [102] Handelman, G. J., Shen, B. & Krinsky, N. I.: High resolution analysis of carotenoids in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, **213**, 336-346, (1992)
- [103] Khachik, F., Beecher, G. R. & Goli, M. B.: Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Anal. Chem.*, **64**, 2111-2122, (1992)
- [104] Ohmacht R., Tóth Gy., Voigt, G.: Separation of serum-carotenoids and Vitamin-A on Chromsil-amino and cyano phases by a bi-directional gradient-elution technique. *J. Chromatog.*, **395**, 609 (1987)
- [105] Matus Z., Ohmacht R., Tóth Gy.: Szérum-karotinoidok és A-vitamin meghatározás. *XVI. Kromatográfiás Vándorgyűlés*, Balatonaliga, 1991., P19
- [106] Király Á., Matus Z., Sütő G., Vincze Á., Mózsik Gy.: Correlation between the β -carotene induced gastric cytoprotective effect and its gastric mucosal level in indomethacin-treated rats. *Acta Physiol. Hung.*, **80**, 215-220 (1992)
- [107] Rumi Gy jr, Kovács K, Vincze Á, Matus Z, Tóth Gy, Mózsik Gy: Changes of serum retinoid levels in patients with malignant gastrointestinal disease. *Z. Gastroenterol.* **32**, 95, (1994).
- [108] Rumi Gy Jr, Matus Z, Tóth Gy, Vincze Á, Mózsik Gy: Changes of serum carotenoid levels in patients with malignant disease. *Dig. Dis. Sci* **41**, 437 (1996)

- [109] Rumi Gy. jr, Szabó I, Matus Z, Vincze Á, Tóth Gy, Mózsik Gy: Serum carotenoids in patients with precancerous colorectal diseases and with colorectal adenocarcinoma. *Digestion* **59**, 531 (1998).
- [110] Rumi Gy jr, Szabó I, Matus Z, Vincze Á, Tóth Gy, Rumi Gy, Mózsik Gy: Carotenoids status in crohn's disease. *Z. Gastroenterol* **36**, 442 (1998)
- [111] Rumi Gy. jr, Szabó I, Matus Z, Vincze Á, Tóth Gy, Rumi Gy, Mózsik Gy: Decrease in serum levels of vitamin A and zeaxanthin in patients with colorectal polyp. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 305-308 (1999)
- [112] Matus Z., Tóth Gy.: Retinol, tokoferol és karotinoidok mérése vérszérumból. *Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, 1998, Lillafüred, P36
- [113] Ohmacht R., Matus Z.: "*Chromsil*", a New Family of Chromatographic Packings New Approches in Liquid Chromatography. Ed.: H. Kalász Elsevier, 1982, P.71-84
- [114] Ohmacht R.: *Chromatographia* **12**, 52 (1979); a p. 52
- [115] Langer, K.: *Dissertation*, Nürnberg, 1976
- [116] Molnár, P. and Szabolcs, J.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **99**, 155 (1979)
- [117] Szabó L. Gy., Matus Z., Molnár P.: A sütőtök (*Cucurbita maxima* Duch. ex Lam.) sziklevelének karotinoid összetétele. *Olaj szappan kozmetika*, **48**, 169 (1999)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm néhai *Dr. Tóth Tibornak*, hogy elindított, és segített a kromatográfia útján megtett első komoly lépésekben.

Köszönöm *Dr. Szabolcs József* és *Dr. Tóth Gyula* professzoroknak, hogy a karotinoidkémia rejtjelmeibe bevezettek, munkám elvégzését lehetővé tették, és abban messzemenő segítséget nyújtottak.

Köszönöm *Dr. Ohmacht Róbertnek* a HPLC magyarországi hőskorában adott iránymutató segítségét, a töltetekkel kapcsolatban végzett sok évi közös munkát.

Köszönöm *Dr. Deli Józsefnek* a paprikakarotinoidok és néhány kapcsolódó növény vizsgálatában való közös munkát, a sok elért eredményt.

Köszönöm *Dr. Molnár Péternek* az izolálásokkal, a tökfélékkel, a karotinoid izomerekkel és a preparatív munkákkal kapcsolatos közös munkát.

Köszönöm *Halászné Nyers Éva* és *Jámborné Herczeg Erika* energiát és időt emésztő, sokszor önfeláldozó segítségét a laboratóriumi munkákban, a HPLC mérésekben és a dolgozat megírásában.

Köszönöm *Dr. Hideg Kálmán* professzornak, mint programvezetőnek a dolgozat megírásában nyújtott segítségét, és a HPLC töltetek széntartalmának meghatározását,

Köszönöm *Dr. Mózsik Gyula* professzornak módszerünk alkalmazását, az állatkísérletek, valamint az egyes betegcsoportokkal kapcsolatos mérésorozatok szervezését.

Köszönöm *Dr. Sümegi Balázs* professzornak a türelmét, és a dolgozat befejezésében nyújtott segítségét.

Köszönöm *Sterl Jánosné* technikai segítségét, és *Nagy Klára* segítségét a dolgozat megírásában.

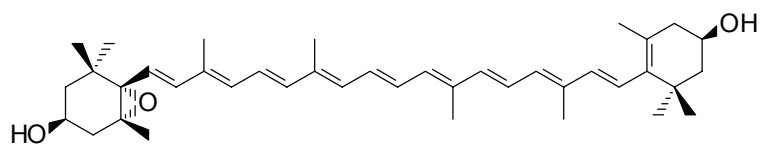
MELLÉKLET

I. A Dolgozatban előforduló karotinoidok képlete

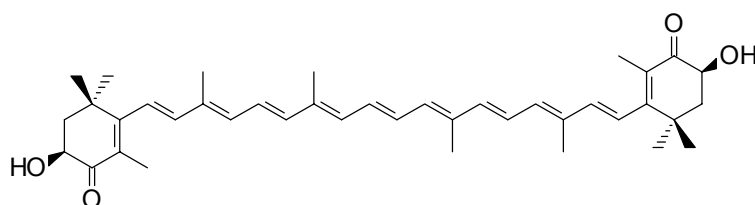
II. A Dolgozat alapjául szolgáló legfontosabb közlemények másolata

- [1] Z. Matus, M. Baranyai, G. Tóth, J. Szabolcs: Identification of Oxo, Epoxy and Some *cis*-Carotenoids in High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **14(6)**, 337 (1981)
- [2] M. Baranyai, Z. Matus and J. Szabolcs: Determination, by HPLC, of Carotenoids in paprika products. *Acta Alimentaria* **11(3)**, 309 (1982)
- [3] Z. Matus, R. Ohmacht: Selectivity of Some Aromatic Compounds and Carotenoids on C₁₈ Packings Made With Different Endcapping Procedures. *Chromatographia* **30(5/6)**, 318 (1990)
- [4] Zoltán Matus, József Deli and József Szabolcs: Carotenoid Composition of Yellow Pepper during Ripening: Isolation of β -Cryptoxanthin 5,6-Epoxyde. *J. Agric. Food Chem.*, **39(11)**, 1907 (1991)
- [5] József Deli, Zoltán Matus and József Szabolcs: Carotenoid Composition in the Fruits of Black Paprika (*Capsicum annuum* Variety *longum nigrum*) during Ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **40(11)**, 2072 (1992)
- [6] József Deli, Zoltán Matus and Gyula Tóth: Carotenoid Composition in the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Szentesi Kosszarvú during Ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **44(3)**, 711 (1996)
- [7] Matus Zoltán, Molnár Péter, Szabó László Gyula: Olajtök (*Cucurbita pepo convar. Pepo var. styriaca*) magjából nyert présmaradék össz-karotinoid-tartalmának és karotinoid-összetételének meghatározása. *Acta Pharmaceutica Hungarica* **63**, 247 (1993)

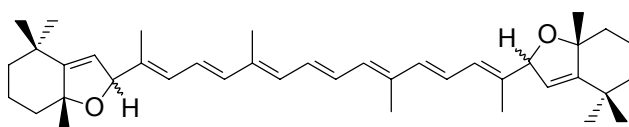
I. A leggyakrabban előforduló karotinoidok képlete



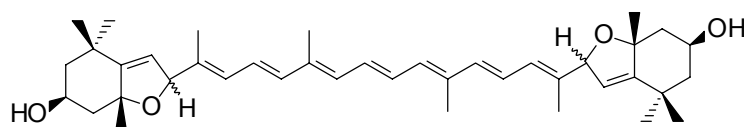
anteraxantin



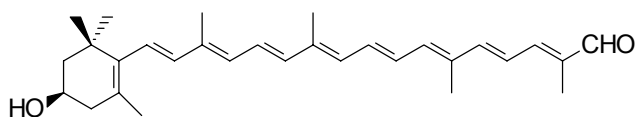
astaxantin



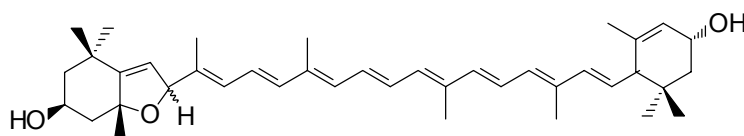
aurokróm



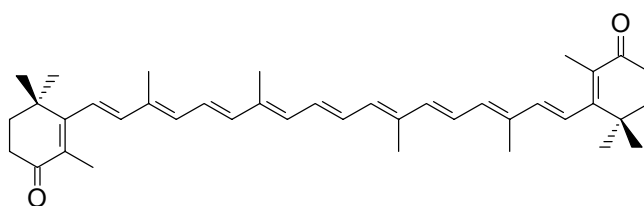
auroxantin



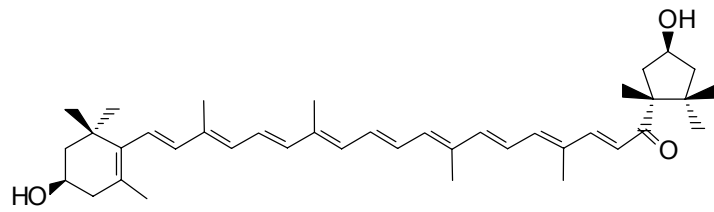
β -citraurin



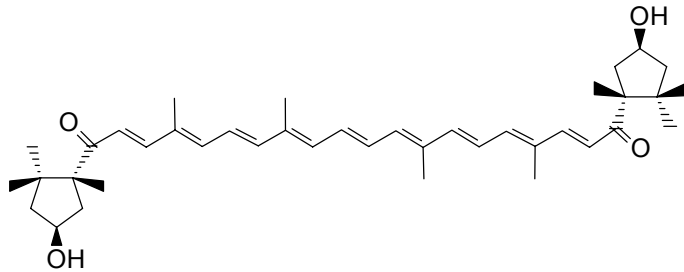
flavoxantin/krizantemaxantin



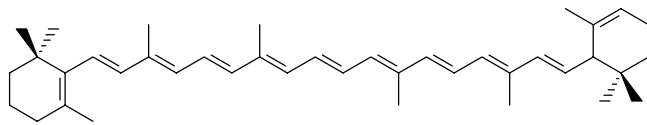
kantaxantin



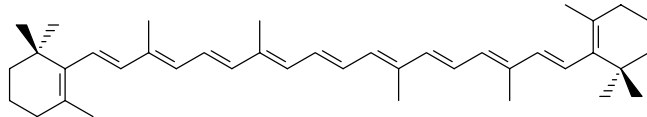
kapszantin



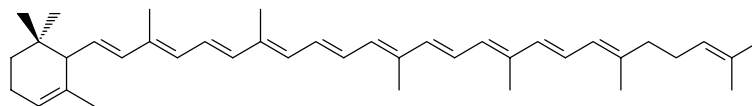
kapszorubin



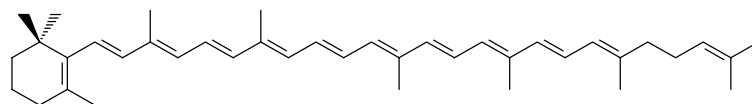
α -karotin



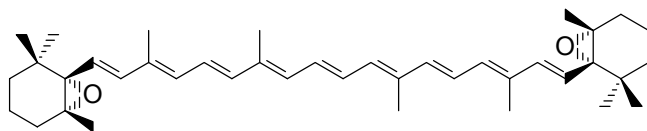
β -karotin



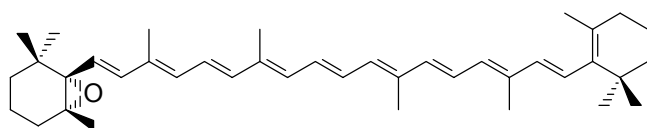
δ -karotin



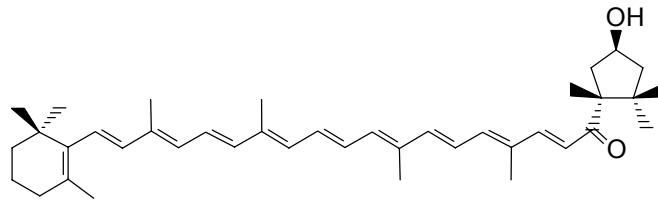
γ -karotin



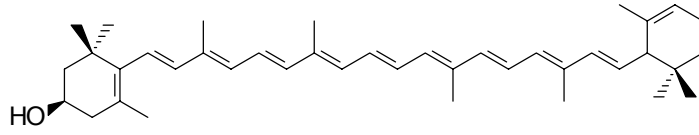
β -karotin-diepoxid



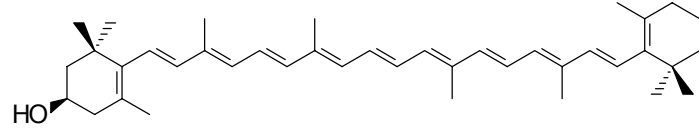
β -karotin-monoepoxid



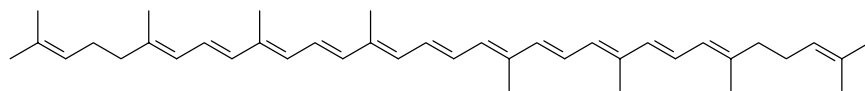
kriptokapszin



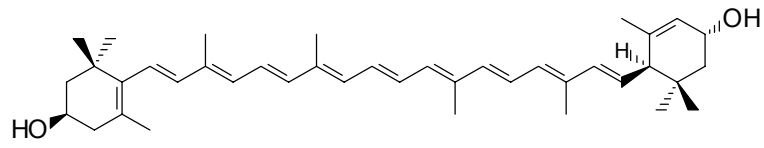
α-kriptoxantin



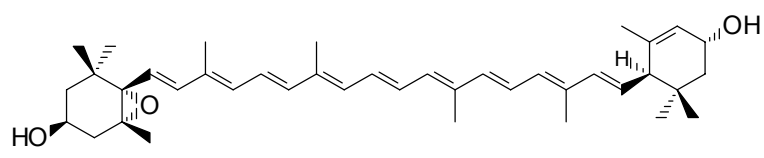
β-kriptoxantin



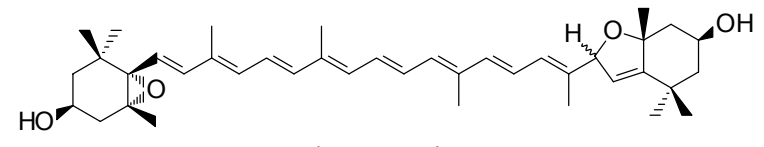
likopin



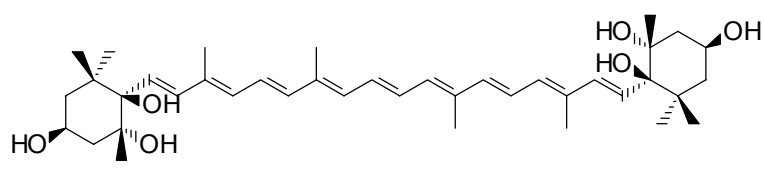
lutein (xantofill)



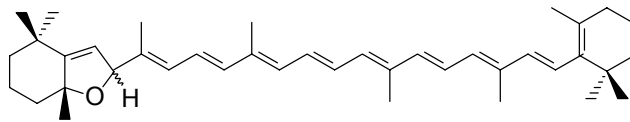
lutein-5,6-epoxid (xantofill-epoxid)



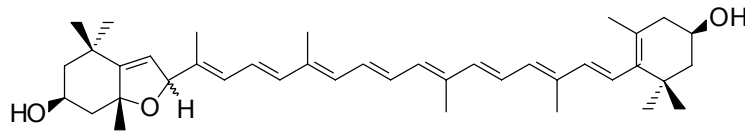
luteoxantin



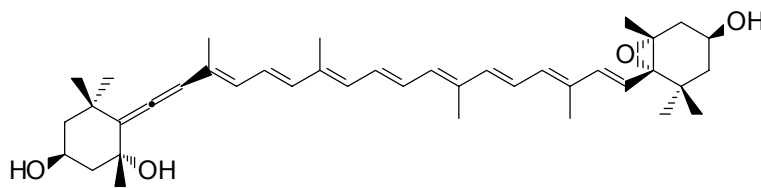
mactraxantin



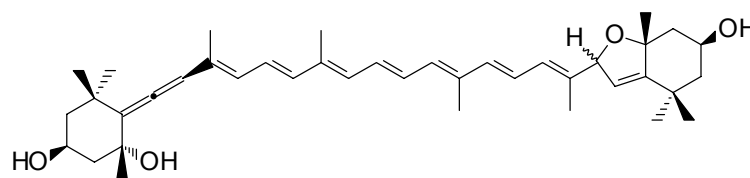
mutatokrom



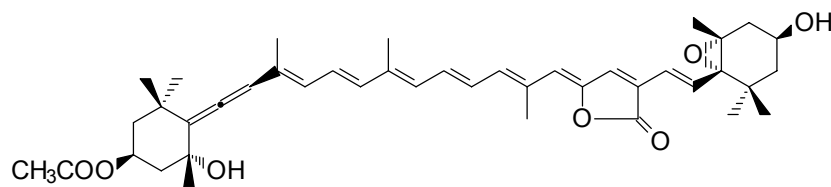
mutatoxantin



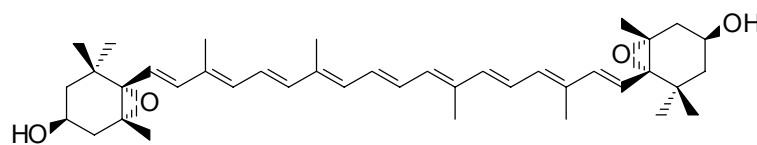
neoxantin (foliaxantin)



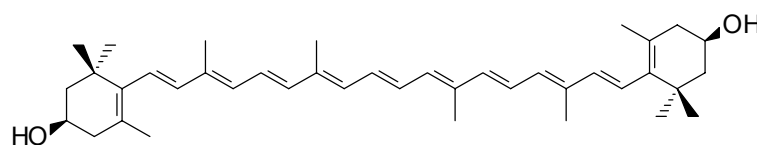
neokrom (foliakrom)



peridinín



violaxantin



zeaxantin