

agocs.attila_230_24

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**TERMÉSZETES KAROTINOIDOK IZOLÁLÁSA ÉS
KOVALENS MÓDOSÍTÁSA**

AGÓCS ATTILA

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
BIOKÉMIAI ÉS ORVOSI KÉMIAI INTÉZET**

PÉCS, 2025

agocs.attila_230_24

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1 A karotinoidok biológiai és antioxidáns hatása	6
2.2. A karotinoidok izolálása	9
2.3. Karotinoidok és származékaik előállítása.....	10
2.3.1. Hidrofil-karotinoidok	12
2.3.2. Karotinoid-észterek és amidok.....	16
3. Eredmények.....	22
3.1. Karotinoidok izolálása és szerkezetvizsgálata.....	22
3.1.1 Új, κ -végesoportot tartalmazó karotinoidok trópusi növényekben – a mamey (<i>Pouteria sapote</i>) vizsgálata	22
3.1.2. Egyéb trópusi növények vizsgálata.....	32
3.1.3. Karotinoidok izolálása más növényi forrásokból és azok vizsgálata.....	33
3.1.4. Lutein és luteinszármazékok izolálása és vizsgálata.....	38
3.1.5. Karotinoidok algákban.....	41
3.2. Karotinoidok szintetikus módosításai.....	44
3.2.1. Dimerek és dendrimerek	45
3.2.2. Hidrofil-karotinoidok előállítása.....	46
3.2.3. Karotinoidok szénhidrátszármazékainak előállítása	51
3.2.4. Karotinoid-flavonoid konjugátumok	57
3.2.5. Antivirális glikopeptid-karotinoid konjugátumok	60
3.2.6. Karotinoid-melatonin konjugátumok előállítása.....	62
3.2.7. Karotinoid-kurkumin konjugátumok előállítása	66
3.2.8. Karotinoidok szupramolekuláris szerveződésének és antioxidáns hatásának komplex vizsgálata.....	69
3.2.9. Sejtvonalakon végzett <i>in vitro</i> antioxidáns vizsgálatok.....	72
4. Összefoglalás és az eredmények hasznosítása	74
5. Irodalomjegyzék.....	79

1. Bevezetés és célkitűzés

A karotinoidok növények, gombák, algák és baktériumok által szintetizált tetraterpén pigmentek. Mivel minden fotoszintetizáló organizmusban megtalálhatóak, rendkívül elterjedtek a Földön, de az egyes élőlényekben általában csak mg-os mennyiségben fordulnak elő. Jelenleg kb. 750 természetes karotinoidot ismerünk, ezek közül 10-15 hozzáférhető nagyobb mennyiségben, mert szintetikusán vagy biotechnológiai úton előállíthatóak. A fotoszintetikus apparátusban elsősorban a megfelelő hullámhosszúságú fény elnyelése a feladatuk, de van szerepe antioxidáns hatásuknak is. Az állati szervezet csak módosítani képes a felvett karotinoidokat, de ott *de novo* szintézis nem történik.

A humán gyógyászat szempontjából azok a legfontosabb karotinoidok, melyekből a szervezetben A-vitamin keletkezhet (szubsztituálatlan β -végcsoportot tartalmaznak), de bármelyikük viselkedhet lipofil antioxidánsként a szervezetben. Nem csak direkt antioxidáns hatásuk fontos, a karotinoidok vagy származékaik jelátviteli funkciókat is elláthatnak. Ezekből következik, hogy egyes karotinoidok vagy származékaik sokrétű másodlagos hatással is rendelkeznek, mint gyulladáscsökkentő hatás (asztaxantin-biszszukcinát), a kognitív képességek javítása (lutein), makuladegeneráció csökkentése (lutein, zeaxantin), vagy rákmegelőzés (likopin).

A karotinoidok intenzív kutatásának kezdete egybeesik kutatócsoportunk 100 évvel ezelőtti alapításával. Pécsen az 1970-es évekig Zechmeister László, majd Cholnoky László vezetésével elsősorban a karotinoidok izolálása és egyre pontosabb szerkezetfelderítése zajlott. A szintetikus módszerek fejlődésével sok karotinoid totálszintézise is megvalósult az elmúlt 40 évben, de a karotinoidokkal kapcsolatos szintetikus kutatások a 2000-es évekre visszaestek és jelenleg csak néhány olyan hely van a világon, ahol ezzel foglalkoznak. Szintetikus szerves kémikusként 20 évvel ezelőtt kerültem Pécsre és erre az elhanyagolt területre próbálunk azóta is koncentrálni, különös tekintettel a szénhidrátszármazékokra, hiszen azelőtt, kutatói karrierem első 10 évében leginkább azokkal foglalkoztam. Ezzel egyidejűleg folytattuk a szerkezetfelderítéssel és izolálással kapcsolatos munkákat és még az elmúlt 15 évben is sikerült felfedezni új szerkezetű karotinoidokat.

Jelen dolgozatom egyfelől egységes, mert minden egyes kutatási téma a karotinoidokkal kapcsolatos, másrészt nagyon változatos, hiszen az izolálástól a szerves szintézisen keresztül a fizikai-kémiáig és a biokémiáig sokféle területen átível, ami jól visszaadja kutatócsoportunk mindennapi kutatási tevékenységét is. Mivel világszerte már nagyon kevés helyen művelik a karotinoidkémiát, csoportunk egyik nem titkolt célja a karotinoidokkal kapcsolatos több

évtizedes tudás megőrzése és átörökítése, valamint új területekkel és szempontokkal történő megújítása.

Célunk tehát az, hogy egyrészt folytassuk azt a jól bevált és biztos háttérrel rendelkező karotinoid kutatást, amit elődeink magas szinten műveltek, másrészt pedig továbbfejlesszük új irányokba, mint a szerves szintetikus kémia, fizikai-kémia vagy éppen a biokémiai vizsgálatok.

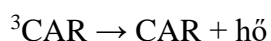
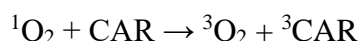
2. Irodalmi áttekintés

2.1 A karotinoidok biológiai és antioxidáns hatása

A több mint 750 természetes karotinoidból csak körülbelül 25 mutatható ki az emberi vérben és szövetekben, közülük kettő (lutein és zeaxantin) a retinában és a szemlencsében. A karotinoidok, mivel zsírban oldódnak, ugyanazt a bélrendszeri felszívódási utat követik, mint az étkezési zsírok. Valószínűleg passzív diffúzióval és transzporterek segítségével szívódnak fel a vékonybél nyálkahártyájában, majd triacil-glicerinben gazdag kilomikronokba csomagolódnak.¹ Egyrégű Caco-2 sejtek vizsgálata azt sugallja, hogy a bélben történő felszívódás specifikus epiteliális transzporterek részvétele által elősegített folyamathoz is kapcsolódhat.² A karotinoidokat lipoproteinek szállítják a keringésben: elsősorban az alacsony sűrűségű lipoprotein magjában található meg (LDL), míg a polárisabb xantofilok a lipoproteinek felszínén helyezkednek el, és az LDL és a nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) között oszlanak meg.³

A karotinoidok biológiai hatásai elsősorban a polién struktúrához köthetőek. Egyrészt viselkedhetnek direkt lipofil antioxidánsként, hasonlóan az E-vitaminhoz, amikor is oxidálószerekkel vagy reaktív gyökökkel közvetlenül reagálnak. Másrészt antioxidáns vagy antiinflammatorikus jelátviteli útvonalakat indukálhatnak és így indirekt antioxidáns hatást is kifejthetnek. Az indirekt hatások vizsgálata időben később kezdődött, de ma már legalább olyan fontosnak tűnik, mint a direkt hatás.⁴

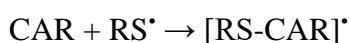
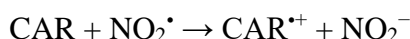
Régóta ismert, hogy a karotinoidok mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között a szingulett oxigén ($^1\text{O}_2$) leghatékonyabb semlegesítői, különösen azok, amelyek legalább 11 konjugált kettős kötést tartalmaznak. A $^1\text{O}_2$ dezaktiválása a $^1\text{O}_2$ és a karotinoidok közötti energiaátvitelen alapul, ami triplett állapotú karotinoidokat (^3CAR) és alapállapotú oxigént ($^3\text{O}_2$) hoz létre. A gerjesztett karotinoidok lehetséges káros hatásait leginkább alacsony energiájuk és rövid élettartamuk miatt figyelmen kívül lehet hagyni.⁵ A ^3CAR rezgési és forgási kölcsönhatásokon keresztül veszít energiát az oldószermolekulák segítségével.



Ezen kívül a karotinoidok hatékonyan képesek megkötni a szabad gyököket, köztük a reaktív oxigénszármazékokat (ROS), így védelmet nyújtanak a fotoszintetikus és nem fotoszintetikus szervezetek oxidatív károsodása ellen is.⁶ A karotinoid-szabad gyök reakciónak három általánosan elfogadott kimenetele lehet:

- a) elektrontranszfer a szabad gyök (R[•]) és a karotinoidok között, amely karotinoid gyökkationt (CAR^{•+}) vagy karotinoid gyökkaniont (CAR^{•-}) eredményez.
- b) gyökös adduktum képződése (R-CAR[•]).
- c) hidrogénatom-transzfer semleges karotinoidgyök keletkezése közben (CAR[•]).⁷

A likopin, lutein, zeaxantin, asztaxantin és kantaxantin szabadgyök-megkötésének mechanizmusát és sebességét impulzusos radiolízissel vizsgálták. Azt találták, hogy a reakciók mechanizmusa és sebessége jelentősen függ a gyökfajták természetétől, de sokkal kevésbé függ a karotinoidok szerkezetétől. Az összes fent említett karotinoid nitrogén-dioxid-gyökkel (NO₂[•]) elektrontranszfer útján reagált, míg tiil-gyökkel (RS[•]) adduktumokat képzett.⁸



Az újonnan képződött karotinoidgyökök további átalakulásokon eshetnek át, amelyek számos, eltérő reakcióképességű másodlagos származékot eredményezhetnek. Ez rendkívül fontos, mert az újonnan keletkezett származékok már nem működnek hatékony antioxidánsként, hanem potenciálisan káros, prooxidáns anyagokként viselkedhetnek. Az egyik legtöbbet tanulmányozott reaktív karotinoidszármazékok a CAR^{•+}-k, amelyek erős oxidáló tulajdonságuk és viszonylag hosszú élettartamuk miatt képesek kölcsönhatásba lépni más biológiailag fontos molekulákkal, mint például a ciszteinnel vagy a tirozinnal.

A karotinoidok egyik legérdekesebb hatása a sejtekre a tumor-sejtvonalak növekedését gátló képességük. Leginkább a könnyebben hozzáférhető karotinoidokkal végeztek ilyen vizsgálatokat. Schwartz és mtsai arról számoltak be, hogy 70 μM β-karotin vagy kantaxantin hozzáadása gátolta a tenyésztett humán SK-MES tüdőkarcinóma vagy SCC-25 szájkarcinóma sejtek proliferációját, míg a normál humán keratinocitákban nem figyeltek meg gátló hatást.⁹ A likopin alacsony koncentrációban (0,75 μM) zavarja a sejtciklus előrehaladását és az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) növekedést serkentő hatását MCF-7 emlőráksejtekben.¹⁰ A paradicsomban található számos aciklikus karotinoid, például a fitofluin, a ζ-karotin és a likopin jelentősen csökkentette a sejtek életképességét háromféle humán prosztatarák sejtvonalban, míg a fitoin, kantaxantin, β-kriptoxantin és zeaxantin nem befolyásolta a sejtnövekedést.¹¹ A spenótból származó neoxantin és a barna algákból izolálható fukoxantin apoptózist indukálva csökkenti a rákos sejtek életképességét.¹² Sumantran *et al.* megfigyelték, hogy a lutein megvédte a normál, de nem az SV40 transzformált emlősejteket két kemoterápiás szer, az etopozid és a ciszplatin által kiváltott apoptózistól. A β-karotint sokféle rákos sejtvonalon vizsgálták és a sejtnövekedés leállítását tapasztalták szinte minden

esetben.¹³ A sáfrányból kivont krocín (a krocetin bisz-diglikozidja) jelentősen gátolja az MCF-7 sejtek proliferációját, és apoptózist indukálhat mitokondriális jelátviteli útvonalakon keresztül, mint például a kaszpáz-8 aktiválásával és a mitokondriális membránpotenciál megzavarásával.¹⁴

Számos klinikai vizsgálat kimutatta, hogy a karotinoidok csökkenthetik a szív- és érrendszeri betegségek (CVD) kockázatát. A lutein hatékony védőfaktor lehet az érlemezésedés progressziójával szemben, mivel csökkenti a nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL) és a közepes sűrűségű lipoprotein (IDL) szintjét, valamint a gyulladást és az oxidatív stresszt a tengerimalacok aortájában.¹⁵ Az asztaxantin a szív- és érrendszeri betegségek másodlagos prevenciója lehet az ateroszklerózissal összefüggő gyulladás csökkentésével, mivel módosítja a HDL és LDL szintjét, és stabilizálja az ateroszklerotikus plakkot.¹⁶ Ezzel szemben több tanulmány szerint nincs szignifikáns összefüggés a magasabb karotinoidbevitel, a plazmaszint és a szív- és érrendszeri betegségek között.¹⁷

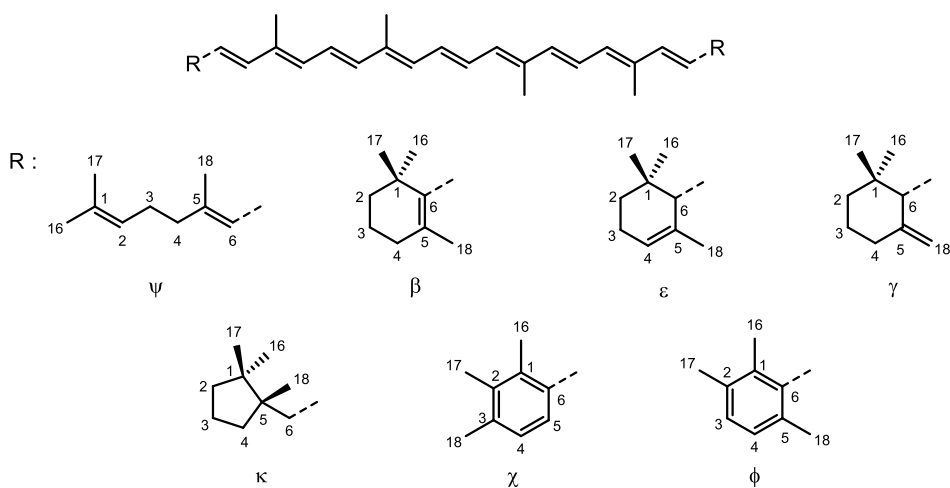
Számos longitudinális kohorszvizsgálat kimutatta, hogy magas lutein- vagy zeaxantintartalmú élelmiszerek, például a spenót és a kelkáposzta rendszeres fogyasztása jelentős védelmet jelent az időskori makuladegenerációval szemben, hiszen ez a két karotinoid dúsul a sárgafoltban.¹⁸

A karotinoidok hajlamosak *in vivo* oxidatív hasadásra és *cisz-transz* izomerizációra, amelyek új aktív metabolitokat eredményeznek. Az egyik legismertebb metabolit az apokarotenoid A-vitamin (retinol). Az A-vitamin az A-provitamin karotinoidok, például az α -karotin, a β -karotin, a γ -karotin, β -kriptoxantin, és a szapotexantin centrális oxidatív hasításának eredménye. Nem centrális hasításkor más apokarotinoidok is keletkezhetnek, amelyeknek számos biológiai funkciójára derült fény az elmúlt években.^{19,20}

A κ -karotinoidok (kapszantin, kapszorubin) antioxidáns, gyökfogyó és más jótékony biológiai hatása felülmúlja más karotinoidokét és a hatásuk is tovább tart, ami jó hír a nagy pirospaprika fogyasztó magyar társadalomnak.²¹ A kapszantin mono- és/vagy diészterek hasonló viselkedést mutattak, az észterezés nem befolyásolta a kapszantin gyökfogyó képességét. A kapszorubin, amely két karbonilcsoportot tartalmaz a 6- és 6'-helyzetekben, erősebb antioxidáns aktivitást mutatott, mint a kapszantin. A biológiai vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a kapszantin antioxidáns képességét nem befolyásolják a β -jonon és ciklopentán gyűrű 3- és 3'-helyzetében lévő hidroxilcsoportok, a hatás a polién-láncnak köszönhető, melyet a konjugált ketocsoport felerősíti.²² A *Capsicum* fajok átfogó vizsgálatánál szintén azt találták, hogy a κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok rendelkeznek a legerősebb antioxidáns hatással.²³

2.2. A karotinoidok izolálása

Karotinoidokat csak növények, algák és baktériumok képesek *de novo* szintetizálni aktivált izoprén egységekből: először a nyílt láncú fitoin keletkezik, majd abból több lépésben likopin (ψ,ψ -karotin). A likopin ciklizációjával alakulnak ki a hatszénatomos ϵ - és β -végcsoportok (2.1. ábra), amelyek ezután módosulhatnak, elsősorban hidroxilálódnak és epoxidálódnak.²⁴ Az öttagú gyűrűt tartalmazó κ -karotinoidok 3-hidroxi-5,6-epoxi- β végcsoportból keletkeznek a kapszantin-kapszorubin szintáz enzim segítségével.²⁵ A tilakoid-membránon kívül található, fotoszintézisben részt nem vevő karotinoidok általában különböző zsírsav-észterek formájában fordulnak elő. Az egyes növényi részek karotinoidanalízise hozzájárul az adott növényben lejátszódó bioszintetikus útvonalak jobb megismeréséhez.



2.1. ábra. A karotinoidok alapszerkezetei

A karotinoidok izolálására manapság több módszer létezik, ezek alapvetően nem térnek el más, növényekből vagy élelmiszer-mátrixokból történő extrakcióktól, de a karotinoidok fény-, hő- és oxigénérzékenységét figyelembe kell venni. Első lépés az aprítás, a sejtszerkezet roncsolása, amit az extrakció követ, hagyományosan acetonnal vagy metanollal, utána pedig éterrel.²⁶ Az extrakcióra ma már számos hatékony módszerrel rendelkezünk: lehet mikrohullámmal vagy ultrahanggal segített, szuperkritikus folyadékot használó, nyomás alatt történő és ezek kombinációja.²⁷ A primer extraktum több karotinoidot észteresített formában tartalmaz, ezért akár mikro- akár makromennyiségben dolgozunk, elszappanosításra lehet szükség. Az így kapott nyers extraktumot a szokásos kromatográfiás állófázisok (szilikagél, alumínium-oxid) mellett a kevéssé terhelhető (10-20 mg extraktum/kg állófázis), de nagyon jó elválást biztosító kalcium-karbonáton is tisztítjuk, valószínűleg egyedülállóan a világon. Kisebb mennyiségek (1-5 mg) elválasztására félpreatatív HPLC is használható.

Kutatócsoportunkban gyakorlatilag 100 éve folyik karotinoidok izolálása. A kb. 2000-ig tartó időszakban elsősorban a piros fűszerpaprika analízise valósult meg, de sok más növényt, növényi részt is vizsgáltak. Korábban szinte csak a paprikában találtak κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidokat, az elsőt (kapszantin) még Zechmeister izolálta 1927-ben. Az ehhez kapcsolódó eredményeket mi is összefoglaltuk egy könyvfejezet formájában.²² A kappakarotinoidok izolálása és szerkezetazonosítása hasonlóan történik más karotinoidokéhoz, de több eltérést is tartalmaz más természetes anyagokétól. A közelmúltban megjelent könyvfejezetünkben ezeket a részben speciális módszereket foglaltuk össze.²⁸

Egy extraktum karotinoidprofiljának meghatározásához C18 és C30-as analitikai oszlopokkal megvalósított HPLC-DAD, illetve HPLC-MS mérés szükséges. A standard programokkal végzett HPLC méréseknél sok karotinra ismerjük a retenciós időket.²⁹ A tiszta anyagok egyszerű UV-spektruma is sok mindent elárulhat, egyes esetekben még a távoli UV finomszerkezetét is lehet szerkezetmeghatározásra használni.³⁰ A szerkezetmeghatározást, mint más szerves vegyületeknél, az 1D és 2D ^1H / ^{13}C NMR-spektrumok teszik teljessé, a legtöbb végcsoport és a polién-lánc jellegzetes ^1H és ^{13}C kémiai eltolódásai manapság már ismertek.³¹

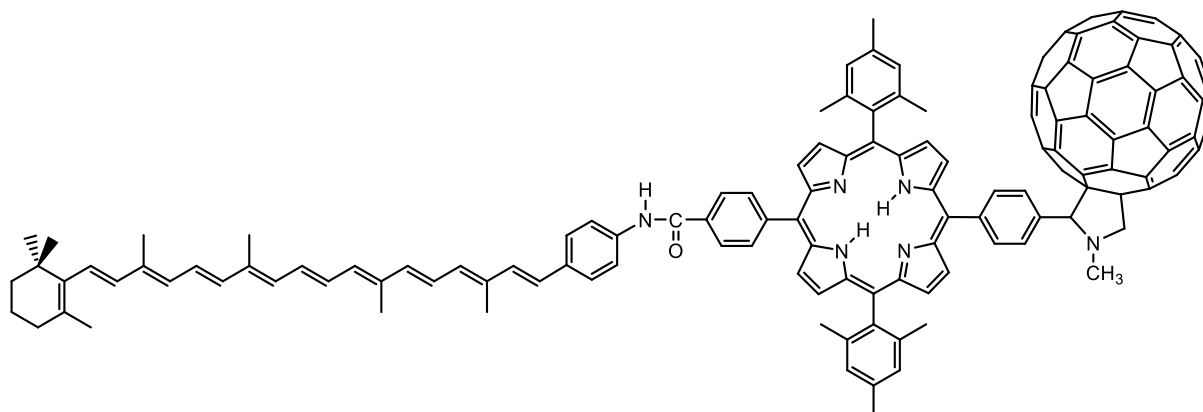
A jelen dolgozatban leírt izolálásoknál mi is a fenti módszerek valamely kombinációját alkalmazzuk alkalmazkodva a növényi mátrix és az izolálandó karotinoidok tulajdonságaihoz.

2.3. Karotinoidok és származékaik előállítása

A karotinoidokkal kapcsolatos kísérleti munka két csoportra osztható: a karotinoidok előállítására és a karotinoidok származékképzésére. A karotinoidok előállítását alapvetően a végcsoportok és a központi polién-lánc összekapcsolásával végzik Wittig-, Woodsworth-Emmons-, vagy Julia-Kocienski-kapcsolás(ok)al.³² Ipari méretben csak 8-10 karotinoidot állítanak elő totálszintézissel, de elvileg rendelkezésre állnak – ha nem is mindig egyszerű – módszerek a legegztikusabb karotinoidok szintézisére,³³ karotinszerű poliének előállítására is.³⁴ Itt elsősorban a végcsoportok sztereoszelektív szintézise a kihívás. Sok karotinoidot (pl. lutein, bixin) azonban egyszerűbb természetes forrásból izolálni, vagy újabban biotechnológiai módszerekkel nagyobb mennyiségben előállítani (pl. β -karotin, kantaxantin). Mi elsősorban izolált karotinoidok származékképzésével foglalkozunk, így ebben az irodalmi áttekintésben a másik csoportra koncentrálnék, a karotinoidokból kiinduló szintézisre. A karotinoidokkal történő szintézisekre is található jónéhány példa, annak ellenére, hogy a karotinoidok igen érzékeny vegyületek, még enyhe reakciókörülmények között is könnyen elbomlanak, ugyanakkor gyakori az is, hogy semmilyen átalakulás nem történik (a kívánt sem). Sokféle

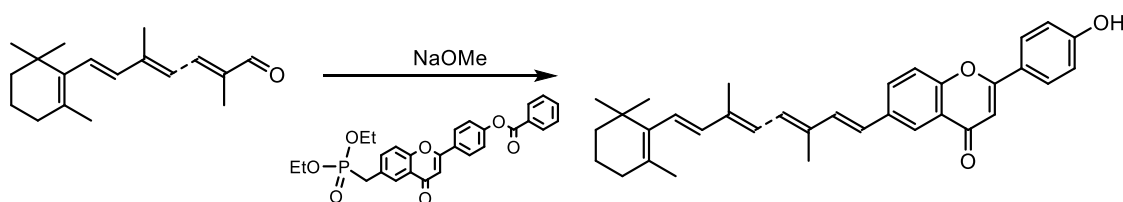
származékot, kén-, szelén-, nitrogéntartalmú karotinoidokat vagy egzotikusnak tekinthető konjugátumokat is szintetizáltak.

Az 2.2. ábrán látható fullerénszármazékok nemcsak szépek, hanem paramágnesesek is lehetnek és töltésszétválás jöhet rajtuk létre, ezért elvileg mesterséges fotoszintézisben lehet őket használni.³⁵ A fenti karotin-porfirin konjugátumban a fényindukálta elektrontranszfer követően töltés-szeparált állapot alakult ki 95%-os hatékonysággal, mely kb. 1 eV fotonenergiát tárol elektrokémiai potenciál formájában.



2.2. ábra

Az 2.3. ábra azt mutatja, hogy a C-C-kötés kialakítására használt Horner–Wadsworth–Emmons reakcióval más bioaktív molekulákat (flavonoidokat) is hozzá lehet kapcsolni C25- és C30-apokarotinoidokhoz, egyfajta hibrideket előállítva.



2.3. ábra

A karotinoidokkal való szintézisek sokféleségét két könyvfejezet mutatja be legjobban, a Sliwka és Partali által 2016-ban írt³⁶ és az általunk jegyzett észterekről szóló 2019-ből.³⁷ Ezeknek az összefoglalóknak és saját tapasztalataink alapján általánosan azt mondhatjuk, hogy bár a karotinoidokkal sokféle reakció hatékonyan elvégezhető, nem kell csodálkoznunk azon, ha néha a legegyszerűbb reakciók sem mennek velük (pl. észteresítés) és a kitermelések sem szoktak túl magasak lenni. Ezt a problémát az alábbi idézettel szemléltetném, mely a sok évtizedes tapasztalattal rendelkező Sliwka professzortól származik:

„Indeed, except for some early reported functional group transformations syntheses with carotenoids were often troubled by unexpected difficulties leading to disappointing low product yields. Nevertheless, the carotenoid chemist’s code of conduct has been increasingly violated in recent years. Still, those neophytes who look at the synthetic schemes and think of straightforward and trouble-free organic reactions may keep in mind that even ester hydrolysis of carotenoids can become unexpectedly difficult. The initial topic of a PhD thesis was abandoned for the simple enough reason that it was not possible to find an appropriate method for hydrolyzing ethyl esters of long chain carotenoid diacids. At times, well-established reactions do not succeed when employed with carotenoids and, occasionally, customary work-up procedures fall short of expectations” (Hans-Richard Sliwka).³⁶

2.3.1. Hidrofil-karotinoidok

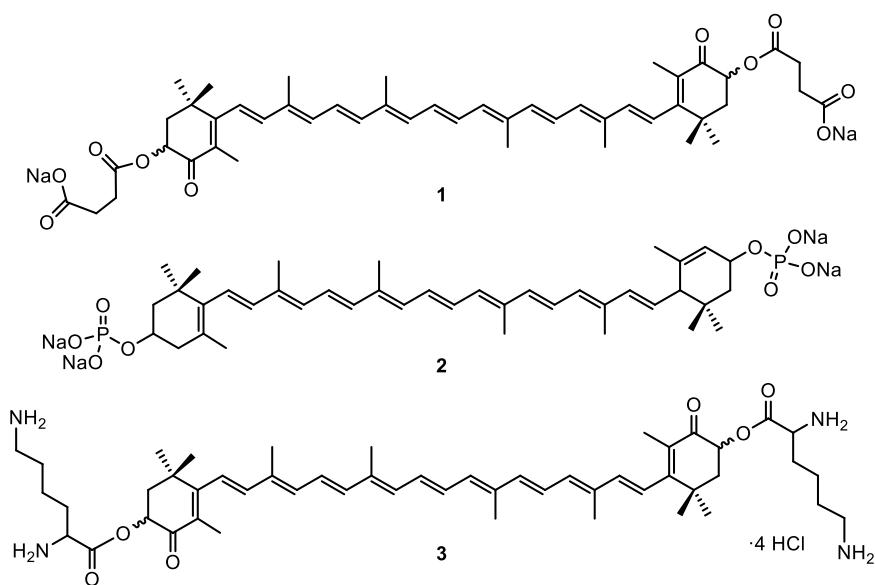
A hidrofil karakterű karotinoidok szintézisének alapvetően két indítéka van: az új vegyületek megváltozott vagy megnövekedett biológiai aktivitása miatti lehetséges gyógyászati felhasználásuk, illetve élelmiszer- (vagy agrár-)ipari felhasználásuk. A természetben csak néhány hidrofil karotinoid található, ezek közül a sáfrányban előforduló krocin valódi vízdoldékonyságot mutat. Számos, többnyire szabadalmaztatott módszert publikáltak már arra, hogy hogyan lehet fokozni a karotinoidok hidrofilitását. Ezek leginkább fizikai módszereket jelentenek, mint a polietilén-glikol (PEG) diszperziók, nanoemulziók, liposzómák és általában a nanokapszulázás.³⁸ Ezeket a módszereket kiterjedten alkalmazzák az élelmiszeriparban, ill. kozmetikumokban.

Ebben a részben a kémiai származékképzést fogom áttekinteni, illetve a komplexképzést, amiket magunk is alkalmaztunk hidrofil származékok előállítására.³⁹ Az új származékok kapcsán felmerülő legfontosabb kérdések – a hidrofilitás mértéke mellett – a következők: rendelkeznek-e legalább ugyanolyan antioxidáns hatással, mint a módosítatlan karotinoidok, és milyen toxikológiai és farmakokinetikai tulajdonságaik vannak. Sliwka és munkatársai kimutatták, hogy a hidrofil karotinoidok antioxidáns aktivitása vízben megnövekszik a hidrofób kiindulási vegyületek antioxidáns aktivitásához képest.⁴⁰

A komplexképzés megvalósítható ciklodextrinekkal (CD) is. 2000-ig a CD-eket csak szolubilizálószerként használták, egyszerűen karotinoidokkal keverve különböző arányban.⁴¹ Később kiderült, hogy a legalább egyik végén ciklikus végcsoportot nem tartalmazó karotinoidok (pl. likopin vagy bixin) 1:1 arányú zárványkomplexeket alkothatnak, amelyek magasabb oxidatív stabilitással rendelkeznek, mint a natív karotinoidok.⁴² A ciklikus

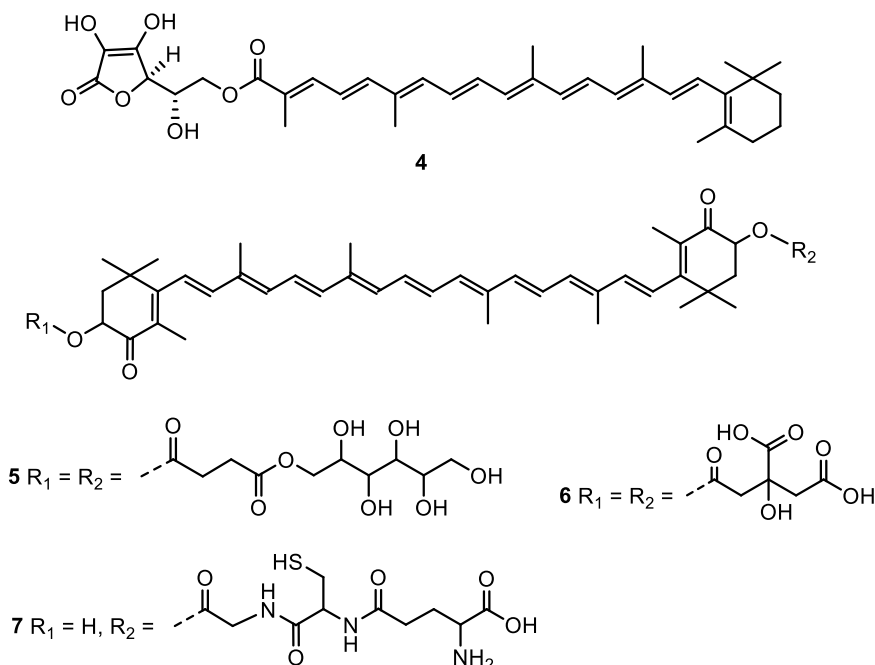
végcsoportok méretük miatt nem tudnak bejutni a CD-k viszonylag apoláris üregébe, de mindegyik végcsoportot 3-4 CD-molekula veszi körül, és másodlagos kölcsönhatások révén kötődik oda. Számos CD-származékot teszteltünk különböző karotinoidokkal, és a legsikeresebb készítmények a kapszantin, kapszorubin és lutein RAMEB (randomly methylated β -CD) komplexei voltak. Ezeknek a nanokapszulázott karotinoidoknak a legnagyobb hátránya, hogy viszonylag magas százalékban (95%) tartalmazznak CD-t, amely szükséges a komplexképző képességük és a komplexek vízoldhatóságának fenntartásához. Ezeknek a komplexeknek a vizes oldata azonban hónapokig stabil, aggregáció nem figyelhető meg, és a komplexképződés sem pH-függő. A RAMEB-lutein komplexről nemrégiben azt találták, hogy elősegíti a lutein beépülését az idegsejtekbe.⁴³ A ciklodextrineken kívül a karotinoidok más oligo- és poliszacharidokkal is képesek komplexeket alkotni, ilyenek a glicirrizinsav dimerjei vagy az arabinogalaktánok. Az ipari felhasználáshoz természetesen itt is szükség van a stabil komplexek kialakulására.⁴⁴

A karotinoidok hidrofil származékká alakítása megvalósítható töltéssel rendelkező, sószerű vegyületek vagy nagyon poláros csoportokat tartalmazó molekulák szintézisével is. Ilyen vegyületeket főként Lockwood és mtsai, valamint Sliwka és mtsai állítottak elő a 2000-es években. Az asztaxantin-diszukcinát dinátrium sója⁴⁵ (**1**) az egyik elsőként szintetizált hidrofil karotinoidszármazék (2.4. ábra), melyet már mint gyulladáscsökkentő szert alkalmaznak.⁴⁶ Más származékok, mint a difoszfát⁴⁷ (**2**) és a dilizínát⁴⁸ (**3**) hidrofilebbek, mert vízben jobban ionizálódnak. Az **1** vegyület (2,85 mg/ml) és a **2** vegyület (29,27 mg/ml) mérsékelten diszpergálható vízben, míg a **3** vegyület (181,6 mg/ml) az első szintetikus, valódi vízoldható karotinoid.



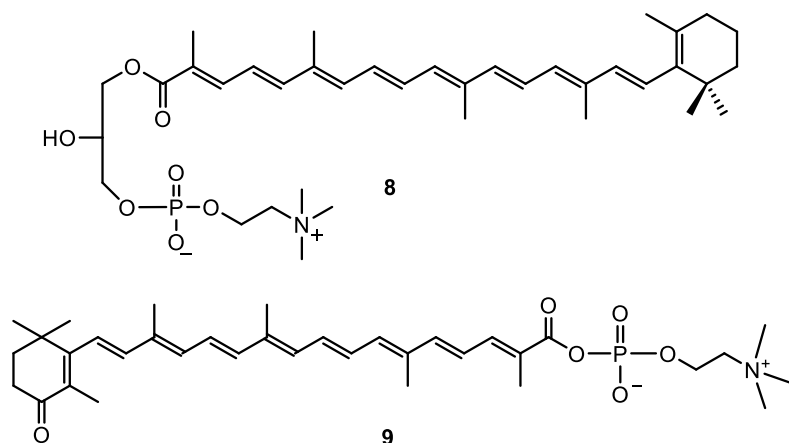
2.4. ábra

Steglich-féle észterképzéssel Lockwood és mtsai vízoldható cukorszármazékokat is előállítottak 8'-apo- β -karotinsavból aszkorbinsavval (**4**) és asztaxantin-biszszukcinátból cukoralkoholokkal (**5**). Hasonlóan észterképzéssel kaptak citromsav- (**6**), illetve glutationszármazékokat (**7**) asztaxantinből (2.5. ábra).⁴⁹



2.5. ábra

Sliwka és mtsai olyan kationos karotinoid-foszfolipideket állítottak elő, mint a **8** és **9** vegyületek, amelyekben egy kvaterner ammóniumrész felelős a molekulák amfipatikus jellegéért (2.6. ábra).⁵⁰

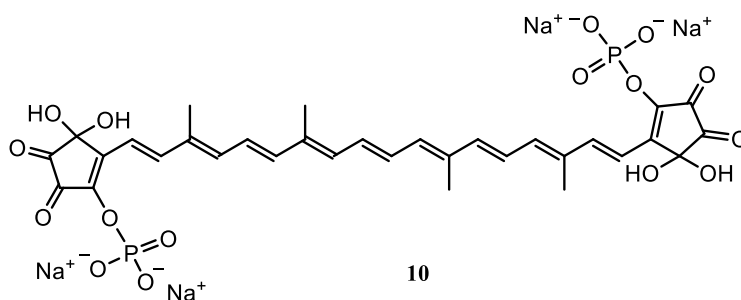


2.6. ábra

E figyelemre méltó foszfolipid-karotinoidok, valamint természetes hidrofíl karotinoidok, például a bixin és a krocin fizikai-kémiai tulajdonságait is tanulmányozták.⁵¹

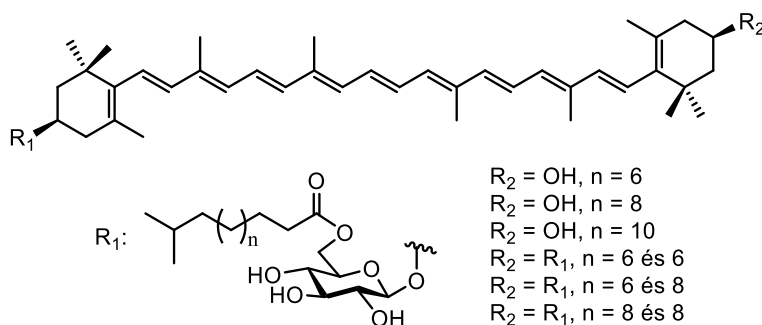
Aldoxim- és ketoxim-hidrokloridokat is szintetizáltak oxo-karotinoidokból, amelyek mérsékelt diszpergálhatóságot mutattak vízben.⁵² Mindezen vegyületek antioxidáns és aggregációs tulajdonságait is leírták a fent említett cikkekben.⁵³

Az alábbi violeritrin-típusú hidrofil diketon (**10**) nemcsak kítűnő antioxidáns hatással rendelkezik, hanem a – lehetőleg vízoldható – kék karotinoidok előállításáért folytatott intenzív kutatásban is előrelépésnek számít, hiszen vizes oldata ibolyáskék színű.

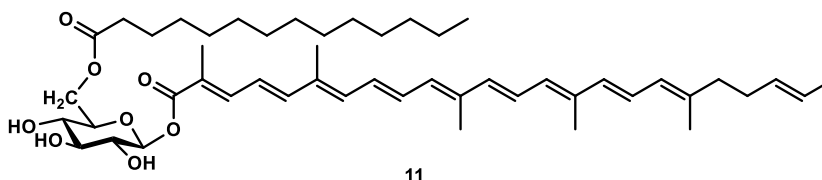


2.7. ábra

Potenciálisan vízoldhatóak lehetnek a karotinoid-glikozidok, amelyek jellemzően alacsonyabb rendű élőlényekben, mikroorganizmusokban fordulnak elő a természetben. Bizonyos hőtűrő baktériumok sejtmembránjai is tartalmaznak glikozidokat, és ezek a termoxantinoknak is nevezett vegyületek valamivel hidrofilebbek, mint az egyszerű karotinoidok (2.8. ábra). A termoxantinok hossza megegyezik a foszfolipid kettősréteg vastagságával, és amfifil szerkezetük révén beépülnek a sejtmembránba módosítva annak tulajdonságait. Úgy gondolják, hogy a termoxantinoknak ez a sajátos viselkedése részben felelős a *Thermus* fajok hőtűréséért.⁵⁴

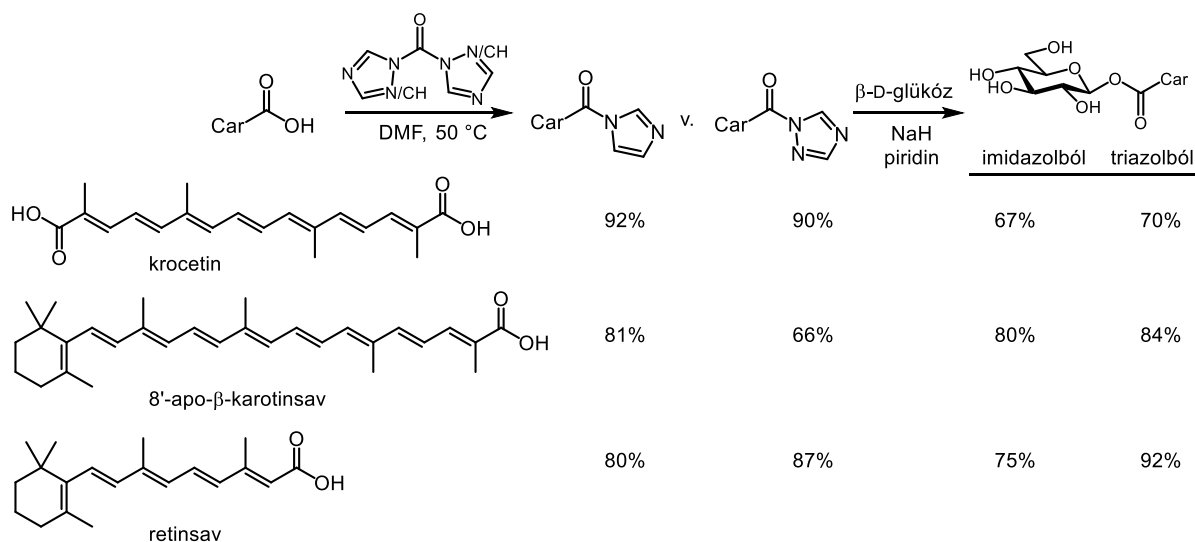


A *Staphylococcus aureus* narancsos színét okozó sztafiloxantin (**11**), hasonlóan a termoxantinokhoz, védi a baktériumot az oxidatív stressztől, és végső soron az immunrendszer sejtjeitől.⁵⁵



2.9. ábra. A sztafiloxantin szerkezete

A karotinoid-glikozidok kémiai szintézisére csak néhány módszert publikáltak, melyek a célvegyületeket több lépésben, igen alacsony hozamokkal szolgáltatják: karotinoid alkoholok direkt glikozilezését a klasszikus Königs-Knorr eljárással⁵⁶ és egy totálszintézist 3-hidroxi- β -jononból.⁵⁷ Az asztaxantin glikozidjait bioszintetikus eljárással is előállították.⁵⁸ Az aktivált karotinoid-savak használhatóak észter, vagy amid előállítására. Pfander et al. már a 80-as években általános eljárást dolgoztak ki karotinoidok cukorésztereinek szintézisére védetlen cukrokból meglehetősen jó kitermeléssel (2.10. ábra).⁵⁹



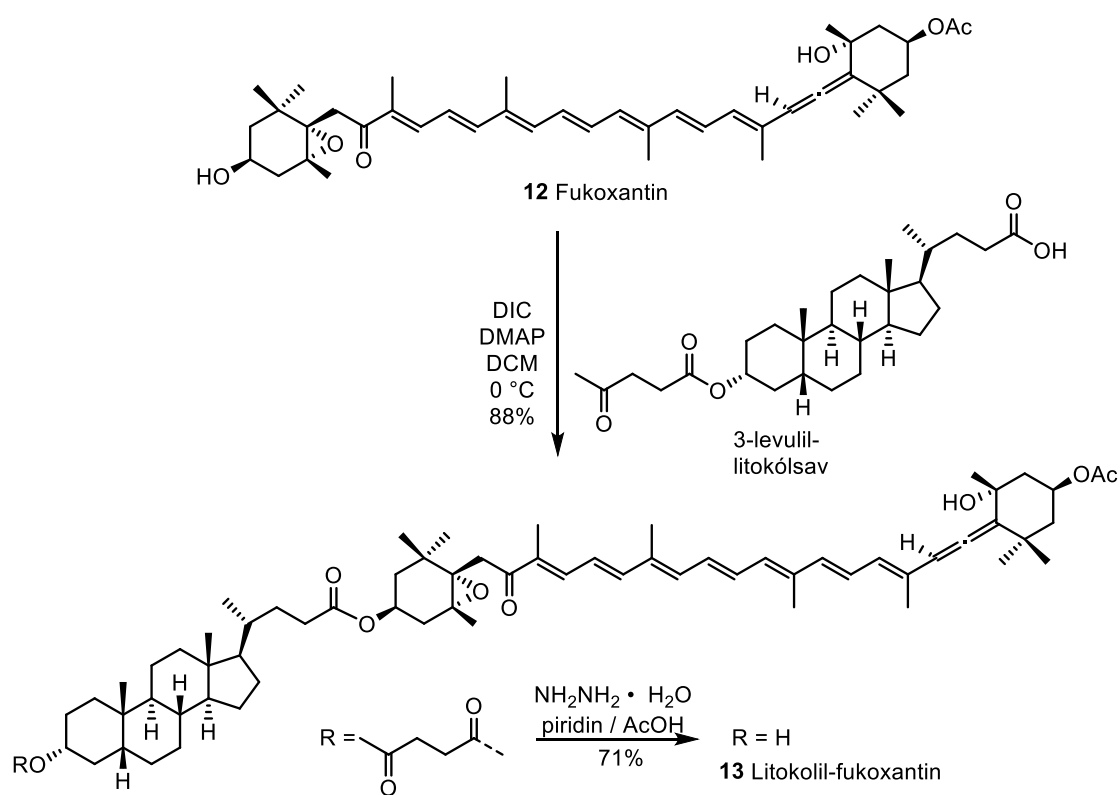
2.10. ábra. Karotinoidok glikozil-észtereinek előállítása

2.3.2. Karotinoid-észterek és amidok

A Steglich-féle észteresítés hasznos eszköz a karotinoidok származékképzésére: a reakció enyhe körülmények között is végbemegy, reprodukálható, és jellemzően jó hozammal szállítja a terméket. Szintetikus kémiai szempontból a gyakorlatban ugyanazt a 3-4 jól bevált variációt alkalmazzák. Az észterkötés hidrolititikus instabilitása biológiai körülmények között előnyt vagy hátrányt is jelenthet attól függően, hogy élelmiszerekben vagy gyógyszerkészítményekben használják őket, az észteresített karotinoid egyes esetekben gyógyszer-előanyagnak is tekinthető, hasonlóan pl. a penicillin-észterekhez.

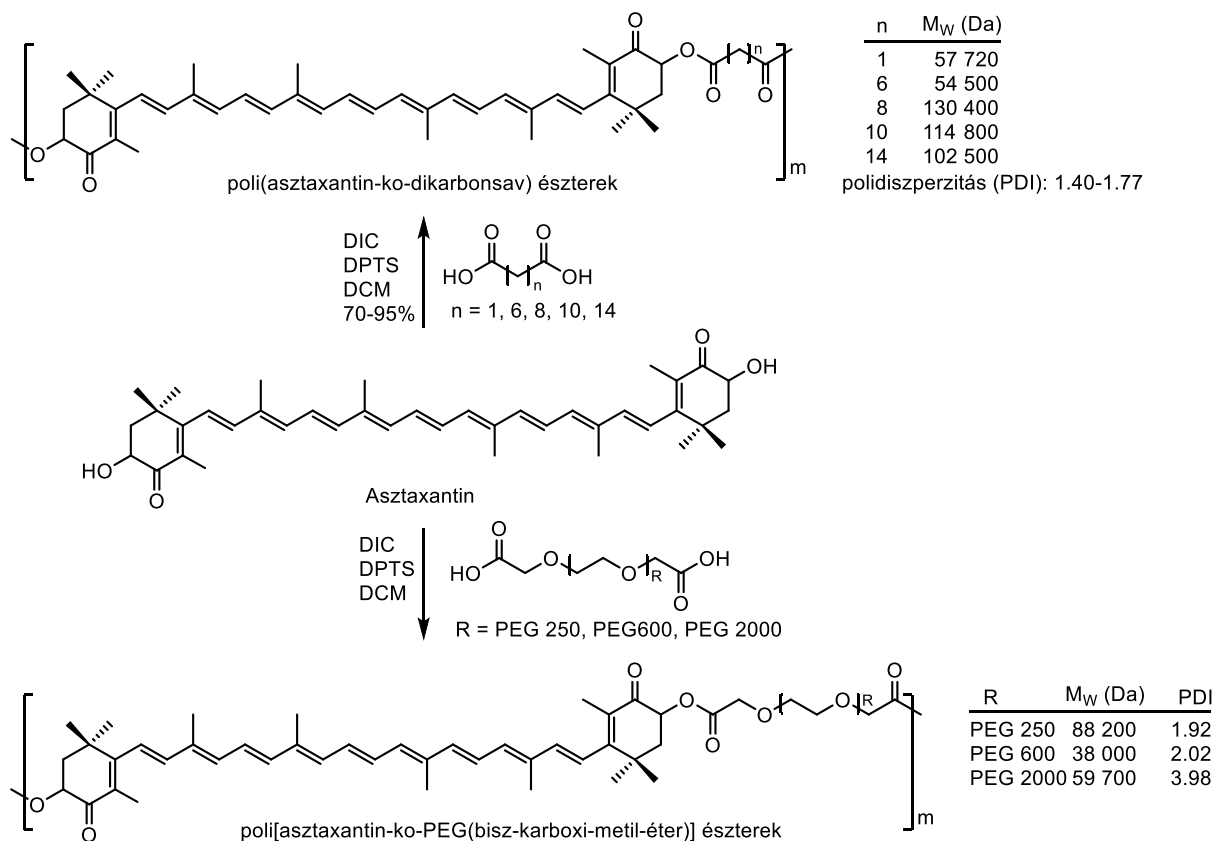
Hasonló módszerrel jóval stabilabb amidot is elő lehet állítani, de ehhez savszármazékra van szükség, amiből meglehetősen kevés akad a természetes karotinoidok között. Az alábbiakban álljon néhány érdekes példa észterekre és amidokra, hiszen mi is leginkább ezt a módszert használtuk a származékképzésre. Azokat az észtereket, melyek hidrofílek is, az előző fejezetben tárgyaltam.

A fukoxantin (**12**) szekunder hidroxilcsoportja szelektíven, 88%-os hozammal reagált levulinil-védett litokolsav karboxilcsoportjával (2.11. ábra). A szintézis célja az volt, hogy a fukoxantin jobban felszívódjon, beépüljön az epesavakat is tartalmazó micellákba. A védetlen konjugátumot a koleszterin-észteráz hidrolizálhatja, így fukoxantin szabadulhat fel, a bélben történő felszívódást azonban nem javította a litokolil konjugáció.⁶⁰



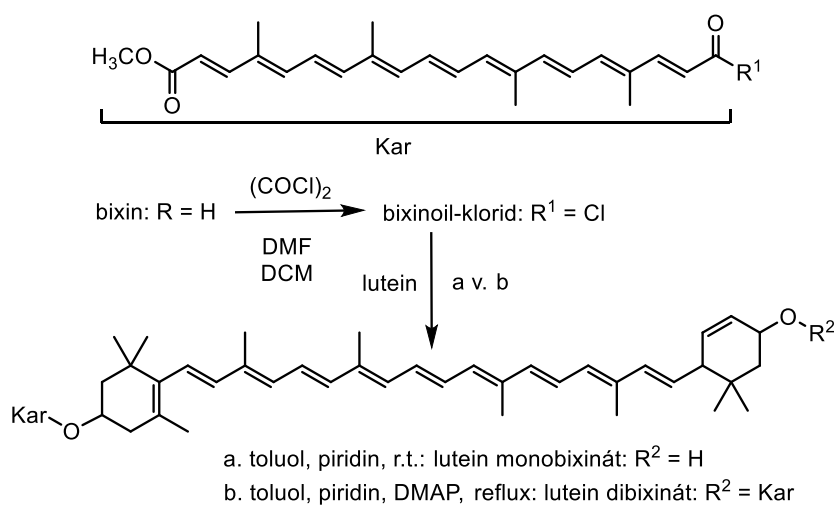
2.11. ábra

Weintraub et al. az asztaxantint különféle disavakkal (malonsav, szuberinsav, szebacinsav, dodekándisav, hexadekándisav), illetve polietilén-glikol származékokkal kopolimerizálták (2.12. ábra). A képződött polimerekben az asztaxantin megőrizte gyulladáscsökkentő és antimikrobiális hatását a *Staphylococcus aureus* MSSA476 és MRSA252, valamint a *S. epidermidis* 1457 ellen. Az asztaxantin polimerek nem befolyásolták a normál sebzáródást és a szövetek helyreállítását amikor azokat szubkután alkalmazták.⁶¹



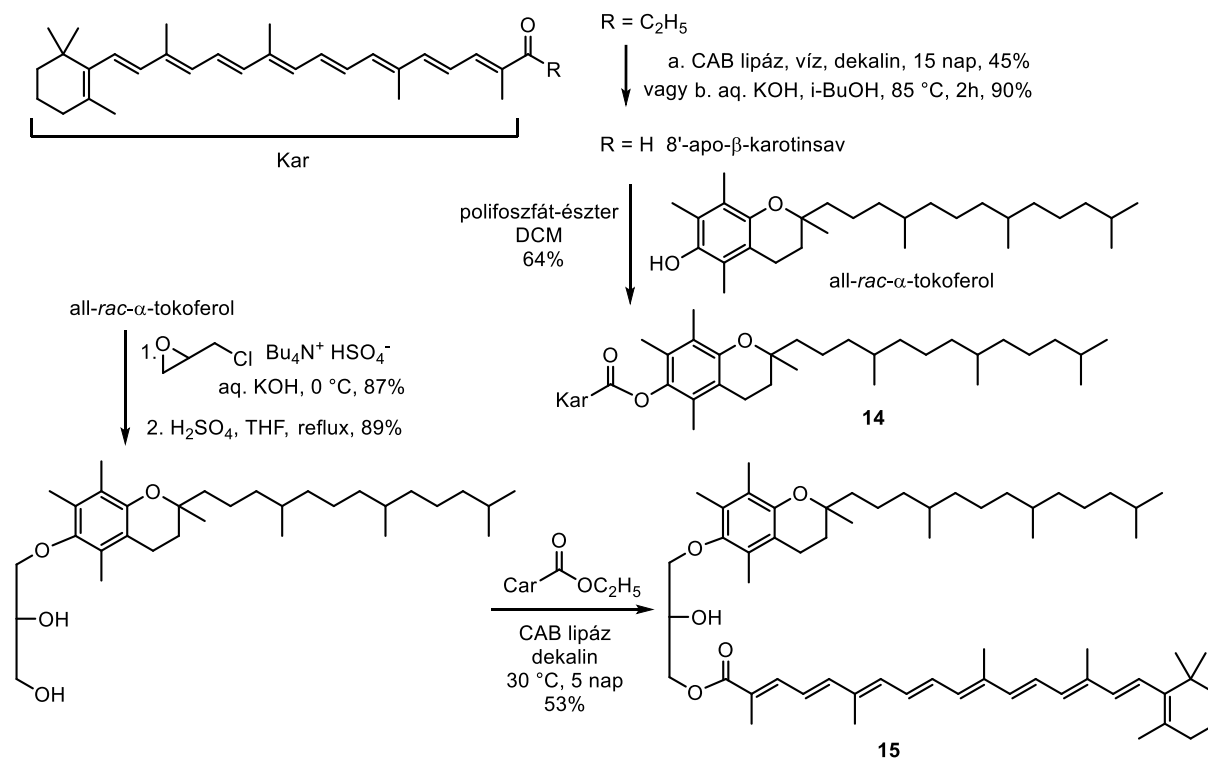
2.12. ábra. Asztaxantin kopolimerek előállítása

Előállítottak olyan észtereket is, ahol mindkét résztvevő karotinoid volt. A monokarbonsav bixinből savkloridot készítettek és luteinnel reagáltatták (2.13. ábra). A bixin feleslege esetén dibixinoil-származékot kaptak, de ekvivalens mennyiséggel a mono-származék is előállítható volt.⁶²



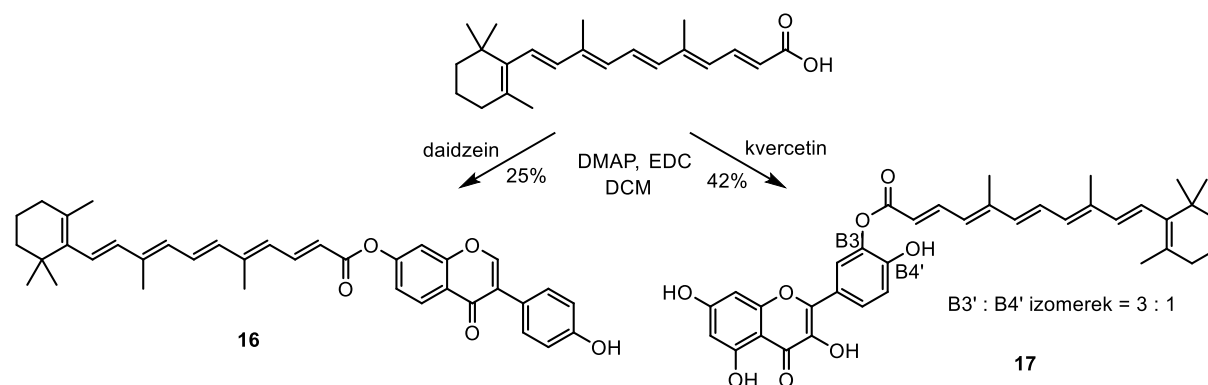
2.13. ábra

8'- β -apokarotinsavhoz lipáz-enzim segítségével szintén észter formában kapcsolták az E-vitamint, így a két zsírodható antioxidáns konjugátuma **14** jött létre (2.14. ábra). Hasonló módon a **15** glicerid is előállítható, amely akár trifunkcióssá is tehető a szabad OH-hoz történő további bioaktív molekula kapcsolásával.⁶³



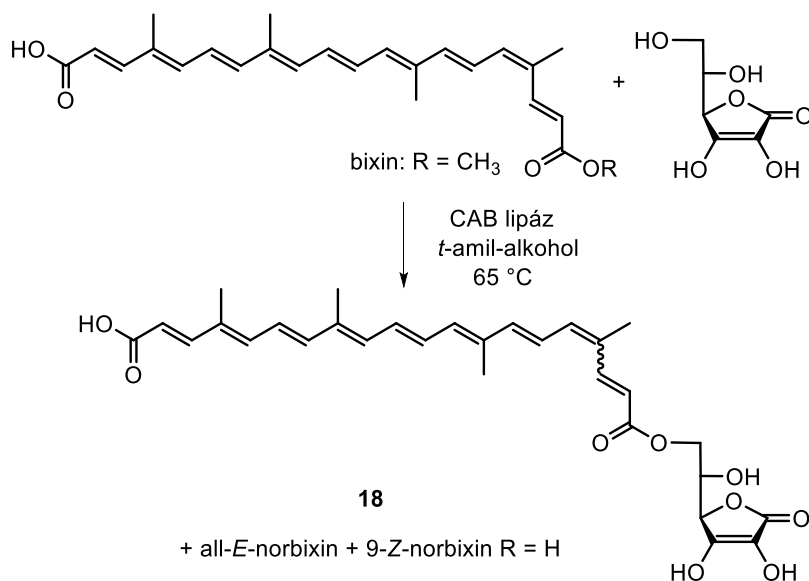
2.14. ábra

Különösen érdekesek lehetnek a lipofil és hidrofil antioxidánsok konjugátumai, amelyekben az egyes részek szinergikusan erősíthetik egymás antioxidáns hatását. Apokarotinsavakat viszonylag szelektíven lehet észterként flavonoidokhoz is kapcsolni, ekkor ismét bifunkciós vegyületek keletkeznek (2.15. ábra).⁶⁴ Érdekes módon a kvercetin esetében a kapcsolást követően teljesen megszűnt az antioxidáns hatás (**17**).



2.15. ábra

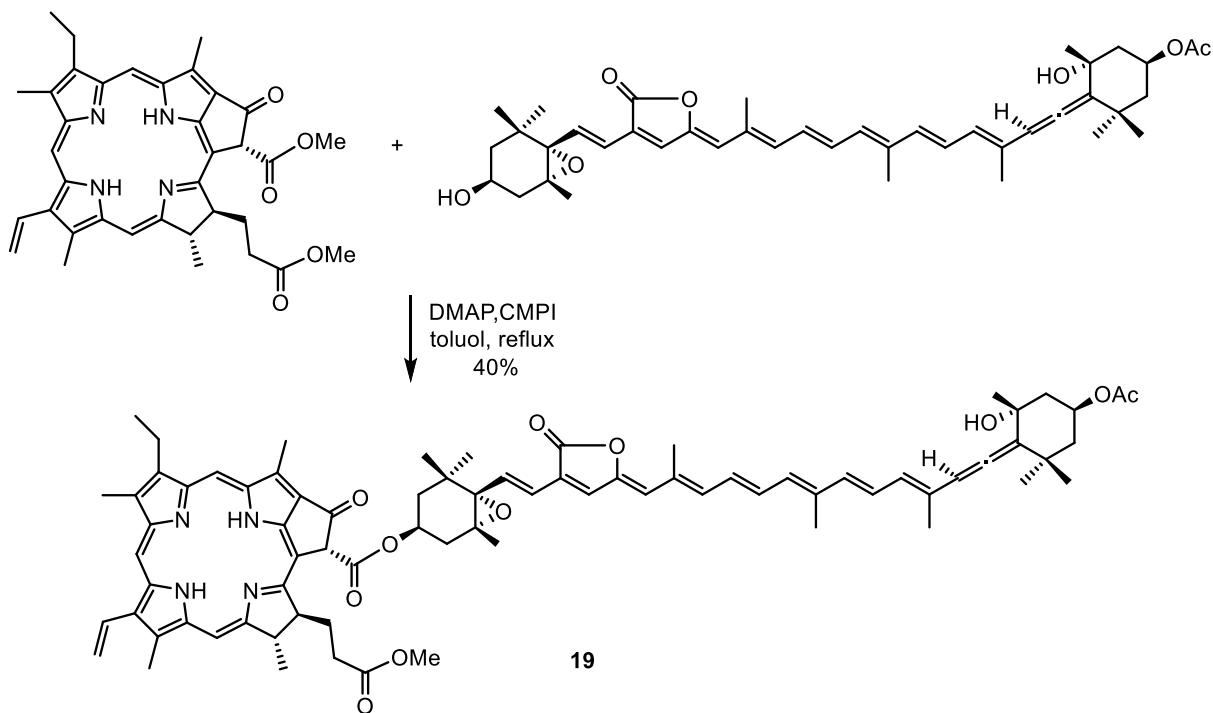
A védtelen aszkorbinsavval csak szerény hozammal sikerült a bixin enzimatisz átészterezése, bár szerves kémiai módszerrel kétségtelenül bonyolultabb lenne a célvegyület **(18)** előállítása (2.16. ábra).⁶⁵



2.16. ábra

A karotinoidok (pl. zeaxantin, fukoxantin) energiafelvevő antennaként működnek a fotoszintézisben, majd pedig energiáttranszferrel adják át a felvett energiát a klorofilloknak. A fotoszintetikus apparátuszban a karotinoidok nem kötődnek kovalensen a klorofillhoz, hanem közös fehérjekomplexben vannak jelen. Ha karotinoidokat kovalensen kapcsolunk porfirinvázis vegyületekhez, akkor olyan molekulák keletkeznek, amelyek egyes részletei között megvalósulhat az energiaátvitel, és általuk modellezhetjük a fotoszintézist, valamint a mesterséges fotoszintézis megvalósításához is találhatunk így megfelelő vegyületeket. Az alábbi peridinin-feoforbid konjugátumban **(19)** a szingulett-szingulett energiaátvitelt 54%-os hatékonyságúnak találták (2.17. ábra).⁶⁶ A hasonló vegyületekben a karotinoidok és a feoforbidok egyaránt megtartják az energiaátvitelhez szükséges eredeti szerkezetüket miközben a két molekularészlet szoros közelségben van, biztosítva a hatékony kölcsönhatást.⁶⁷

agocs.attila_230_24



2.17. ábra

3. Eredmények

3.1. Karotinoidok izolálása és szerkezetvizsgálata

Kutatócsoportunkban húsz évvel ezelőtt, a korábban említett módon, elsősorban szintetikus célokat tűztünk ki, azonban a nagy hagyományokkal rendelkező izolálással és szerkezetfelderítéssel kapcsolatos vizsgálatokat is folytattuk.⁶⁸ Ha valamilyen új metodikai lehetőség adódott vagy ismeretlen szerkezetű karotinoidot találtunk, azokat megvizsgáltuk és a bennük rejlő lehetőségeket igyekeztük kiaknázni. A közép-amerikai trópusi növények vizsgálata, amelyet 15 évvel ezelőtt kezdtünk a panamai Enrique Murillo professzorral együttműködve, különösen sok újdonságot és érdekességet szolgáltatott, ezért ezt az alábbiakban külön alfejezetekben tárgyalom.

3.1.1 Új, κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok trópusi növényekben – a mamey (*Pouteria sapote*) vizsgálata

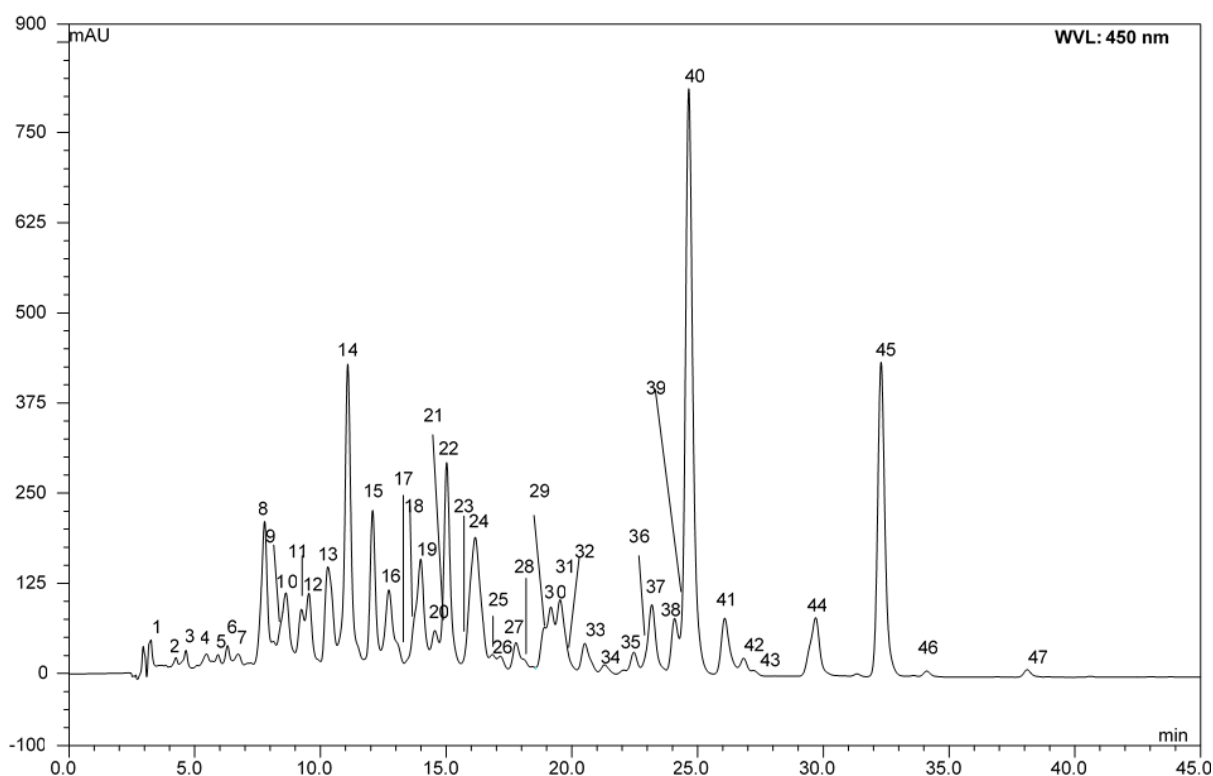
A κ -végcsoportot tartalmazó, jól ismert karotinoidok, mint a kapszantin, a kapszorubin és a kriptokapszin a piros paprika (*Capsicum annuum*) jellemző színanyagai. Itt a fő karotinoid a kapszantin, a másik kettő csak kis mennyiségben található meg. A karotinoidok κ -gyűrűje általában hidroxilezett, mint a kapszantinban és a kapszorubinban, de Maoka és mtsainak sikerült két minor karotinoidot is azonosítaniuk piros paprikából, amelyekben nem hidroxilált κ -gyűrű található: a 3'-dezoxi-kapszantint és annak 3,4-dehidro-származékát.⁶⁹



3.1. ábra. Piros és narancsszínű mamey (*Pouteria sapote*)

A Panamában élő trópusi növények karotinoid-összetételének vizsgálata számos fajban kimutatta a κ -karotinoidok jelenlétét. Nagy koncentrációban tartalmaz κ -karotinoidokat például a mamey (*Pouteria sapota*), a maracuya chino (*Cionosicyos macrunthus*) és a jipi-japa (*Carludovica palmata*) termése, valamint a *Zamia dressleri* fiatal vörösesbarna levelei és vörös színű magjai. A maracuya chino kivételével mind a három növény karotinoidösszetételét kutatócsoportunk írta le először, amit a következő fejezetekben fogok tárgyalni.

A mamey, más néven sapote, a Karibi-térségben és Közép-Amerikában őshonos gyümölcs. A narancsos vagy piros színe igen magas karotinoidtartalmának köszönhető (3.1. ábra). A 3.2 ábrán látható HPLC-kromatogram alapján a teljes extraktumban több mint 40 karotinoidot találtunk, amelyek nagy részét azonosítani is sikerült, így elsőként írtuk le a teljes karotinoidösszetételt. Ehhez az igen komplex extraktum preparatív elválasztására volt szükség: az alumínium-oxidon végzett kromatográfiával nyert különböző polaritású frakciókból további 2-3 kromatográfiás lépéssel (elsősorban kalcium-karbonáton) sikerült az azonosításhoz megfelelő tisztaságban és mennyiségben kinyerni az egyes pigmenteket. Sok új anyagot is találtunk, azok derivatizálásával és NMR spektroszkópiával általában meg tudtuk határozni a szerkezeteket.⁷⁰



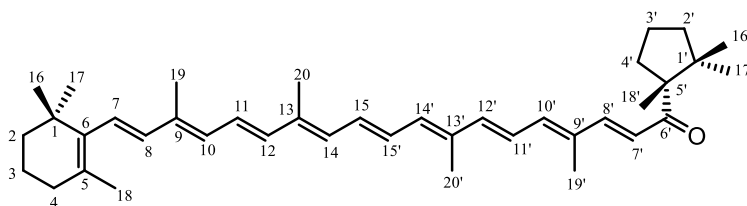
3.2. ábra. A mamey teljes extraktumának HPLC kromatogramja YMC C30-oszlopon, 450 nm-en detektálva

3.1. táblázat. A mamey karotinoid-összetétele és a csúcsok spektrális adatai

No.	Karotinoid	%	λ (nm)	MS (m/z)
1	Nem azonosított	0.8	419, 444	
2	Nem azonosított	0.2	416, 431	
3	Nem azonosított	0.4	440, 466	
4	5,6-Diepilatoxantin	0.3	416, 441, 468	
5	6-Epilatoxantin	0.1	414, 438, 467	
6	Nem azonosított	0.3	439, 467	
7	(9/9'Z)-5,6-Diepilatoxantin	0.3	412, 436, 463	
8	Neoxantin	3.8	416, 440, 468	601.3 [M+H] ⁺ ; 583.3 [M+H-H ₂ O] ⁺
9	Neokróm	1.8	402, 423, 448	601.3 [M+H] ⁺
10	Violaxantin	3.0	416, 440, 468	601.2 [M+H] ⁺ ; 583.2 [M+H-H ₂ O] ⁺
11	Nem azonosított furanoid	1.1	398, 421, 448	
12	Kapszoneoxantin	1.7	463	601.3 [M+H] ⁺
13	Luteoxantin	3.5	398, 421, 448	601.3 [M+H] ⁺ , 531.3, 425.2
14	Kapszantin-5,6-epoxid	9.2	464	601.3 [M+H] ⁺ ; 583.2 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 425.2
15	β -Kriptoxantin-5,6,5',6'-diepoxid	4.0	415, 438, 468	585.3 [M+H] ⁺ ; 567.4 [M+H-H ₂ O] ⁺
16	(9Z)-Violaxantin	3.0	411, 434, 463	601.3 [M+H] ⁺ ; 583.3 [M+H-H ₂ O] ⁺
17	Nem azonosított (9/9'Z)-izomer		433, 462	
18	Nem azonosított furanoid		396, 419, 446	
19	β -Kriptoxantin-5,6,5',8'-diepoxid	4.3	398, 421, 448	585.2 [M+H] ⁺ , 567.4 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 425.1
20	β -Kriptoxantin-5,8,5',6'-diepoxid	0.3	398, 421, 448	585.2 [M+H] ⁺
21	Kapszorubin + (13Z/13'Z)- nem azon.	6.8	481 és 454	
22	Kriptokapszin-5,6-epoxid		467	585.3 [M+H] ⁺ ; 567.3 [M+H-H ₂ O] ⁺
23	3'-Dezoxikapszantin-5,6-epoxid + Kapszantin	6.2	467, 475	585.3 [M+H] ⁺ 585.3 [M+H] ⁺
24	β -Kriptoxantin-5,8,5',8'-diepoxid (9Z)-Kapszantin 5,6-epoxid		388, 402, 426 460	555.3 [M+H] ⁺ ; 601.3 [M+H] ⁺
25	Kriptokapszin-5,8-epoxid	0.1	448	
26	Nem azonosított	0.1	421, 447, 475	
27	Piros (13Z)- nem azonosított	1.1	468	569.4 [M+H] ⁺ , 551.3 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 425.1
28	Piros (13Z)- nem azonosított		468	
29	β -Karotin-5,6,5',8'-diepoxid	3.0	398, 421, 447	569.4 [M+H] ⁺
30	(13Z/13'Z)-Kriptokapszin		463	569.3 [M+H] ⁺
31	(13Z/13'Z)-Kriptokapszin	2.9	463	569.3 [M+H] ⁺
32	β -Kriptoxantin-5,6-epoxid		444, 472	569.3 [M+H] ⁺
33	Nem azonosított	1.0	450, 475	

34	3'-Dezoxi-kapszorubin	0.3	482	585.2 [M+H] ⁺
35	3'-Dezoxi-kapszantin	0.6	473	569.3 [M+H] ⁺
36	Nem azonosított	2.6	445, 470	
37	β -Kriptoxantin-5,8-epoxid	1.7	427, 451	569.3 [M+H] ⁺
38	β -Kriptoxantin-5,8-epoxid	1.7	427, 451	569.3 [M+H] ⁺
39	Nem azonosított	21.4	469	
40	Kriptokapszin	0.3	472	569.3 [M+H] ⁺ , 551.3
41	(13Z/13'Z)-Szapotexantin	2.3	354, 461	553.3 [M+H] ⁺
42	β -Karotin-5,6-epoxid	0.3	420, 444, 472	
43	3,3'-Didezoxi-kapszorubin	2.8	482	569.3 [M+H] ⁺
44	β -Karotin-5,8-epoxid	11.2	427, 452	553.4 [M+H] ⁺ , 516.3, 425.4
45	Szapotexantin	0.1	473	553.3 [M+H] ⁺ , 531.2
46	(9/9'Z)-Szapotexantin	0.3	468	
47	β -Karotin	0.3	450, 476	

A piros húsú mamey fő karotinoidjai (3.2. ábra, 3.1. táblázat) a kapszantin-5,6-epoxid (14. csúcs), a kriptokapszin (40. csúcs) és a szapotexantin (45. csúcs). A szapotexantin új karotinoid 3'-dezoxi-kappa végcsoporttal (3.3. ábra), ráadásul fő komponensként viszonylag nagy mennyiségben (20-40 mg) volt izolálható a legapolárosabb kromatográfiás frakcióból.⁷¹ Így nem csak a szerkezetazonosításra, hanem derivatizálásra, epoxidok előállítására is fel tudtuk használni, amivel további minor komponenseket is azonosítani tudtunk, valamint részletesebb biológiai vizsgálatok elvégzésére is lehetőség nyílt.⁷²

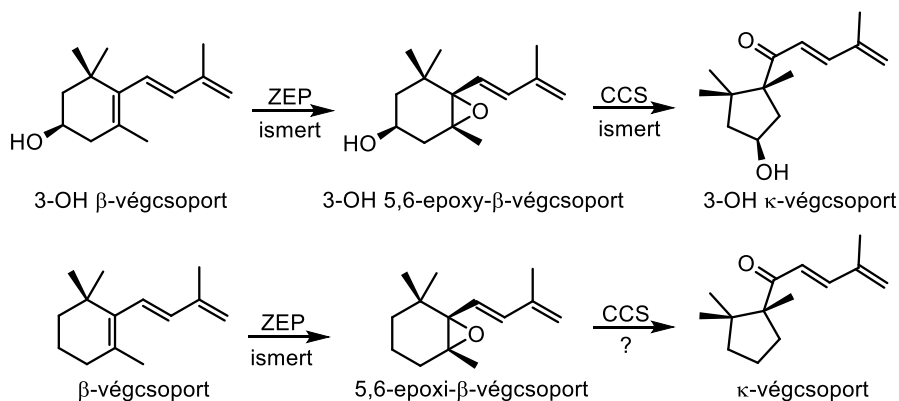


3.3. ábra. Szapotexantin (β, κ -karotin-6'-on)

A fenti 3.1. táblázatban félkövérrel szedve jelöltem azokat az anyagokat, amelyek korábban ismeretlen szerkezetűek voltak, ezek többnyire dezoxi-kappa végcsoporttal rendelkeznek. A mamey a szapotexantinon kívül sok kriptokapszint is tartalmaz. A hidroxilátlan β -végcsoport miatt mindkét karotinoid A-provitamin hatású, tehát a mamey jó A-vitamin forrásnak tekinthető.

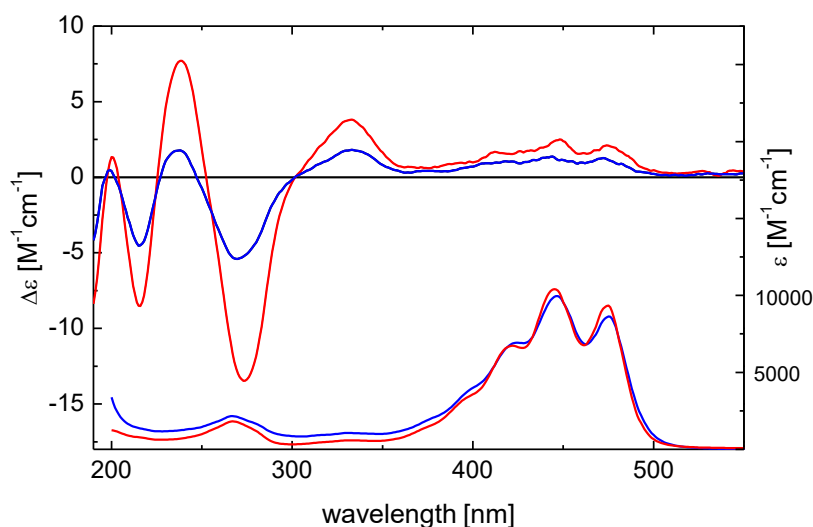
Természetesen felvetődött a kérdés, vajon hogyan keletkezhetnek a mameyben a dezoxi-kappa karotinoidok ilyen mennyiségben, milyen enzimek közreműködése szükséges. A

paprikában található karotinoidok bioszintézisével kapcsolatban korábban bebizonyosodott, hogy a kapszantin-kapszorubin szintáz (CCS) katalizálja a 3-hidroxi-5,6-epoxi- β végcsoport 3-hidroxi-6-oxo- κ -végcsoporttá történő átalakulását (3.4. ábra).²⁵ A fenti 3.1. táblázatban látható, hogy a mamey extraktumban jelen van β -karotin-5,6-epoxid. Ez alapján valószínűnek tűnik, hogy a szapotexantin β -karotinból β -karotin-5,6-epoxidon keresztül bioszintetizálódik, hasonlóan, mint a kapszantin zeaxantinból az anteraxantinon keresztül. Ez azt is feltételezi, hogy a CCS (csak a mameyben?) nem szelektív a hidroxi- β -végcsoportra.



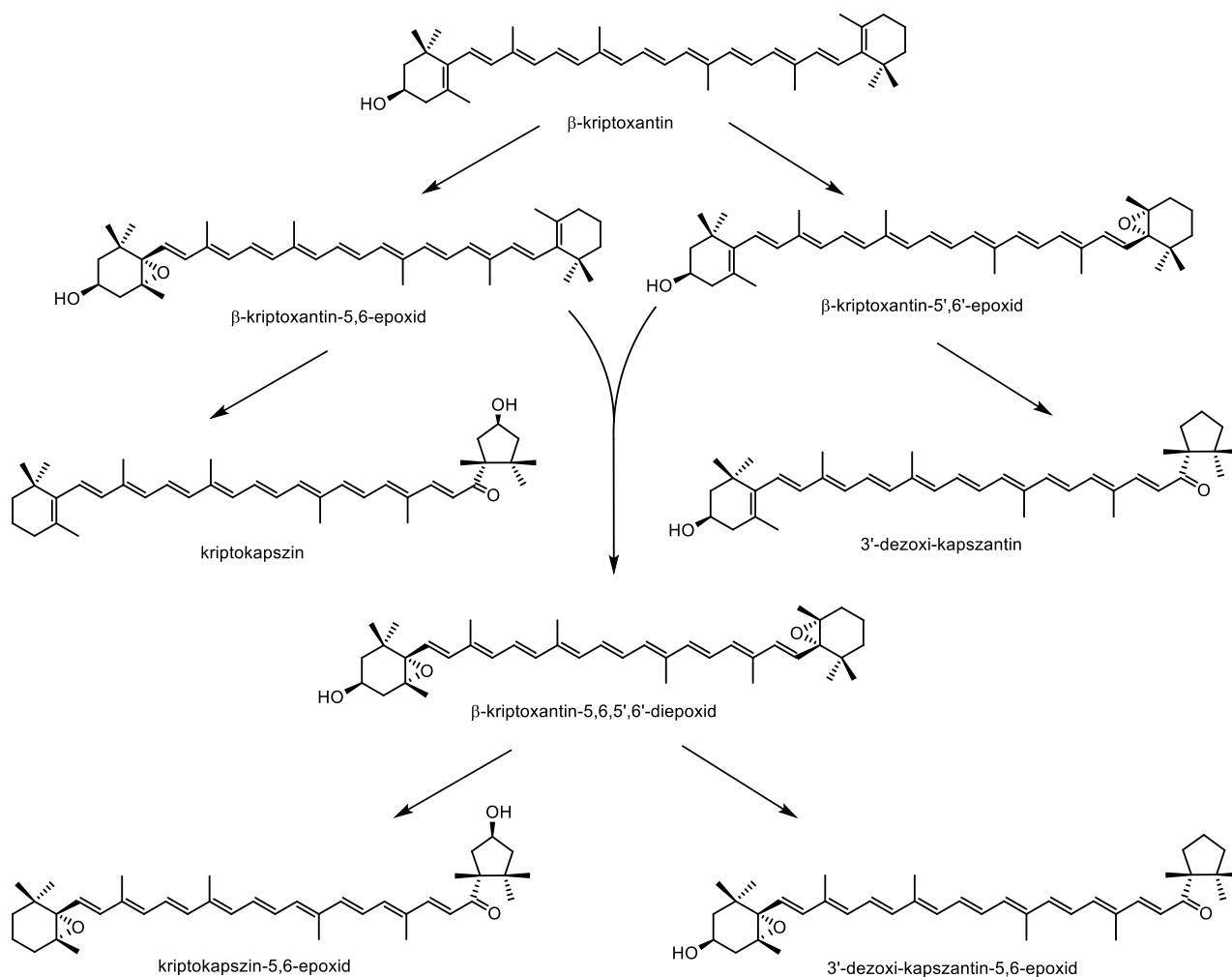
3.4. ábra. A κ -végcsoport feltételezett keletkezése β -végcsoportból

A mamey további frakcióinak elemzésekor sikerült azonosítanunk a kriptokapszin 5,6- és 5,8-epoxidjait, valamint egy új karotinoidot, a 3'-dezoxi-kapszantin-5,6-epoxidot. A kriptokapszin epoxidokat mesterségesen is előállítottuk, az (5*R*,6*S*)- és az (5*S*,6*R*)-sztereoizomereket HPLC-ECD analízissel azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy a természetben az (5*R*,6*S*) vagy ún. *anti* konfiguráció fordul elő.



3.5. ábra. A (3*S*,5*R*,6*S*)- β -kriptoxantin-5,6-epoxid (kék) és a (3*R*,5'*R*,6'*S*)- β -kriptoxantin-5',6'-epoxid (piros) ECD és UV/Vis spektrumai acetonitrilben.

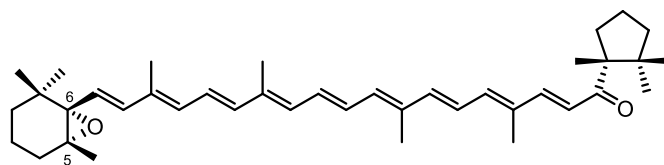
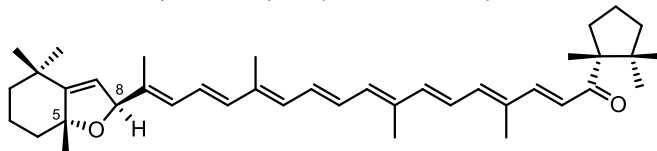
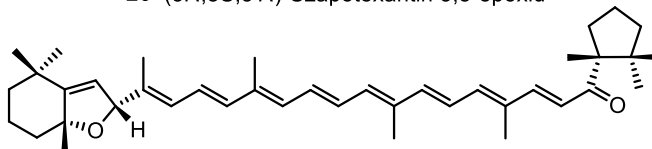
Hasonlóan azonosítottuk az összesen négy elvileg lehetséges β -kriptoxantin-5,8-epoxid közül a természetben előfordulókat.⁷³ Az epoxidok azonosítása azért fontos, mert ezek az új típusú dezoxi-kappa végcsoportot tartalmazó vegyületek feltételezett bioszintetikus előanyagai.



3.6. ábra A dezoxi-kappa karotinoidok feltételezett bioszintetikus útja kriptoxantinból kiindulva

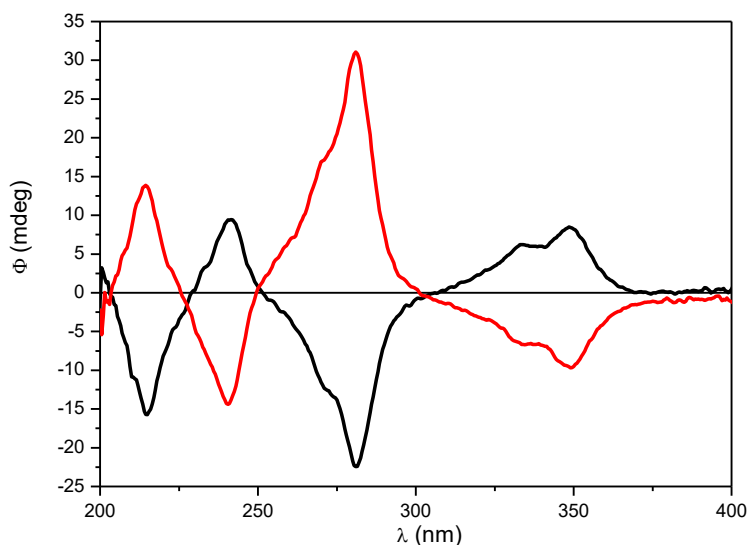
Megtaláltuk és azonosítottuk a β -kriptoxantin-5,6-epoxidot, a β -kriptoxantin-5',6'-epoxidot, a Maoka által korábban izolált 3'-dezoxi-kapszantin⁶⁹ és természetesen a fő karotinoidnak számító kriptokapszint is egy újabb frakcióban.⁷⁴ A 3.5. ábrán látható, hogy a két természetes 5,6-epoxid, illetve 5',6'-epoxid izomerben ugyanolyan *anti* konfigurációjú az epoxid. Ezen epoxidok jelenléte is bizonyítja az általunk feltételezett bioszintetikus út helyességét (3.6. ábra).

A bioszintézis szempontjából fontos két új minor epoxi-karotinoidot, a szapotexantin-5,6-epoxidot és a szapotexantin-5,8-epoxidot is sikerült azonosítanunk a mameyből (3.7. ábra).

25 (5*R*,6*S*,5'*R*)-Szapotexantin-5,6-epoxid26 (5*R*,8*S*,5'*R*)-Szapotexantin 5,8-epoxid27 (5*R*,8*R*,5'*R*)-Szapotexantin 5,8-epoxid

3.7. ábra Természetes szapotexantin-epoxidok

Itt is az (5*R*,6*S*)-5,6-epoxid és a belőle keletkező 5,8-epoxidok voltak megtalálhatóak a természetes forrásban, az (5*S*,6*R*) csak szintetikusán keletkezik (3.8. ábra).⁷⁵



3.8. ábra Az (5*R*,6*S*,5'*R*)-szapotexantin-5,6-epoxid (fekete, 25) és (5*S*,6*R*,5'*R*)-szapotexantin-5,6-epoxid (piros) online HPLC-ECD spektrumai.

Kutatócsoportunkban izolálták a szapotexantin-5,6-epoxidból keletkező didezoxi-kapszorubint és a bioszintézis másik lehetséges végtermékét, a dezoxi-kapszorubint is, ami kriptokapszin-5,6-epoxidból keletkezhethet (3.11. ábra).⁷⁶

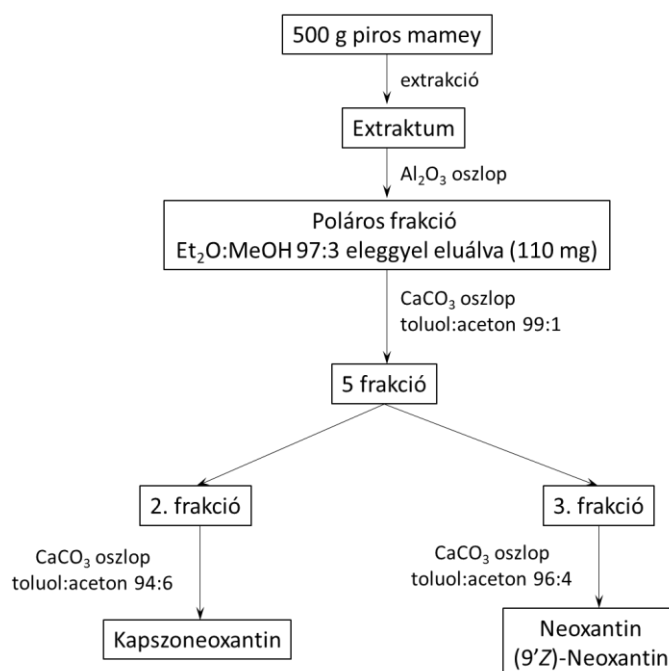
Eredményeink alapján a következő általános megállapításokat tehetjük:

a. A piros mameyben mind a nem hidroxilezett gyűrűk epoxidációjáért felelős enzimnek, mind az epoxidok átrendeződését katalizáló enzimnek nagyon aktívnak kell lennie ahhoz, hogy a keletkező karotinoidokat ilyen magas koncentrációban tudjuk detektálni.

b. A természetes 5,6-epoxi-karotinoidok (5*R*,6*S*)-konfigurációjúak, függetlenül attól, hogy a hattagú gyűrűn van-e hidroxilcsoport, vagy nincs.

c. A felszintetikus epoxidok előállítása során (5*S*,6*R*) konfigurációjú vegyületet is kapunk. Ha a gyűrű nem hidroxilezett, a két epoxid izomer csak királis oszlopon választható el.

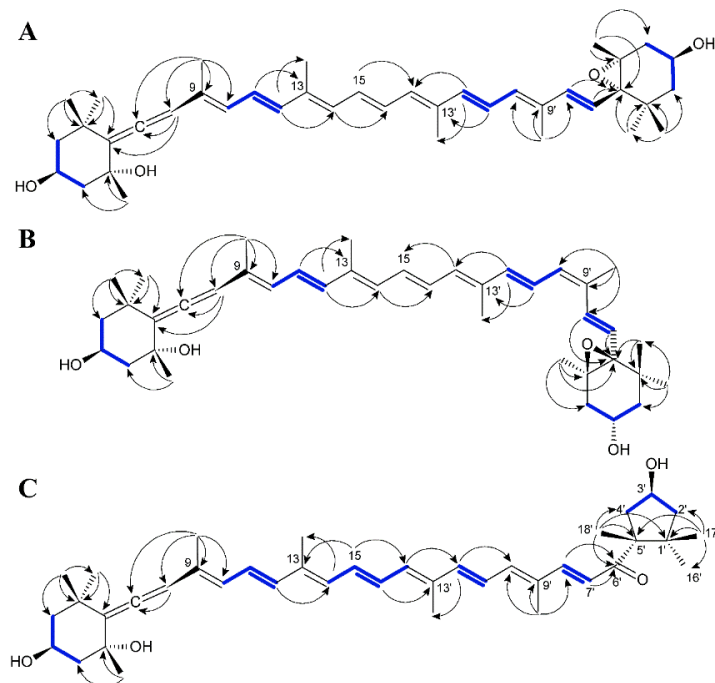
A piros mamey általában viszonylag nagy mennyiségben tartalmazza a sokféle karotinoidot, ami lehetővé teszi a kisebb komponensek izolálását is. Egymást követő kromatográfias lépésekkel és kristályosítással a legpolárisabb frakciókból milligrammos mennyiségben és nagy tisztasággal izoláltunk allén-karotinoidokat, úgymint neoxantint, (9'*Z*)-neoxantint és kapszoneoxantint.⁷⁷ Az alábbi 3.9. ábra jól szemlélteti a *modus operandi*-t az ilyen típusú izolálások során. Mivel a legnagyobb kalcium-karbonátos oszlop terhelhetősége 20 mg körül van, egy 100-200 mg-os keverék 5-10 oszlopon választható el.



3.9. ábra. A kapszoneoxantint izolálása

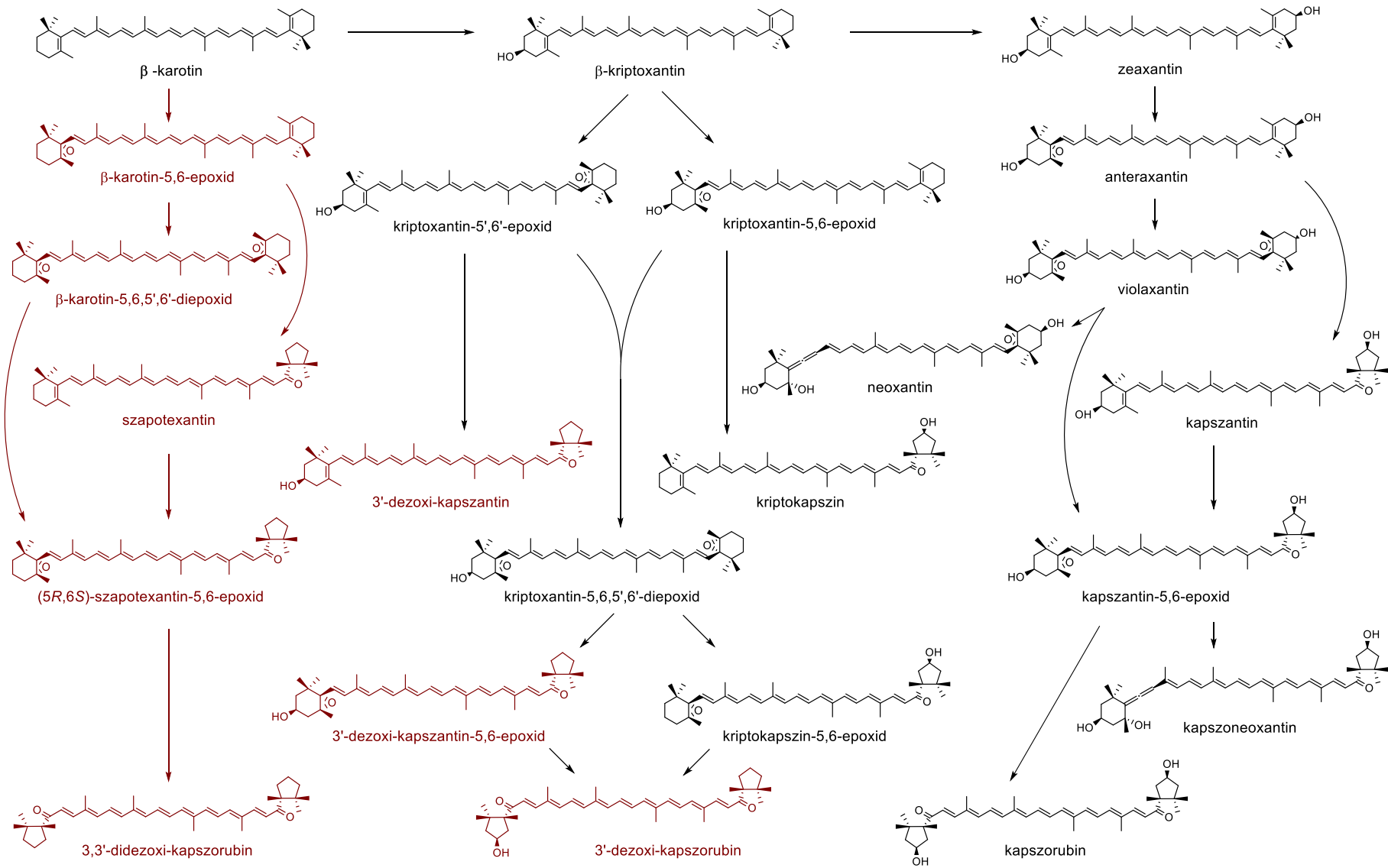
Mintegy 20 évvel ezelőtt kutatócsoportunkban a kapszoneoxantint csak tized mg-os mennyiségben sikerült izolálni az *Asparagus falcatius* bogyójából,⁷⁸ de most teljes NMR és ECD elemzéshez elegendő néhány mg-os mennyiség állt rendelkezésre. A neoxantint és a (9'*Z*)-neoxantint teljes ¹H- és ¹³C-NMR hozzárendelése 2D technikával szintén első alkalommal

valósult meg (3.10. ábra).⁷⁹ Ezeket a tapasztalatokat később is felhasználtuk, pl. a lutein *cis*-izomerjeinek azonosításához.⁸⁰ A neoxantin izomerek ECD spektrumai jó összhangban voltak az irodalmi adatokkal, a kapszoneoxantin spektruma *n*-hexános oldatban aggregátumképződésre utalt.



3.10. ábra. Fontosabb HMBC (→) és ¹H-¹H COSY (—) korrelációk az all-*E*-neoxantinban (A), (9'*Z*)-a neoxantinban (B) és a kapszoneoxantinban (C).

A mamey vizsgálatok szerzett tapasztalatainkat összefoglalva elmondhatjuk, hogy itt a karotinoidok bioszintézise kicsit másképp történik, mint a többi növényben. A kapszantin-kapszorubin szintáz valószínűleg jóval aktívabb és a nem-hidroxilezett epoxidokat is át tudja alakítani az újonnan felfedezett dezoxi-kappa végcsoporttá. Ehhez persze az is szükséges, hogy az epoxidázok se elsősorban a dihidroxi-szubsztrátumokkal dolgozzanak (zeaxantin), hanem ugyanolyan, illetve nagyobb aktivitással alakítsák át a β-karotin vagy a β-kriptoxantin hidroxilátlan β-végcsoportját. Az általunk felfedezett karotinoidok segítségével kiegészíthetjük a karotinoid bioszintézis korábban ismert általános mechanizmusát a dezoxi-kappa végcsoport keletkezésével (3.11. ábra).

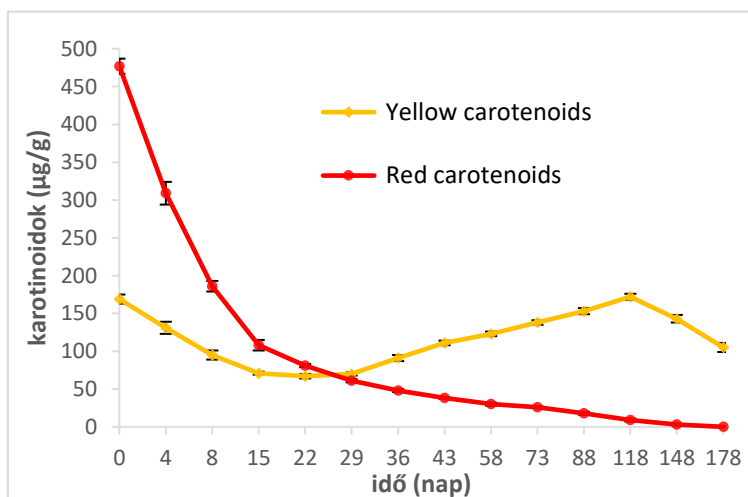


3.11. ábra. Feltételezett karotinoid bioszintézis-utak a mameyben.

3.1.2. Egyéb trópusi növények vizsgálata

A jipi-japa (*Carludovica palmata*) és a zamia (*Zamia dressleri*) endemikus fajok, többnyire Közép-Amerika erdőiben található meg. A jipi-japa termésének és a zamia barna leveleinek teljes és részletes karotinoid analízisét HPLC-MS segítségével végeztük el, mind C30-as, mind C18-as oszlopon, hogy lehetővé tegyük a jobb azonosítást. A jipi-japa teljes kivonatából összesen 22 komponenst mutattunk ki és 15-öt azonosítottunk, a barna zamia levelek extraktumának 32 komponensből 17-et sikerült azonosítani.⁸¹ Az azonosított karotinoidok között találtunk olyan, dezoxi-kappa végcsoporttal rendelkezőket is, amelyeket előtte a mameyből izoláltunk. A teljes karotinoidtartalom közel 50 %-a mindkét növényben a kapszorubinnak tulajdonítható. Ez a karotinoid általában minor (2-3 %) komponensként van jelen más forrásokban, például a pirospaprikában, amelyekből így elég nehezen izolálható kézzelfogható mennyiség. A kapszorubin totálszintézisét is leírták már, a kulcsreakció a hidroxi-epoxi- β -gyűrű pinacol átrendeződése κ -gyűrűvé.⁸² Ebben a két forrásban jelentős mennyiségben vannak jelen egyéb κ -végcsoportot tartalmazó karotinoidok is.

Egyes zamia fajok (pl. a fent említett *Zamia dressleri*) levelei egyfajta „fordított érésen” mennek keresztül, vagyis a fejlődés során az eredeti barna színüket zöldre változtatják. Meghatároztuk a karotinoidok mennyiségét és összetételét a levelek különböző fejlődési szakaszaiban, különös tekintettel a piros és sárga karotinoidok változására (3.12. ábra), melyeket egyszerre, azonos mérésből határoztuk meg.



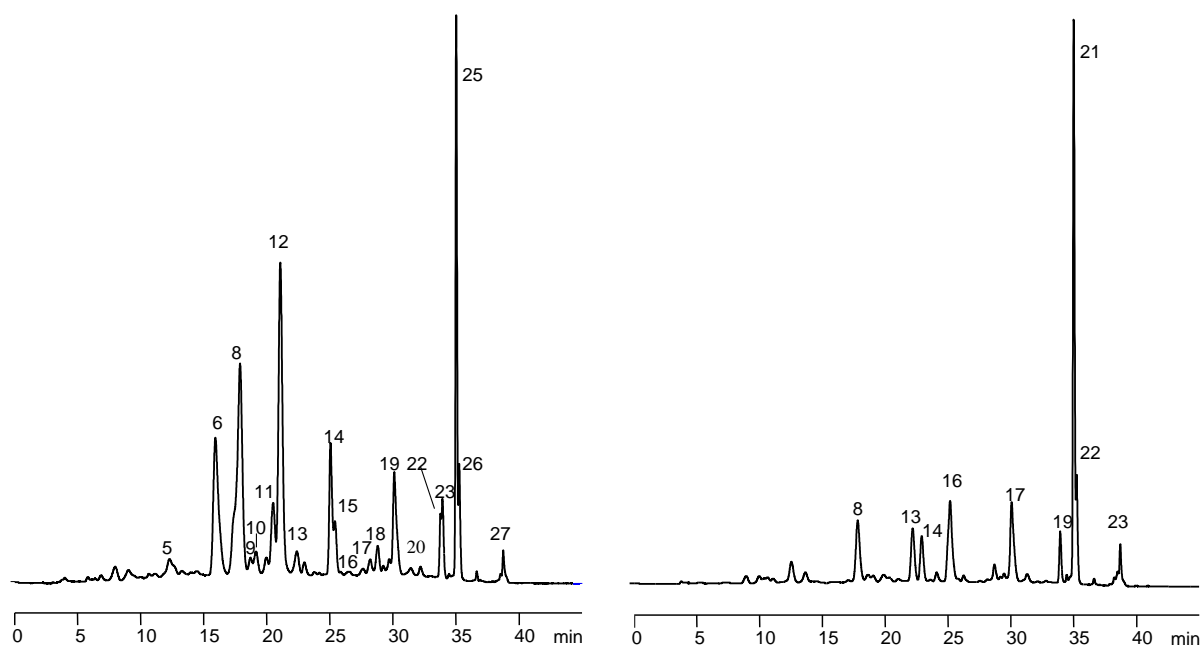
3.12. ábra. A piros és sárga karotinoidok mennyiségének változása a *Zamia dressleri*-ben.

Azt találtuk, hogy a fiatal levelekben a piros karotinoidok dominálnak, melyek főként észteresített formában vannak jelen, azonban a levelek érésével ezek mennyisége csökken, miközben a sárga (fotoszintetikus) karotinoidok mennyisége növekszik. Ezt a furcsa viselkedést

egyrészt a piros és sárga karotinoidok kompartmentalizációja magyarázhatja: a sárga, fotoszintézisben résztvevő karotinoidok a tilakoid-membránban található szabad formában, míg a pirosak azon kívül észterestve. Szintén változhat a kapszantin-kapszorubin szintáz enzim aktivitása, amely a piros karotinoidok, a kapszorubin és a kapszantin szintéziséért felelős a tilakoid-membránon kívül.⁸³

3.1.3. Karotinoidok izolálása más növényi forrásokból és azok vizsgálata

Különböző citrusfélék héjának és húsának karotinoid-összetételét HPLC-vel hasonlítottuk össze C18-as és C30-as oszlopokon. Az extraktumok általában jelentős mennyiségben tartalmaztak β -kriptoxantint és luteint (a lime kivételével mindegyik gyümölcs), valamint β -citaurint is. A lime és a mandarin esetében a héj és a hús karotinoid-összetétele jó egyezést mutat, míg a narancs, a klementin, a grapefruit, a citrom és a kumquat esetében sokkal jelentősebb a különbség. A kumquat elszappanosított extraktumait részletesebben vizsgáltuk, mert azt még nem írták le korábban, itt kalcium-karbonátos oszlopon is megtisztítottunk néhány főbb komponenst.⁸⁴

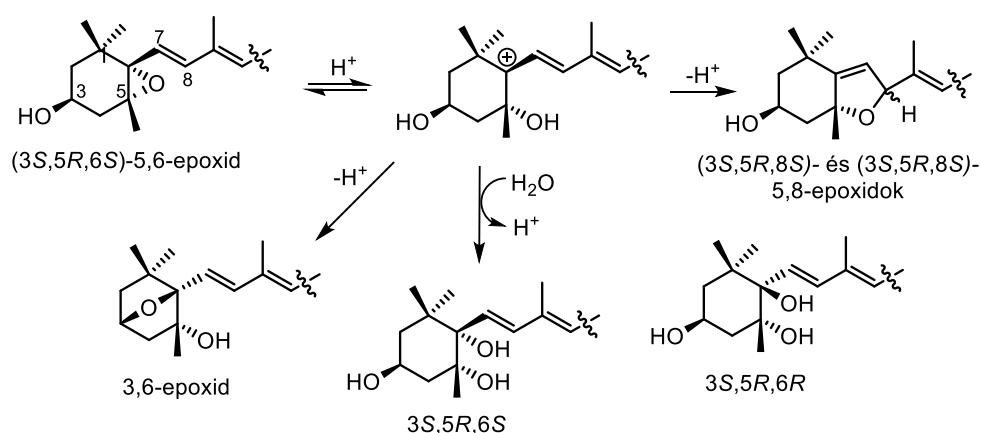


3.13. ábra. A kumquat héj (8: β -citaurin, 12: (9Z)-violaxantin, 14: lutein, 25: β -kriptoxantin), és hús karotinoid-összetétele (8: β -citaurin, 16: lutein, 21: β -kriptoxantin).

Az apokarotinoid β -citaurin (és izomerjei) a citrusfélék jellegzetes karotinoidjának bizonyult, és tiszta formában volt izolálható a többi pigment közül. A narancshoz hasonló

kumquat ugyanazokat a komponenseket tartalmazza, de míg a narancsban a (9Z)-violaxantin dominál, a kumquat fő összetevője a β -kriptoxantin (3.13. ábra). Mivel ilyen összehasonlító vizsgálat annak idején nem állt rendelkezésre és utána elég intenzíven kutatták a különböző citrusféléket és narancsleveket, ez a munka referenciaművé vált és meg lepően sok hivatkozást kapott.

A citrusfélékben, virágokban, sárga paprikákban is megtalálható 5,6-epoxi-karotinoidok kinyerése azzal a problémával szembesített bennünket, hogy a szilikagélek enyhén savas pH-ja miatt a kromatográfálás során ezek az ismert módon átalakulhatnak elsősorban 5,8-epoxiddá (3.14. ábra). Mindezen bomlástermékek egyébként kis százalékban a természetes forrásokban is megtalálhatóak.

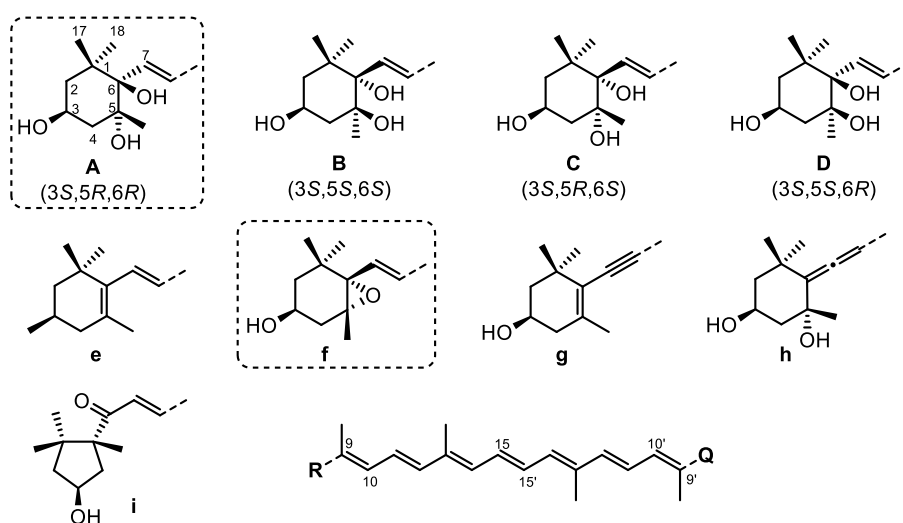


3.14. ábra. Az 5,6-epoxidok savkatalizált átalakulása.^{85,86}

Egy egyszerű módszert fejlesztettünk ki a kereskedelemben kapható szilikagélek módosítására oszlopkromatográfiához és vékonyréteg-kromatográfiához.⁸⁷ A módosított „Szilika-9” (a vizes szuszpenzió pH-ja kb. 9) gél lehetővé teszi a savra labilis vegyületek nagy léptékű szétválasztását, kapacitása hasonló a kiindulási anyagként használt szilikagélehez. Az elmúlt 15 évben sokféle elegy elválasztására használtuk sikeresen ezt a szilikagélt.

Valószínűleg a fenti módon (3.14. ábra), a növényi savak hatására keletkeznek 5,6-epoxidokból a sárga paprikában található minor trihidroxi-karotinoidok is. Ezek közül a violaxantinból keletkező lotoxantint sikerült 1-2 mg-os tételben izolálnunk és azonosítanunk.⁸⁸ Vizsgálataink igazolták, hogy a lotoxantin abszolút konfigurációja a karpoxantinhoz hasonlóan a természetes forrástól függően eltérő. A piros paprikában a karpoxantin és a lotoxantin konfigurációja (3S,5S,6S), míg a sárga paprikánál (3S,5R,6R)-t találtunk (3.15. ábra). Feltételezzük, hogy a természetben a 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoporttal rendelkező karotinoidok a (3S,5R,6S)-3-hidroxi-5,6-epoxi- β -végcsoportból képződnek. A piros paprikában a karotinoid-

5,6-epoxidok **enzimkatalizált** hidrolízise során a C(5) konfigurációja megváltozhat, de a C(6) konfigurációja változatlan marad, így mind a (3*S*,5*S*,6*S*)-, mind a (3*S*,5*R*,6*S*)-végcsoport képződhet a C(5) karbokationon keresztül. A κ -végcsoportú karotinoidokat nem tartalmazó növényekben (*Rosa foetida*, *Rosa pomifera*) viszont a karotinoid-5,6-epoxidok gyűrűfelnyílása **savkatalizált** lehet. Ekkor a karotinoid-5,6-epoxidokban a C(6) konfigurációja változhat meg, míg a C(5) konfigurációja változatlan marad, ez történik a latoxanthin képződésekor is. A különböző bioszintetikus utak magyarázatot adhatnak a különböző forrásokból izolált 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoportot tartalmazó karotinoidok konfigurációi közötti különbségekre.



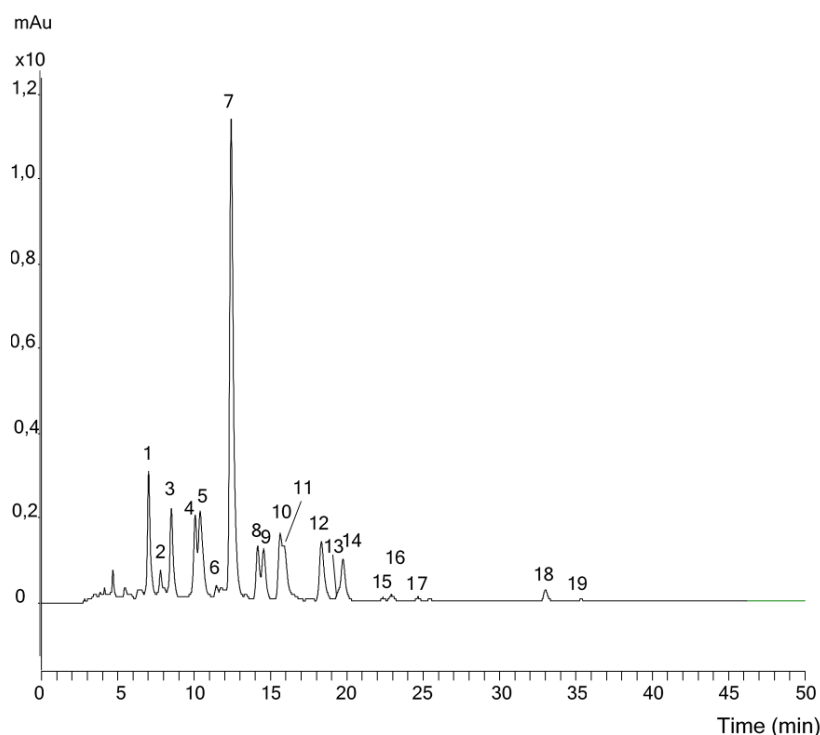
3.15. ábra. Heteroxantin R=A, Q=g; Karboxantin R=A, Q=e; 6-Epi-karboxantin R=c, Q=e; Latoxanthin R=A, Q=f; Neoflor R=A, Q=h; 6-Epineoflor R=C, Q=h; 5,6-Diepi-karboxantin R=D, Q=e; 5,6-Diepi-latoxantin R=D, Q=f; 5,6-Diepi-kapszokarboxantin R=D, Q=i; Violaxantin R=Q=f; Anteraxantin R=f, Q=e.

Több gyógynövény vizsgálatát is elvégeztük, ezek közül a *Telekia speciosa* virágának karotinoid-összetétele volt különösen érdekes. A fő karotinoid lutein és geometriai izomerjei mellett 5,6-epoxi-karotinoidokat, nevezetesen a violaxantint, a lutein 5,6-epoxidot és az antheraxantint mutattuk ki nagyobb mennyiségben. Ezen kívül β -karotin-5,6-epoxidot és β -karotin-5,6,5',6'-diepoxidot találtunk, ami nagyon ritkán fordul elő virágszirmokban. Az egyértelmű azonosítás érdekében a β -karotin-5,6-epoxidot és a β -karotin-5,6,5',6'-diepoxidokat félszintetikusán is előállítottuk, majd NMR és HPLC-CD módszerekkel jellemeztük a sztereoizomereket vagy azok elegyét.⁸⁹

3.2. táblázat. A *Telekia speciosa* karotinoid-összetétele.

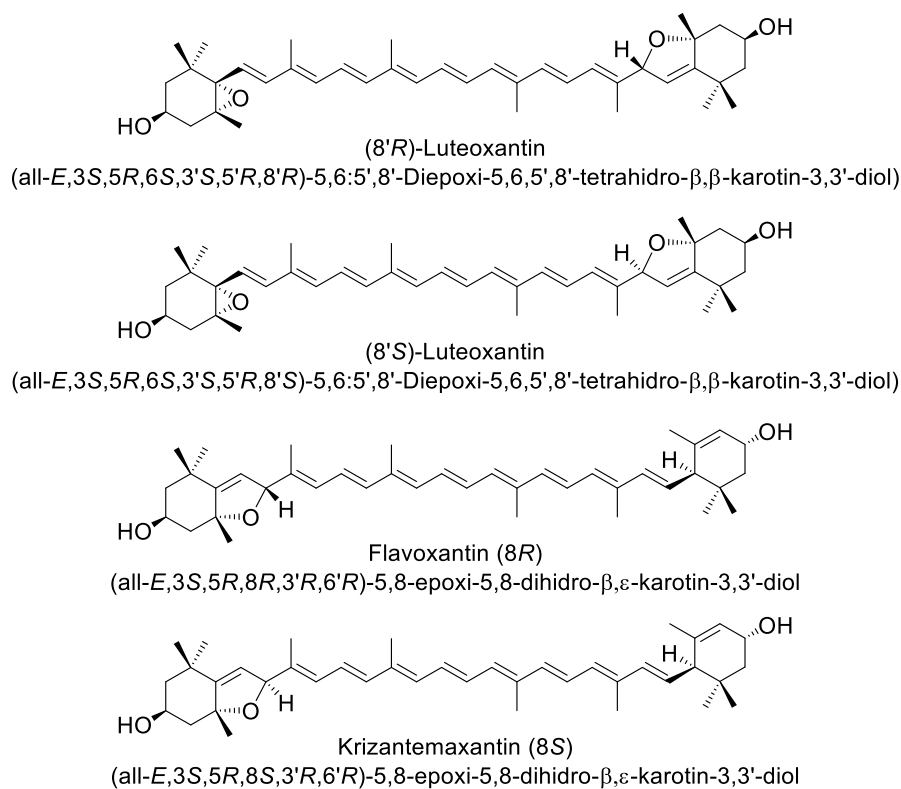
No.	karotinoid	UV-VIS	MS	Szováta	Bálványos	Szováta	Szováta
		λ_{\max} [nm]	m/z	virág	virág	szirom	bibe
				% összkarotinoid (HPLC szerint)			
1	Violaxantin	416, 439, 468	601 [M+ H] ⁺	6.07	5.93	6.21	0.83
2	(9Z)-Neoxantin	413, 436, 464	601 [M+ H] ⁺	0.74	0.65	1.24	2.33
3	Lutein-5,6-epoxid	416, 439, 468	567 [M-H ₂ O+ H] ⁺	4.90	6.92	6.10	
4	Anteraxantin	444, 471	585 [M+ H] ⁺	5.56	7.01	8.43	
5	(9Z)-Violaxantin + (13Z)-Lutein	415, 436, 463	601 [M+ H] ⁺ ; 551 [M-H ₂ O+ H] ⁺	7.77	6.73	8.08	
6	(13'Z)-Lutein	331, 436, 464	551 [M-H ₂ O+ H] ⁺	1.25	1.77	2.83	
7	Lutein	444, 472	551 [M-H ₂ O+ H] ⁺	38.62	42.71	40.25	43.80
8	β -Karotin-diepoxid	419, 441, 468	569 [M+ H] ⁺	3.78	3.61	10.20	0
9	Zeaxantin	450, 476	569 [M+ H] ⁺	4.76	4.20	1.67	5.16
10	(9Z)-Lutein	330, 441, 466	551 [M-H ₂ O+ H] ⁺	6.37	3.91	6.55	9.77
11	Aurokróm	384, 401, 425	569 [M+ H] ⁺	5.43	4.92	2.27	1.43
12	(9'Z)-Lutein	332, 440, 466	551 [M-H ₂ O+ H] ⁺	6.83	5.25	0.92	11.63
13	(9Z)-Zeaxantin	340, 444, 469	569 [M+ H] ⁺	0.79	0.59	1.14	1.41
14	α -Kriptoxantin	445, 472	553 [M+ H] ⁺	4.32	2.54	2.35	5.68
15	(9Z)- α -Kriptoxantin	331, 440, 467	553 [M+ H] ⁺	0.31	0.18	0.11	0.58
16	β -Karotin-5,6-epoxid	444, 471	553 [M+ H] ⁺	0.77	0.74	0.48	0.60
17	β -Karotin-5,8-epoxid	426, 451	553 [M+ H] ⁺	0.43	0.58	0.25	0.86
18	β -Karotin	450, 475	537 [M+ H] ⁺	1.19	1.49	0.76	1.03
19	(9Z)- β -Karotin	446, 469	537 [M+ H] ⁺	0.14	0.26	0.15	0.32
Összkarotinoid tart. (mg/g)				0.211	0.370	0.421	0.018

Az 5,6-epoxi- és az 5,6,5',6'-diepoxi- β -karotin, ellentétben a violaxantinnal és a lutein 5,6-epoxiddal meglehetősen ritka a természetben. Ezen vegyületek jelenléte azt jelzi, hogy a *Telekia speciosa* virágban nemcsak a β -karotin-hidroxiláz, hanem a β -karotin-epoxidáz enzim is működik. A növényekben általában a β -karotin-hidroxiláz zeaxantint termel, amelyet a zeaxantin-epoxidáz enzim alakít tovább anteraxantinná és violaxantinná. A β -karotin hidroxilezése általában gyorsabban megy végbe, mint az epoxidáció, így β -karotin-epoxidok többnyire nem mutathatók ki.



3.16. ábra. A *Telekia speciosa* szirmok teljes HPLC-DAD kromatogramja. A csúcsok hozzárendelését a 3.2. táblázat tartalmazza.

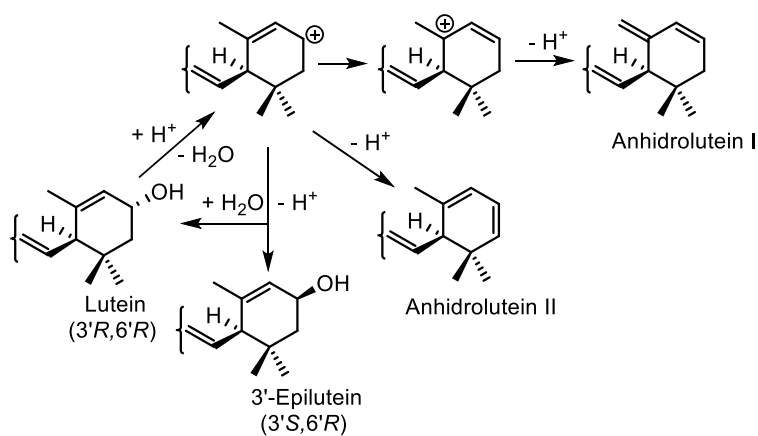
Vizsgáltuk a napon és árnyékban termesztett *Calendula officinalis* szirmainak, virágainak és teljes virágzatának karotinoid összetételét HPLC-DAD-MS módszerrel.⁹⁰ Az árnyékban termesztett virágok összes karotinoidtartalma magasabb volt, mint a napon termesztetteké (1,154 mg/g, szirmokban 0,872 mg/g), míg az egyes karotinoidok arányában nem találtunk különbséget. Minden mintában 29 komponenst azonosítottunk, amelyek közül a fő karotinoidok a lutein mellett az 5,8-epoxi-karotinoidok voltak *8S* és *8R* konfigurációval. A fő 5,8-epoxi-karotinoid a *8S* konfigurációjú krizantemaxantin volt (3.17. ábra), és nem a *8R* konfigurációjú flavoxantin, amint azt korábbi vizsgálatok alapján feltételeztük. Ezen kívül (össz-*E,8'R*)- és (*9Z,8'R*)-luteoxantint mutattunk ki nagyobb mennyiségben. Az 5,8-epoxi-karotinoidokat (flavoxantin, krizantemaxantin, luteoxantin epimerek) a megfelelő karotinoid 5,6-epoxidok (lutein-5,6-epoxid, violaxantin) savkatalizált reakciójával is előállítottuk és az epimerek szerkezetét NMR mérésekkel tisztáztuk. Mivel sav hatására mindkét epimernek (*8R* ill. *8S*) keletkeznie kellene, ezért feltételezhetjük, hogy enzimátikus útra van szükség ahhoz, hogy csak az egyik keletkezzen a lutein-5,6-epoxidból, illetve violaxantinból. Ezzel azt is kizárhatjuk, hogy az 5,8-epoxidok a feldolgozáskor keletkező műtermékek lennének.



3.17. ábra. A *Calendula officinalis* fontosabb 5,8-epoxidjai.

3.1.4. Lutein és luteinszármazékok izolálása és vizsgálata

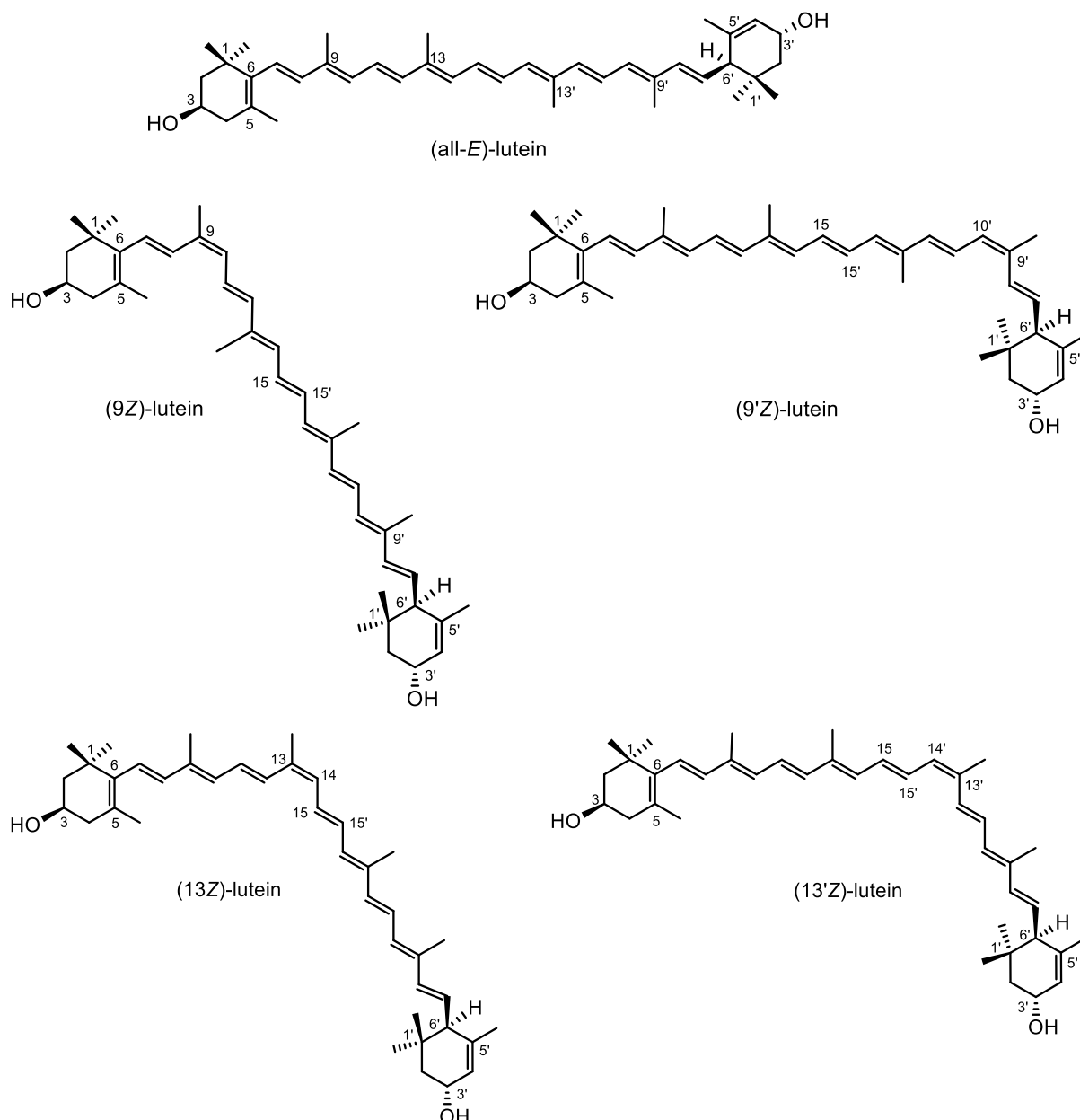
A lutein ((all-*E*,3*R*,3'*R*,6'*R*)-β,β-karotin-3,3'-diol) a magasabbrendű növények kloroplasztjában található egyik leggyakoribb karotinoid, így az emberi táplálkozás fontos része is. A humán plazma kivonataiban a lutein 3'-epimerjét, számos geometriai izomerjét, dehidratációs és oxidációs termékét azonosították (3.18. ábra).



3.18. ábra. A lutein lehetséges átalakulásai savas környezetben.

Azt is megállapították, hogy a lutein csökkenti az AMD (életkorral összefüggő makula degeneráció) kockázatát, valamint szükséges a megfelelő agyműködéshez, hiánya növeli a neurodegeneratív betegségek kialakulásának kockázatát (ld. 2.1. fejezet).

A lutein és *cis*-izomerjei számos növényi részben előfordulnak, beleértve a különféle virágokat is. A lutein izomereit jóddal katalizált izomerizációval állítottuk elő, majd négy *cis*-izomert (9*Z*-, 9'*Z*-, 13*Z*- és 13'*Z*) izoláltunk oszlopkromatográfiával és félpreparatív HPLC-vel (3.19. ábra). A 9'*Z*- és 13'*Z*-izomerek szerkezetét NMR mérésekkel igazoltuk.



3.19. ábra. A lutein fő geometriai izomerjei.

Az előállított izomereket standardként használtuk 20 növényfaj virágainak karotinoid összetételének HPLC-MS meghatározásához, amelyekben a lutein és geometriai izomerjei a fő

komponensek. A virágok *cisz*- és *transz*-lutein tartalmukban, valamint egyéb karotinoidok, például violaxantin, neoxantin, β -kriptoxantin és β -karotin jelenlétében vagy hiányában nagy eltéréseket mutattak. Néhány vizsgált virágról kiderült, hogy zeaxantin nélküli luteinforrás (a természetes lutein szinte mindig tartalmaz 4-6% zeaxantint).⁸⁰

A vizsgált 20 virágban a lutein és mono-*cisz* izomerjei a fő karotinoidok, a (9*Z*)-, (9'*Z*)- és (13*Z*)-, (13'*Z*)-izomerjei közel azonos arányban találhatóak kettő kivételével az összes virágban. Azt is megállapítottuk, hogy a különböző családokhoz tartozó virágok karotinoid-összetétele lehet hasonló és ugyanazon család tagjainak karotinoid összetétele is különbözhet. A nagy mennyiségű *Z*-izomer jelentőségét az adja, hogy biológiai hozzáférhetőségük magasabb, mint a *E*-izomereké és egyes vizsgálatok alapján antioxidáns aktivitásuk is magasabb.⁹¹

Mára már sok mindent tudunk a luteinről, *in vitro* és *in vivo* átalakulásának mechanizmusairól, de még mindig vannak tisztázatlan tények, főleg az aggyal/idegsejtekkel kapcsolatos hatásmechanizmusok megértésében.⁹² Egyetemünk Gyógyszerészi Biokémia Intézetével kooperálva vizsgáltuk a luteint és származékait olyan biokémiai folyamatokban, melyekre az hatással lehet, illetve ahol valószínűsíthető a védőhatása.

Először a lutein antioxidánsokra gyakorolt hatására összpontosítottunk, vizsgáltunk antioxidáns enzimeket, termelődő citokineket és vasanyagcsere-stressz termékeket BV-2 mikrogliaiban. Eredményeink azt mutatják, hogy a lutein alkalmazása elnyomta a H₂O₂ által kiváltott reaktív oxigénszármazékok (ROS) felszabadulását, befolyásolta a vasfelhasználást és megváltoztatta a gyulladásgátló és pro-inflammatorikus citokin szekréciót a BV-2 sejtekben. A lutein növelte az IL-10 szekréciót a kontrollhoz képest, miközben csökkentette a TNF-et (tumor nekrosis faktor). Ezek alapján a lutein segíthet megelőzni vagy elnyomni a ROS által közvetített mikroglia aktivációt, ami fontos lépés az oxidatív stressz által kiváltott neuronális degenerációval kapcsolatban.⁹³

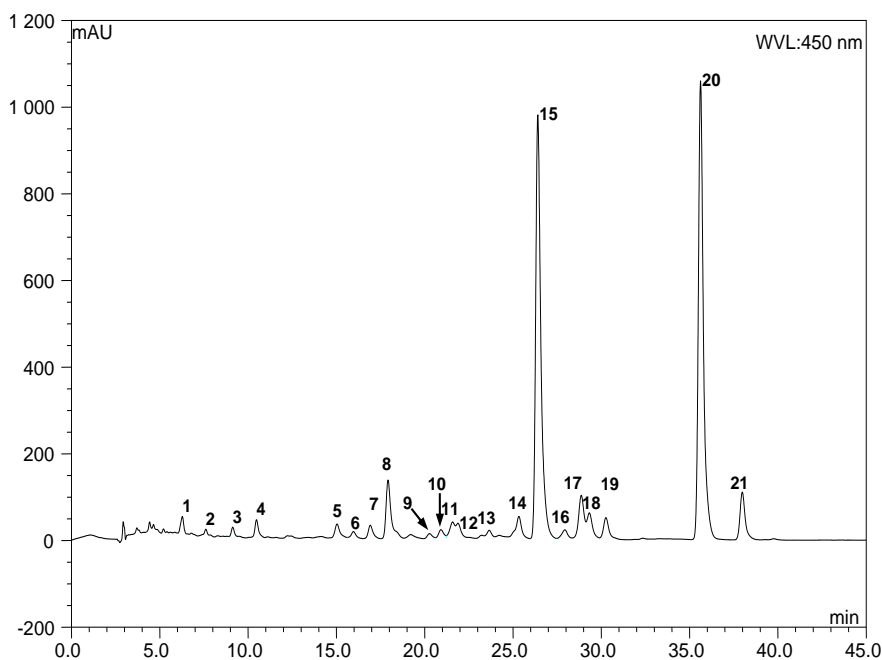
A glutamát a központi idegrendszer egyik fő serkentő neurotranszmitterje, amely kulcsszerepet játszik az agyműködés szabályozásában. Az intracelluláris glutamát túlzott felhalmozódása felgyorsítja a ROS koncentrációjának növekedését az idegsejtekben, ami glutamát neurotoxicitáshoz vezet. Megvizsgáltuk, hogy a lutein képes-e gátolni a toxicitást és javítani ezzel a neurológiai funkciót SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekben. Eredményeink szerint a lutein gyengíti a glutamát által kiváltott hatásokat a ROS-al, a gyulladással, a vasanyagcserével és a lipid-peroxidációval kapcsolatban. Ezek miatt a lutein nem csak a megelőzésben alkalmazható, adása támogató kezelés is lehet neurodegeneratív betegségekben.⁹⁴

Mint azt az 3.18. ábrán láthattuk, az étrendi lutein az emberi szervezetben 3'-epiluteinné, az pedig 3'-oxo-luteinné metabolizálódhat. A 3'-epilutein és a 3'-oxolutein hatását vizsgáltunk SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejteken, hasonló módon, mint a lutein esetében. Azt találtuk, hogy ezek a származékok a luteintól kissé eltérően modulálták a glutamát ROS-ra, gyulladásra, ferroptózissal kapcsolatos vasanyagcserére és lipid-peroxidációra kifejtett hatását az SH-SY5Y sejtekben. Vizsgálataink alapján a 3'-epi-lutein és a 3'-oxo-lutein nagyobb hatékonyságú potenciális védőanyagok a glutamát által kiváltott oxidatív stressz ellen SH-SY5Y sejtekben.⁹⁵

3.1.5. Karotinoidok algákban

Az algák nagy mennyiségben találhatóak a természetben, sok hasznos tulajdonságuk mellett bioaktív természetes anyagok ígéretes forrásai és potenciális élelmiszer-adalékanyagok. A Debreceni Egyetem Növénytani Intézetével együttműködésben három, Magyarországon is honos, eltérő taxonómiai helyzetű algafajt vizsgáltunk meg karotinoidösszetétel szempontjából: ezek a *Dunaliella salina*, az *Euglena sanguinea* és egy *Nostoc* törzs. A karotinoidok azonosításához oszlopkromatográfiás tisztítás és elszappanosítás után HPLC-UV/MS-t használtunk, a főbb karotinoidokat akár tiszta formában is ki lehetett nyerni.⁹⁶

Mindhárom faj nagy mennyiségű karotinoidot tartalmazott. A karotinoid mintázat összetétele némileg eltért az irodalmi adatoktól. A *Dunaliella* karotinoid-frakció fő vegyületeként luteint (az összes karotinoid 52,1%-a), β -karotint (13,1%), violaxantint (11,5%) és neoxantint (6,2%) tartalmazott. A *Nostoc* törzsben (3.20. ábra, 3.3. táblázat) a fő karotinoidok az echinenon (34,9%) és β -karotin (36,5%), míg az *Euglena* izolátum fő összetevői a diatoxantin (39,0%), a lutein (23,7%), egy azonosítatlan karotinoid (9,6%) és a β -karotin (5,4%) voltak. A diatoxantin előfordulását NMR-spektroszkópiával is megerősítettük. Később több, mint száz *Nostoc* mintát vizsgáltunk meg és néhányukban minor karotinoid-glikozidokat találtunk 5 perc alatti HPLC-retenciós idővel, melyeket tandem MS mérésekkel azonosítottuk. Ezen eredményeket a közeljövőben fogjuk publikálni.



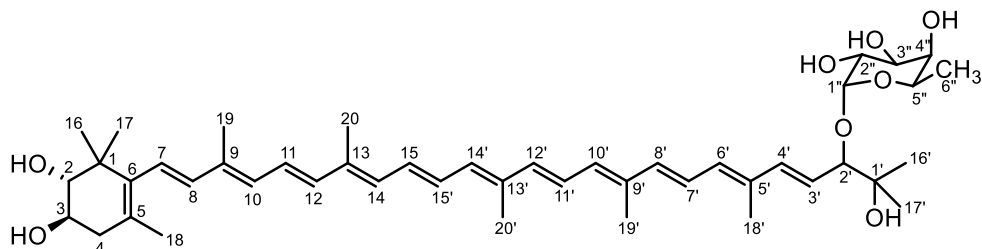
3.20. ábra. A *Nostoc sp.* elszappanosított extraktumának HPLC kromatogramja

3.3. táblázat. A *Nostoc sp.* karotinoidösszetétele (csak az azonosított csúcsok feltüntetésével)

No.	Ret. idő (min)	Név	% (HPLC)	UV-VIS λ (nm)	m/z [M+H ⁺]
8	17.93	kantaxantin	4.73	474	565
10	20.92	(9Z)-kantaxantin	0.68	469	565
11	21.58	(13Z/13'Z)-echinenon	1.26	355, 455	551
12	21.88	(13'Z/13Z)-echinenon	1.10	355, 455	551
14	25.33	β -karotin-5,6-epoxid	1.92	445, 472	553
15	26.41	<i>echinenon</i>	34.92	464	551
16	27.93	β -karotin-5,8-epoxid	0.71	427, 452	553
17	28.87	(9Z/9'Z)-echinenon	3.95	454	551
18	29.33	(9'Z/9Z)-echinenon	2.33	452	551
19	30.27	(13Z)- β -karotin	1.94	443, 467	537
20	35.63	<i>β-karotin</i>	36.48	450, 476	537
21	37.98	(9Z)- β -karotin	3.94	445, 471	537

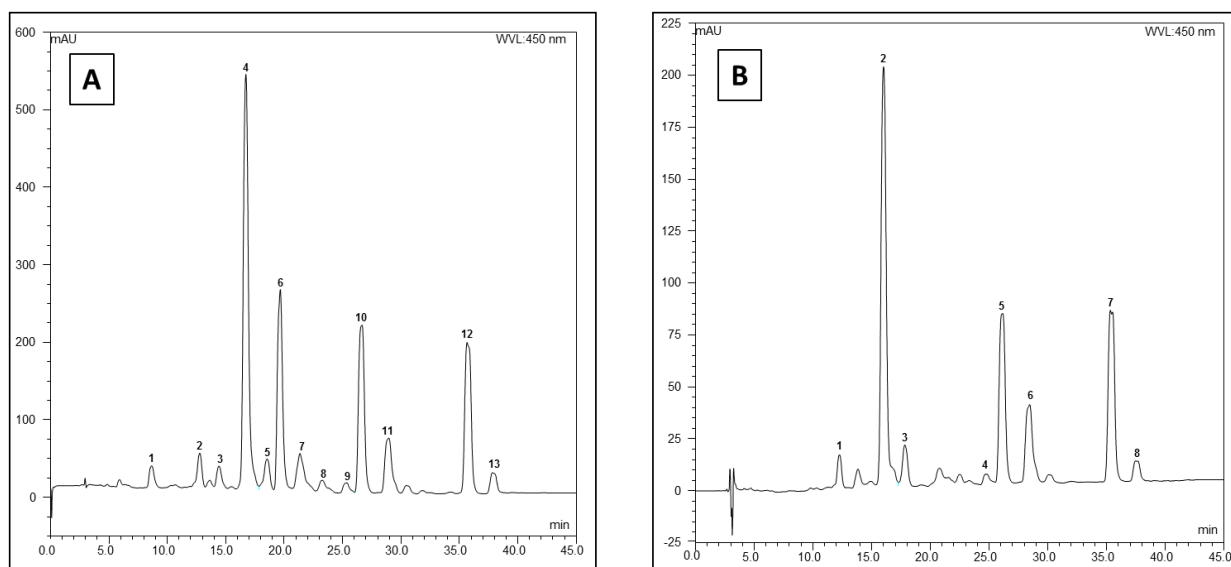
Megvizsgáltuk egy másik cianobaktérium, a *Cylindrospermopsis raciborskii* karotinoidösszetételét is. A β -karotin, az echinenon és a kantaxantin mellett fő komponensként egy ismeretlen karotinoidot találtunk. Ezt a vegyületet kromatográfias elválasztások során izoláltuk 30-40 mg-os mennyiségben és szerkezetmeghatározás céljából acetileztük. Az

acetilzármaszékot UV-Vis, NMR és HRMS spektrumaival teljes mértékben jellemeztük, és részletes ^1H és ^{13}C kémiai eltolódás hozzárendelést adtunk. A fő komponens ezek alapján egy már ismert karotinoid glikozid, a 2-hidroxi-(3*R*,2'*S*)-mixol-2'- α -L-fukozid volt (3.21. ábra).⁹⁷ Ugyanezt a vegyületet korábban a *Thermosynechococcus elongatus*-ban, egy termofil cianobaktériumban találták meg, de csak minor komponensként.⁹⁸



3.21. ábra. A 2-hidroxi-(3*R*,2'*S*)-mixol-2'- α -L-fukozid szerkezete

Az elszappanosítás előtti és utáni kromatogramokon jól látszik, hogy a fenti glikozid (4-es, ill. 2-es csúcs) a legnagyobb mennyiségben jelenlevő komponens, illetve mindegyik fő komponens szabad (nem észterezett) formában található meg (3.22. ábra).



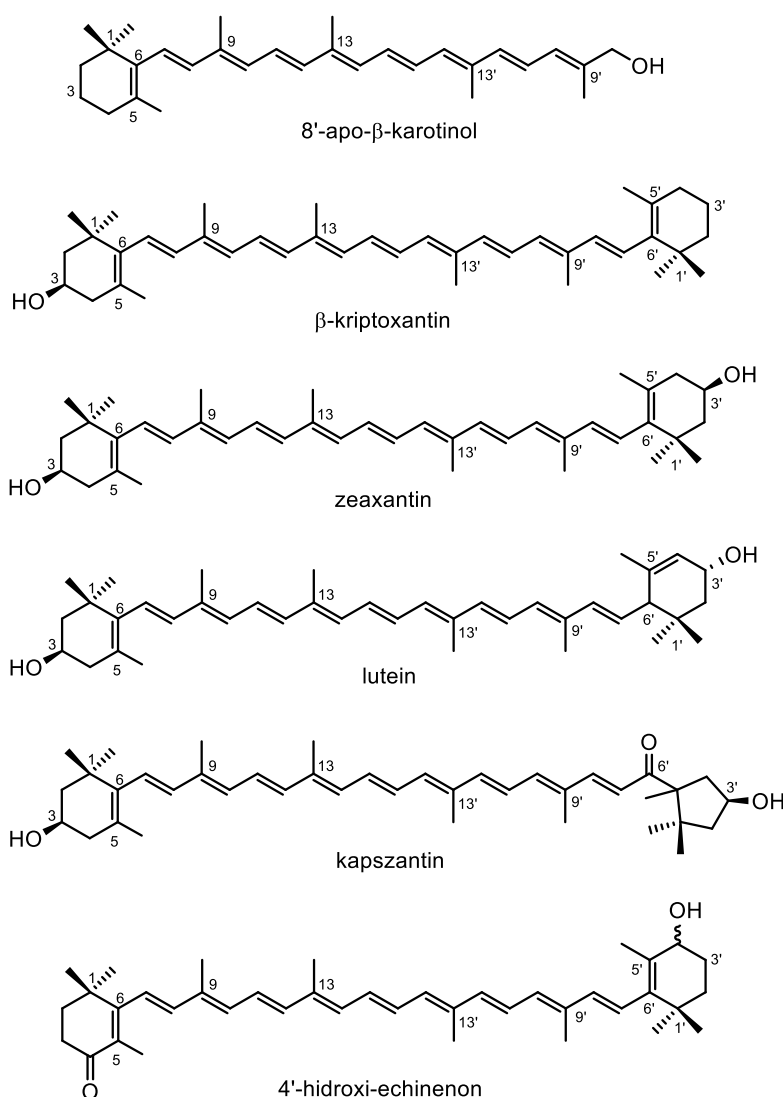
3.22. ábra. A nyers (A) és az elszappanosított extraktum (B) HPLC kromatogramja.

(A): 4: fő karotinoid, 6-7: klorofillek, 9: β -kriptoxantin, 10: echinenon, 11: (9/9'*Z*)-echinenon, 12: β -karotin, 13: (9*Z*)- β -karotin. (B): 2: fő karotinoid (40.4%), 4: β -kriptoxantin (1.1%), 5: echinenon (18.9%), 6: (9/9'*Z*)-echinenon (10.3%) 7: β -karotin (20.3%), 8: (9*Z*)- β -karotin (2.2%).

3.2. Karotinoidok szintetikus módosításai

A karotinoidok átalakítását, származékképzését erőteljes korlátok közé szorítja a karotinoidok reaktivitása (vagy annak hiánya), illetve bomlékonysága, érzékenysége savakra, fényre, oxigénre. A fő kihívás az olyan enyhe reakciókörülmények megtalálása, amelyek mellett a kívánt átalakulások végbemennek, de mellékreakció/bomlás csak kis mértékben történik. A karotinoidok reakcióiban a jó kitermelés 50-60 % felett jelent, mint azonban az látható lesz a továbbiakban, a kitermelések sok esetben 20-50% közöttiek.

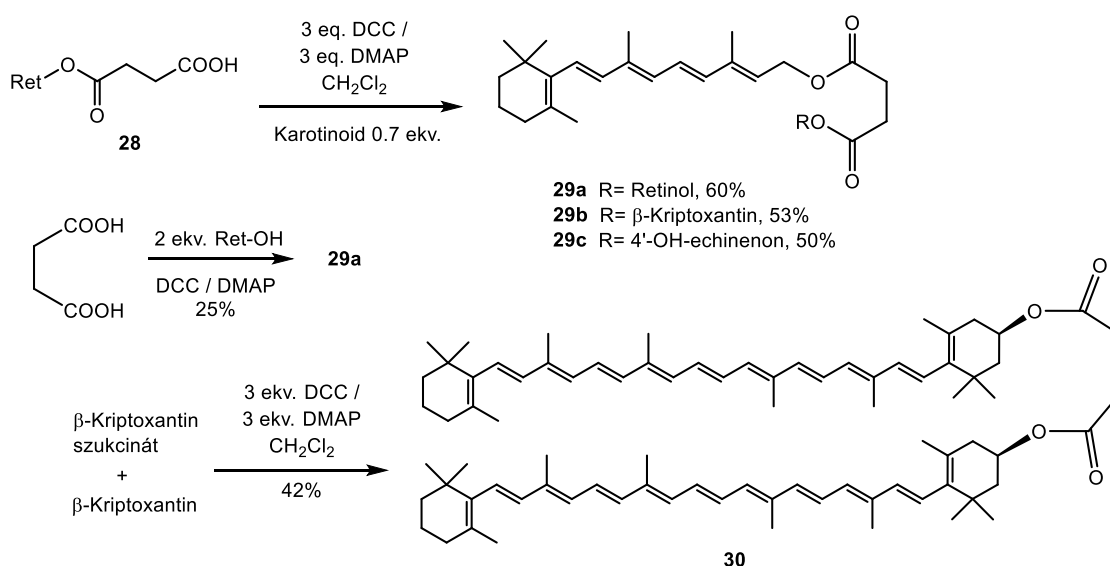
Ezekhez a reakciókhoz többnyire az alábbi hidroxikarotinoidokat használtuk, mert ezek nagyobb, 1-2 grammos mennyiségben is hozzáférhetőek számunkra (3.23. ábra).



3.23. ábra A leggyakrabban használt hidroxikarotinoidok

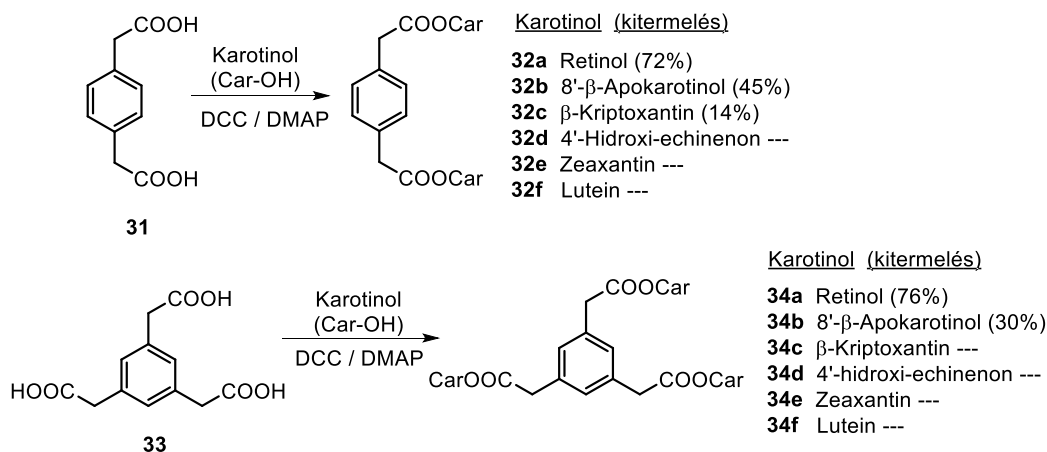
3.2.1. Dimerek és dendrimerek

Egyik első projektünk olyan karotinoid dimerek és trimerek előállítása volt, melyekben potenciálisan megnőhet az antioxidáns hatás, illetve érdekes tulajdonságokkal rendelkező nanorészecskék keletkezhetnek. Első célunk kétértékű savak dikarotinoid-diésztereinek előállítása volt, amelyekben a két poliénilánc között másodlagos kölcsönhatások lehetségesek. Ennek érdekében a retinolt és más karotinoidokat borostyánkősav-anhidriddel észterestítettünk. Más anhidridekkel vagy acil-dikloridokkal végzett kísérletek nem voltak eredményesek. A keletkező szukcinátok stabil, jól kristályosítható anyagok és jó kitermeléssel keletkeznek, ezért később többféle termék előállítására is használtuk őket. Eleinte az olcsó retinolt használtuk modellvegyületként, de mivel rendkívül gyorsan oxidálódik, később más apokarotinolra tértünk át. Többféle homo- és heterodimert sikerült előállítanunk monohidroxi-karotinoidok felhasználásával (3.24. ábra).⁹⁹

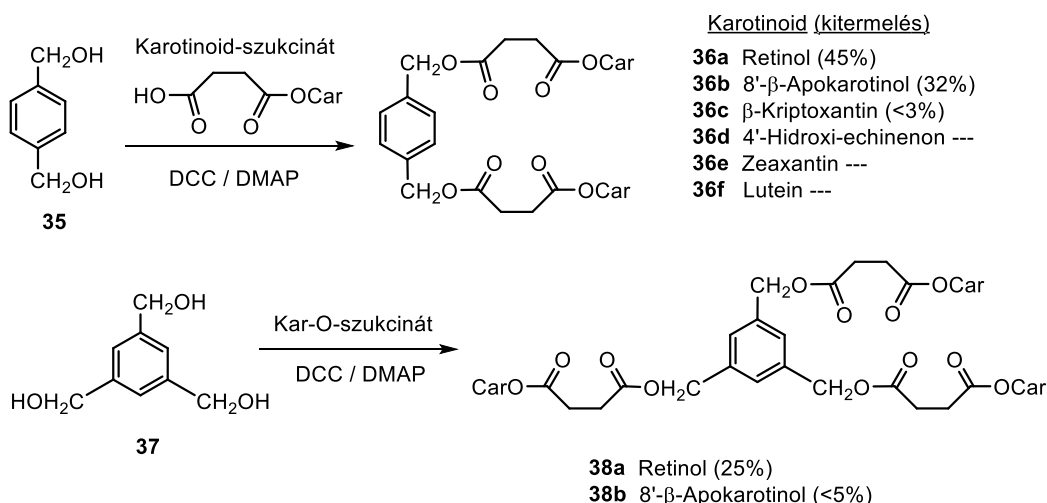


3.24. ábra. Karotinoid dimerek előállítása

Úgy is állítottunk elő dimereket és trimereket, hogy különböző karotinoidokat vagy azok szukcinátjait bi- és trifunkciós aromás savakkal, illetve alkoholokkal reagáltattuk. A savklorid mint acilezőszer ebben az esetben sem működött, a legjobb eredményt a Steglich-észterezés hozta. Az apokarotinoidok (retinol és 8'-apo-β-karotinol) a legtöbb reakcióban nagyobb reaktivitást mutattak, és modellvegyületként szolgáltak a C₄₀ karotinoidok és származékaik számára. A szintetizált triészterek első generációs dendrimereknek tekinthetők (3.25. ábra).¹⁰⁰



3.25a. ábra. A benzol-di- és trikarbonsav karotinoid észtereinek előállítása.



3.25b. ábra. Karotinoid di- és triészterek előállítása szukcinátokkal.

Terveztük az első generációs dendrimerek továbbépítését, azonban a biszszukcinátok (zeaxantin, lutein) sajnos nem reagáltak az aromás sav/alkohol magokkal. További tanulság, hogy egy egyszerűnek mondható észterezés is sokszor gyenge kitermeléssel, vagy egyáltalán nem működik egyes karotinoidokkal.

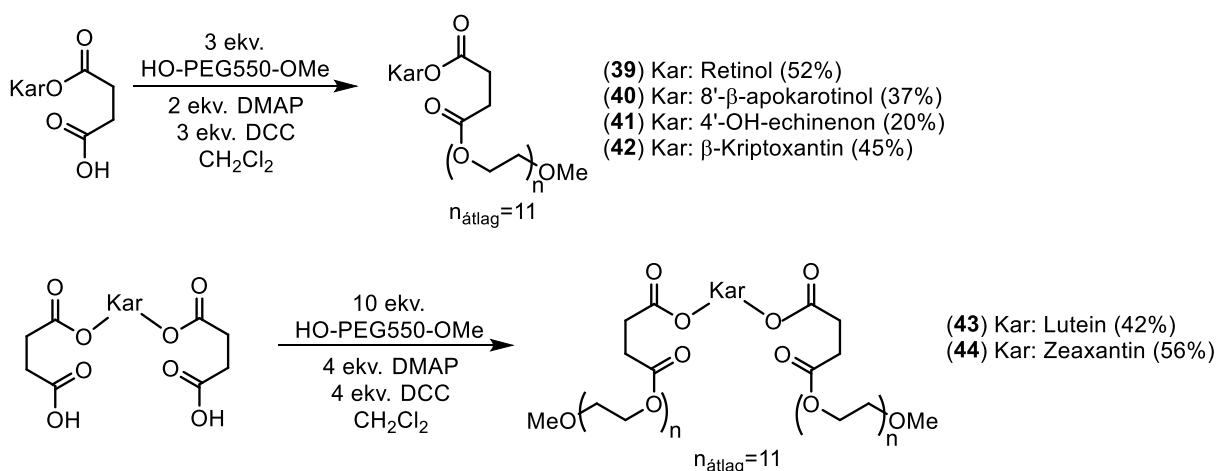
3.2.2. Hidrofil-karotinoidok előállítása

Az irodalmi áttekintésben láthattuk, hogy a vízoldhatóságot úgy is lehet növelni, ha a karotinoidokat nagy mennyiségű polietilén-glikolban (PEG), poliszacharidban diszpergáljuk vagy ciklodextrin-komplexet képezünk velük. Ezen módszerek hátránya, hogy nagy mennyiségű hordozóra van szükség és hígítás hatására a szolubilizáció csökken. Ha a PEG-t kovalensen kapcsoljuk a molekulához, akkor ezek a problémák nem jelentkeznek. A korábban

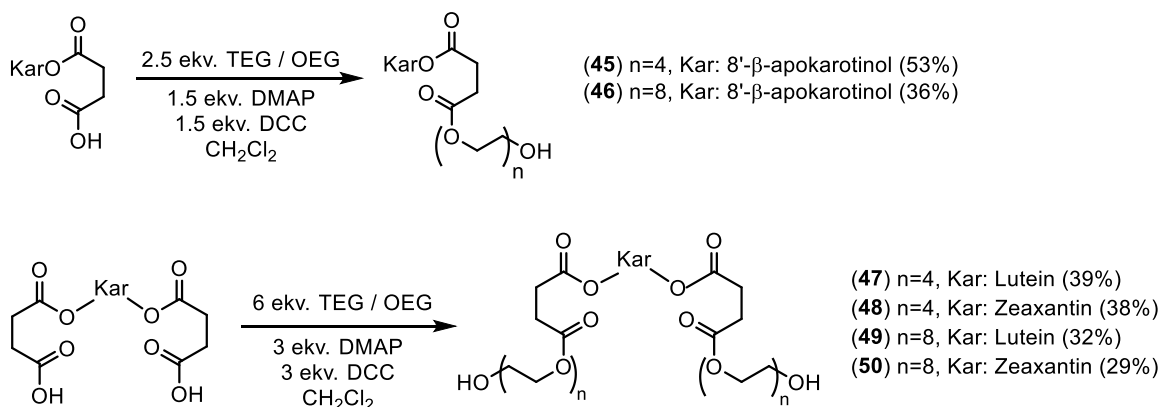
előállított sókhoz képest az lehet az ilyen konjugátumok előnye, hogy sokkal kevésbé változtatják meg az ozmotikus homeosztázist és vízdoldhatóságuk független a pH-tól. Ha a PEG-rész egy viszonylag labilis kötésen keresztül kapcsolódik a karotinoidhoz, amely fiziológiai körülmények között hasítható, akkor a PEG kizárólag inert, poláris hordozóként szolgálhat a karotinoidok számára.

Ezekből a feltevésekből kiindulva karotinoid-PEG észtereket és diésztereket szintetizáltunk karotinolokból különböző lánchosszúságú polietilén-glikolokkal, hogy javítsuk a karotinoidok vízdoldhatóságát és biohasznosulását. A termékek vízdoldhatóságát a várakozásoknak megfelelően arányosnak találtuk a konjugátumok PEG-tartalmával.¹⁰¹

A PEG-konjugátumokat Steglich-módszerrel állítottuk elő elfogadható kitermeléssel (3.26. és 3.27. ábra). A kísérletekhez a kereskedelemben kapható tetraetilén-glikolt (TEG), oktaetilén-glikolt (OEG) és az átlagosan 11-es polimerizáltsági fokkal rendelkező PEG550 monometil-éterét (mPEG550) használtuk.

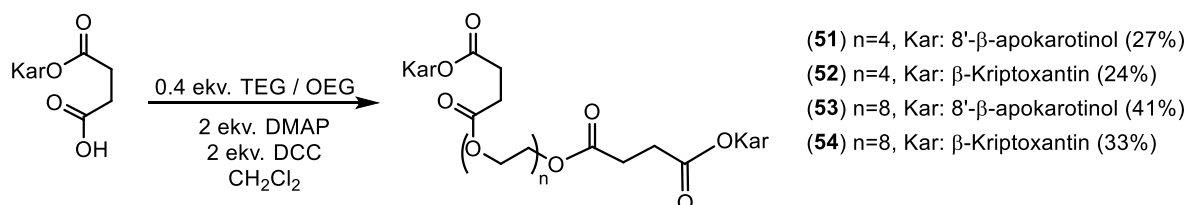


3.26. ábra. Mono- és diészterek előállítása mPEG550-nel



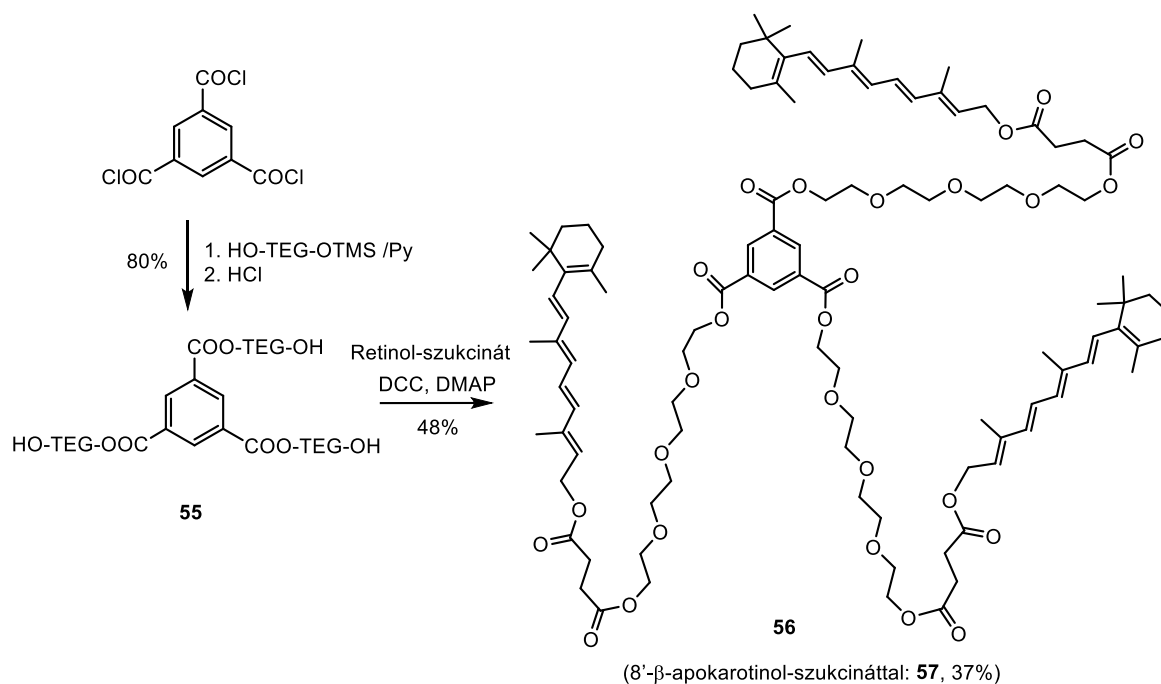
3.27. ábra. TEG- és OEG-észterek

Ha a monoszukcinátot feleslegben alkalmazzuk, akkor dimereket kaphatunk TEG/OEG összekötő elemmel (3.28. ábra).



3.28. ábra. TEG- és OEG-dimerek monohidroxi-karotinoidokkal

A korábbiakhoz hasonlóan trimezinsav-kloridból néhány lépésben „szélkerék”-szerű trimereket állítottunk elő egy TEG összekötő alkalmazásával retinol- és 8'-apokarotinolszukcinátokkal (3.29. ábra). Ezeknek a vegyületeknek valószínűleg érdekes 3D szerkezete lehet és az antioxidáns aktivitása is megnőhet, de ezt egyelőre nem vizsgáltuk.



3.29. ábra. Szélkerék-trimerek.

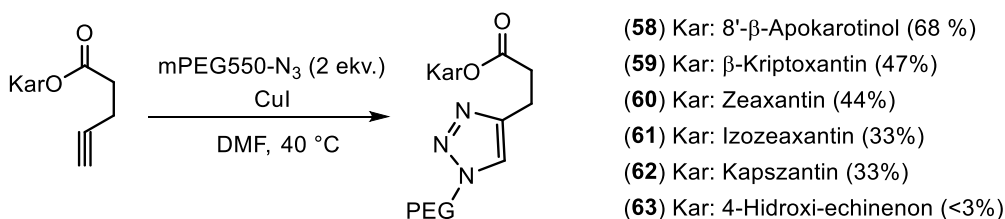
Mivel az előállított származékok vízben közvetlenül nem oldódnak, a vízben való diszpergálhatóság összehasonlításához a termékeket minimális mennyiségű 96%-os etanolban vettük fel és hígítottuk vízzel. A 3.4. táblázat tartalmazza a vegyületek 96%-os alkoholban való oldhatóságát szobahőmérsékleten (DMSO-ban is hasonló értékeket kapunk). Ezek az oldatok vízzel bármilyen arányban hígíthatók a konjugátumok kicsapódása nélkül. A vízdoldhatóság arányos a molekulák PEG-tartalmával: a legjobb oldhatósággal a két hosszú PEG-láncot tartalmazó 44 vegyület rendelkezik, a rövid TEG/OEG összekötő elemmel rendelkező dimerek

(például **54**) oldhatósága sokkal alacsonyabb. Az *in vivo* sejtes vizsgálatokhoz mikromólos koncentrációkra van szükség, amit többeszeres hígítással lehet elérni, tehát a DMSO mennyisége a mintákban már elhanyagolható.

3.4. táblázat. A konjugátumok oldhatóságának összehasonlítása

vegyület	mg/ml (96%-os EtOH)
40	37.50
42	3.34
44	66.00
45	2.70
51	2.67
54	0.38

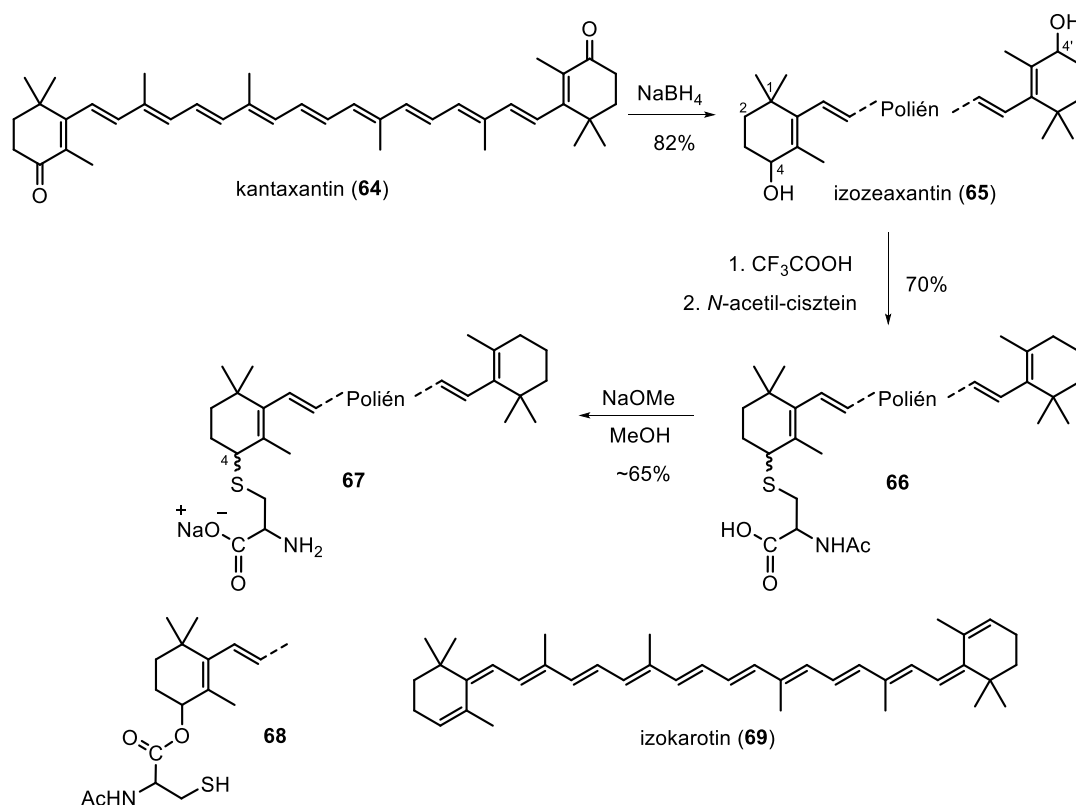
Az azid-alkin klikk-reakció egy jól ismert, enyhe cikloaddíciós eljárás, amelyet napjainkban igen elterjedten használnak a biomolekulák átalakításában. Karotinoid-származékok szintézisére is ideális lehet egy ilyen reakció, amely enyhe körülmények között gyorsan lejátsszódik. Ennek ellenére semmilyen irodalom nem volt fellelhető a karotinoidok klikk-reakciójáról (a mai napig is csak az általunk közöltek). A karotinoidokból pentinoát-észtereket készítettünk, mert propargil-éter vagy észter kialakítása nem járt sikerrel. A pentinoátokat először benzil-aziddal teszteltük, hogy megtaláljuk az optimális körülményeket (réz(I)-jodid, DMF, 40 °C, 3-4 óra). Ezután a pentinoátokat feleslegben alkalmazott mPEG550-aziddal reagáltattuk, amit két lépésben toziláton keresztül készítettünk mPEG550-OH-ból, és közepes kitermeléssel kaptuk a megcélzott triazolokat (3.30. ábra).



3.30. ábra. Azid-alkin klikk-reakció karotinol-pentinoátokkal

Így egy másik módszerrel is előállítottunk PEG-származékokat, ennél fontosabb azonban, hogy a klikk-reakció egy jól működő alternatíva lett a további szintézisekben is. A pentinoátok jó kitermeléssel előállítható és kristályosítható vegyületek, így ezután ezeket használtuk alkinként az ilyen típusú reakciókban.¹⁰²

Az irodalmi részben láthattuk, hogy lizinnel vagy foszforsavval észteressítve a karotinoidokat jelentősen növelhető a vízoldhatóság. A karotinoidok sajátos szerkezete lehetővé tette, hogy egy speciális módszerrel állítsunk elő ciszteinnel tioéter jellegű, azaz hidrolitikusan stabil konjugátumot. Régóta ismert, hogy β -karotint Lewis-savval vagy izozeaxantint Brønsted-savval reagáltatva kék színű dikation nyerhető a karotinoidokból, amely készségesen reagál egyszerű nukleofilekkel.¹⁰³ *N*-acetyl-L-ciszteint használva a várt reakció lejátszódott, és a **66**-os konjugátumot jó hozammal izoláltuk. Az *N*-acetyl-L-cisztein karboxilcsoportja is viselkedhet nukleofilként, azonban a **68** észter képződését nem tapasztaltuk. Az acetyl-védőcsoportot metanolban nátrium-metilát feleslegével távolítottuk el, amely a cisztein-konjugátumok vízoldható nátriumsóit (**67**) eredményezte. A kapcsolási reakciót védtelen ciszteinnel végezve szubsztitúció nem történt, csak izokarotin képződését (**69**) mutattuk ki (3.31. ábra).



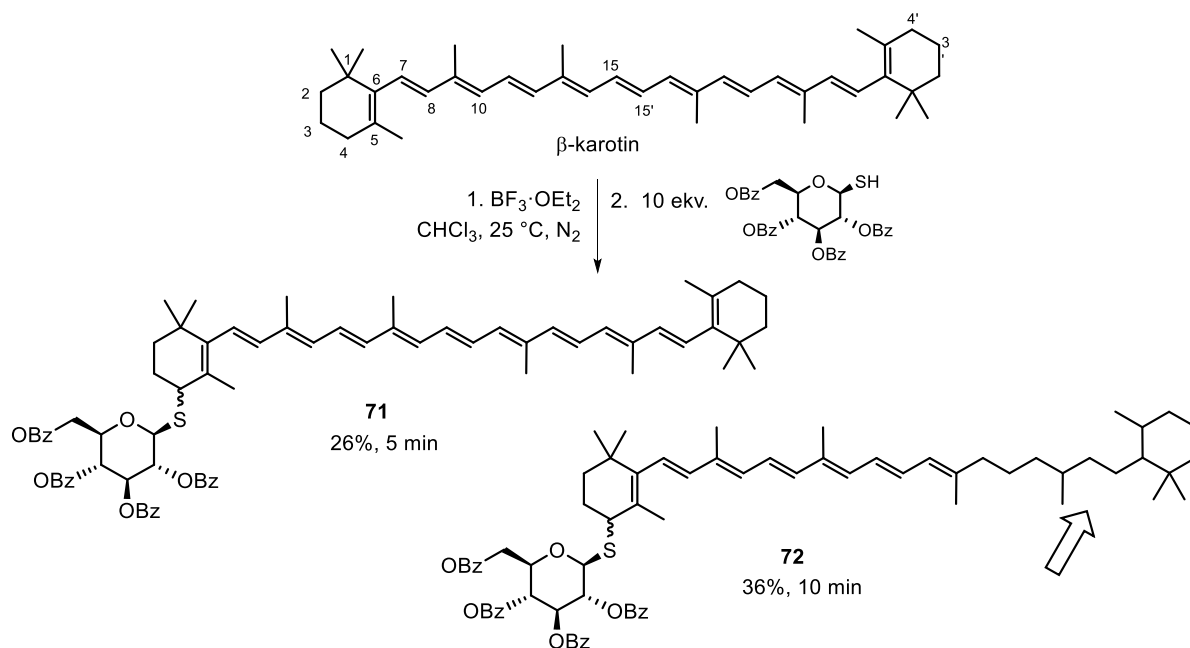
3.31. ábra. Tioéterek szintézise ciszteinnel

Az előállított ciszteinszármazékok védő hatásának előzetes vizsgálatait májsejteken végeztük hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stresszben. Az új karotinoidok mind vizes oldatban, mind liposzómában kismértékű védőhatást mutattak, a sejtek túlélése H_2O_2 kezelés után 6-7%-kal nőtt a karotinnal nem kezelt sejtekhez képest.¹⁰⁴

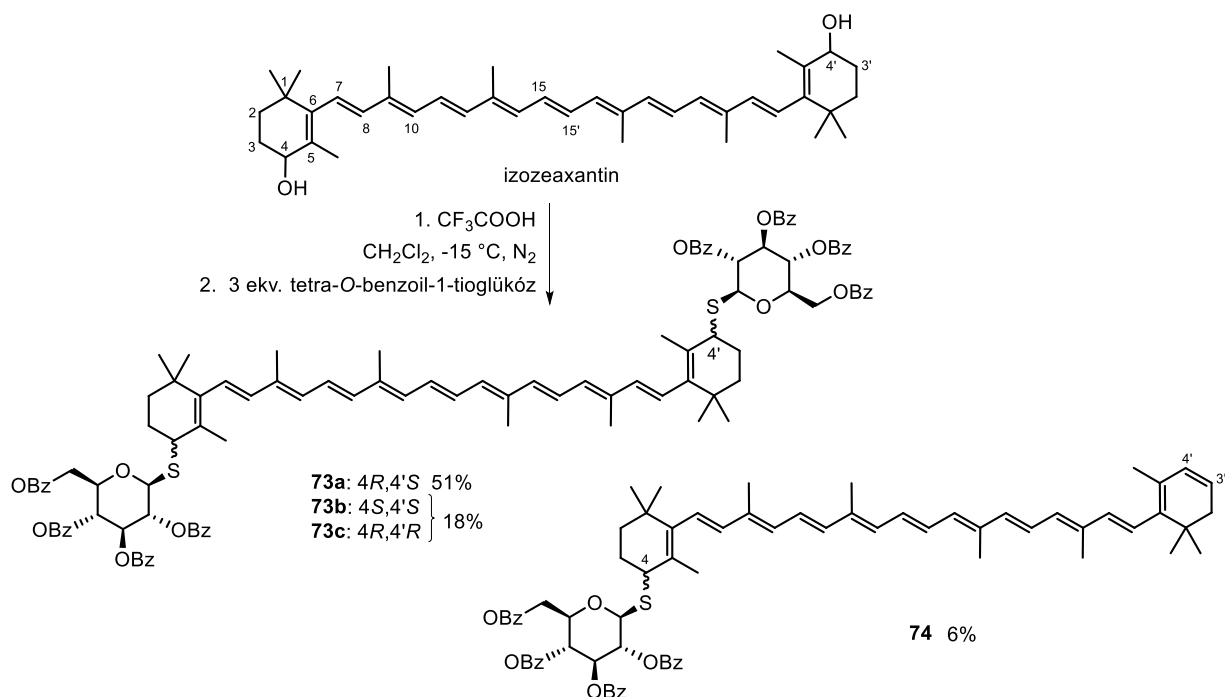
3.2.3. Karotinoidok szénhidrátszarmazékainak előállítása

A karotinoid-glikozidok a természetben is előfordulnak, elsősorban baktériumokban, algákban, ahol biológiai szerepük például a foszfolipid membránok fluiditásának szabályozása és védelme az oxidációtól. Kémiai szintézisükre mindössze két módszert publikáltak: a karotinoid-alkoholok direkt glikozilezését a klasszikus Königs-Knorr eljárással,⁵⁶ valamint egy 3-hidroxi- β -iononból kiinduló totálszintézist.¹⁰⁵ Mindkét módszerrel körülbelül ~3-8 % összhozamot értek el. Az volt a célunk, hogy ennél jóval magasabb kitermelésű reakciókkal állítsunk elő glikozidokat vagy hasonló konjugátumokat karotinoidokból, amivel természetesen a vízzoldhatóságuk is megnövelhető. A Königs-Knorr eljárással mi sem kaptunk jó hozamokat, és eleinte a glikozil-triklór-acetimidát donor sem működött sem allil-, sem homoallil-helyzetű hidroxilcsoporttal.

Ha egy védett cukorból nukleofilt sikerül készíteni, akkor az reagálhat a korábban már említett karotin-dikationnal. Kísérleteink alapján csak *S*-nukleofillel (glükóz-tiol) játszódik le a reakció. Ha β -karotinból Lewis-savval képezzük a dikationt, akkor a nagy feleslegben lévő tiol gyorsan redukálja a polién láncot (**72**, 3.32a. ábra), viszont izozeaxantinból kiindulva, Brønsted-savat használva ez nem történik meg és a **73a** bisz-tioglikozid lesz a főtermék (3.32b. ábra). Sajnos a termékek debenzoilezése nem sikerült több módszerrel sem. A termékek a termoxantinok (15. oldal, 2.8. ábra) tioanalogjainak tekinthetők.

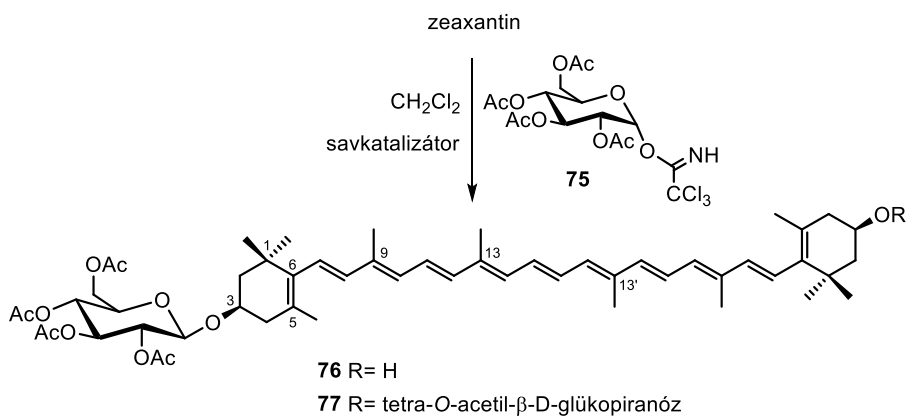


3.32a. ábra Tio-termoxantin-analógok előállítása β -karotinból



3.32b. ábra Tioteromoxantin-analógok előállítása izo-zeaxantinból

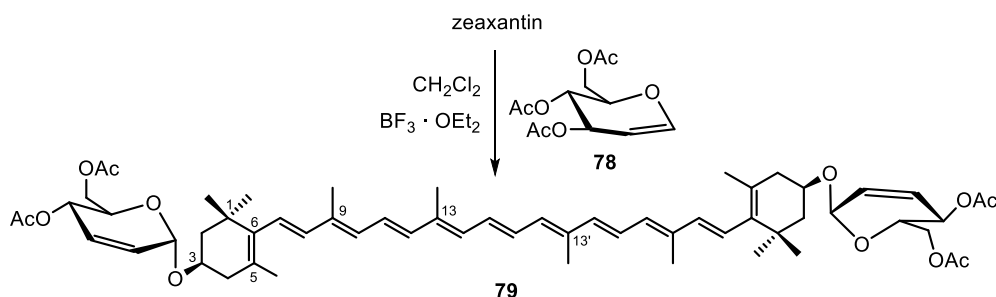
Nem adtuk fel a glikozilezési reakciók vizsgálatát sem. Modellvegyületként egy szimmetrikus diolt, a zeaxantint választottuk, amit tetra-*O*-acetyl- α -D-glükopiranozil-triklóracetimidáttal reagáltattunk, amely egy gyakori, aktív, általánosan használt glikozilező szer. Különböző Brønsted- és Lewis-savakat (5-10 mol%) alkalmaztunk katalizátorként száraz diklór-metánban.¹⁰⁶



3.33. ábra A zeaxantin mono- és bisz-glükozidjainak előállítása

A legtöbb katalizátor használatakor a karotinoid bomlását tapasztaltuk, a hozamok meglehetősen alacsonyak voltak, kivéve a *p*-toluol-szulfonsav (*p*-TsOH) esetében, ahol a **76**-os monoglükozidot kiváló, 77%-os hozammal kaptuk (3.33. ábra), de érdekes módon a bisz-glükozidot nagy reagensfelesleg esetén is csak nyomokban (5-6 %) tudtuk izolálni.

Próbálkoztunk dezoxi-glikozidok előállításával is, a tri-*O*-acetyl-D-glükál (**78**) Ferrier-átrendezése zeaxantinnal, bór-trifluorid katalizátor felhasználásával kizárólag az **79** dezoxi-biszglikozidot szállította (3.34. ábra). Más Lewis-sav katalizátorok csak bomlástermékeket adtak.



3.34. ábra. Ferrier-reakció zeaxantinnal

A zeaxantinnal kapott fenti eredmények azt mutatták, hogy a triklór-acetimidát donorral végzett glikozilezés legjobb promotere a *p*-TsOH volt, a Ferrier-reakciónál pedig a bór-trifluorid dietil-éterát. Ezeket a feltételeket alkalmaztuk más hidroxikarotinoidokra is, amelyek allil (8'-apokarotinol és lutein) és nem allil helyzetű hidroxilcsoportot tartalmaznak (β -kriptoxantin és kapszantin). Az allil hidroxilcsoportokat tartalmazó karotinoidok hajlamosak karbokationok képzésére, különösen a Brønsted-savakkal, így ezekben a kísérletekben szinte kizárólag a karotinoid bomlása/dehidratációja ment végbe (3.5. táblázat).

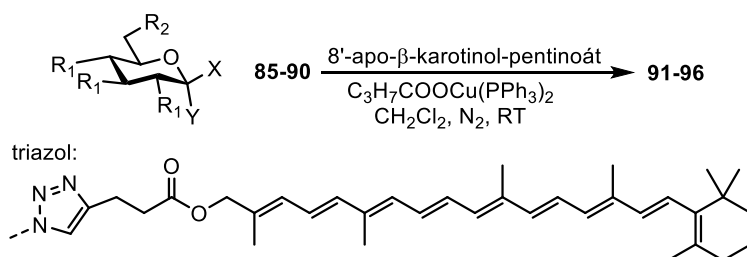
3.5. táblázat. Glikozilezési reakciók hidroxikarotinoidokkal

Karotinoid	Cukor	Katalizátor	Hőm.	Reakcióidő	Kitermelés (monoglikozid=MG bisglikozid=BG)
β -kriptoxantin	75	<i>p</i> -TsOH	r.t.	éjszaka	80 MG (8%) + bomlás
kapszantin	75	<i>p</i> -TsOH	r.t.	éjszaka	81 MG (41%) 82 BG (22%)
8'- β -apokarotinol	75	<i>p</i> -TsOH	r.t.	éjszaka	bomlás
lutein	75	<i>p</i> -TsOH	r.t.	éjszaka	bomlás
β -kriptoxantin	78	BF ₃ .OEt	0 °C	30 min	83 MG nyomokban (< 5%)
kapszantin	78	BF ₃ .OEt	0 °C	30 min	84 BG (32%)
8'- β -apokarotinol	78	BF ₃ .OEt	0 °C	20 min	bomlás
lutein	78	BF ₃ .OEt	0 °C	30 min	bomlás

A kapszantin mérsékelt hozammal adta a **81** monoglikozidot és a **82** biszglykozidot, valamint a **84** dezoxi-biszglykozidot, míg meglepetésünkre az egyetlen hidroxilcsoportot tartalmazó β -kriptoxantin esetében szinte egyáltalán nem keletkezett termék. Úgy tűnik, hogy a nem-hidroxilált β -végcsoport kationképződésének és átrendeződésének sebessége savak hatására összemérhető a glikozilációéval.

Eredményeink alapján a nem allil dihidroxikarotinoidok, a zeaxantin és a kapszantin ideális kiindulási anyagok a savval katalizált glikozilezésekhez, amelyek egyetlen lépésben mérsékelt vagy jó kitermeléssel adják a célglikozidokat. Míg a természetes és szintetikus zeaxantin-glikozidok már ismertek, addig kapszantin-glikozidokat vagy bármely κ -karotinoid-glikozidot a természetben még nem találtak, így azok különösen érdekesek lehetnek. A cukrok védőcsoportjainak eltávolítása vízoldható karotinoid-glikozidokat eredményez. Sajnos a dezacetilezést többféle módszerrel sem sikerült megvalósítanunk elfogadható hozammal, ezért továbbra is szükség van egy enyhe, de hatékony elszappanosítási módszerre, különösen a savlabilis dezoxi-glikozidok esetében.

A PEG-származékoknál már alkalmazott klikk-reakció új lehetőséget jelentett karotinoidok és cukrok összekapcsolására is. Az alkin ebben az esetben is a karotinoid volt, az azidok pedig a cukrokból könnyen előállítható glikozil-azidok. Az előkísérletekhez modellvegyületeként a 8'-apo- β -karotinol-pentinoátot választottuk. A korábban PEG-re optimalizált körülmények között nem történt átalakulás (Cu(I)/DMF), ám a magyar fejlesztésű¹⁰⁷ bisz-trifenil-foszfano-réz(I)-butirát ($C_3H_7COOCu(PPh_3)_2$) diklór-metánban történő alkalmazása a **91** triazol képződését eredményezte 1-2 óra alatt, jó hozammal. Ugyanilyen körülmények között más védett és védőcsoport nélküli cukor-azidokat (**85-90**) reagáltattunk 8'-apo- β -karotinol-pentinoáttal, így a cél triazolokat (**91-96**) kaptuk (3.35. ábra). A 6-dezoxi-6-triazolil-tetraacetyl-glükózszármazék (**94**) kivételével az acilvédett glikozil-triazolok kiváló hozammal keletkeztek (3.6. táblázat).¹⁰⁸

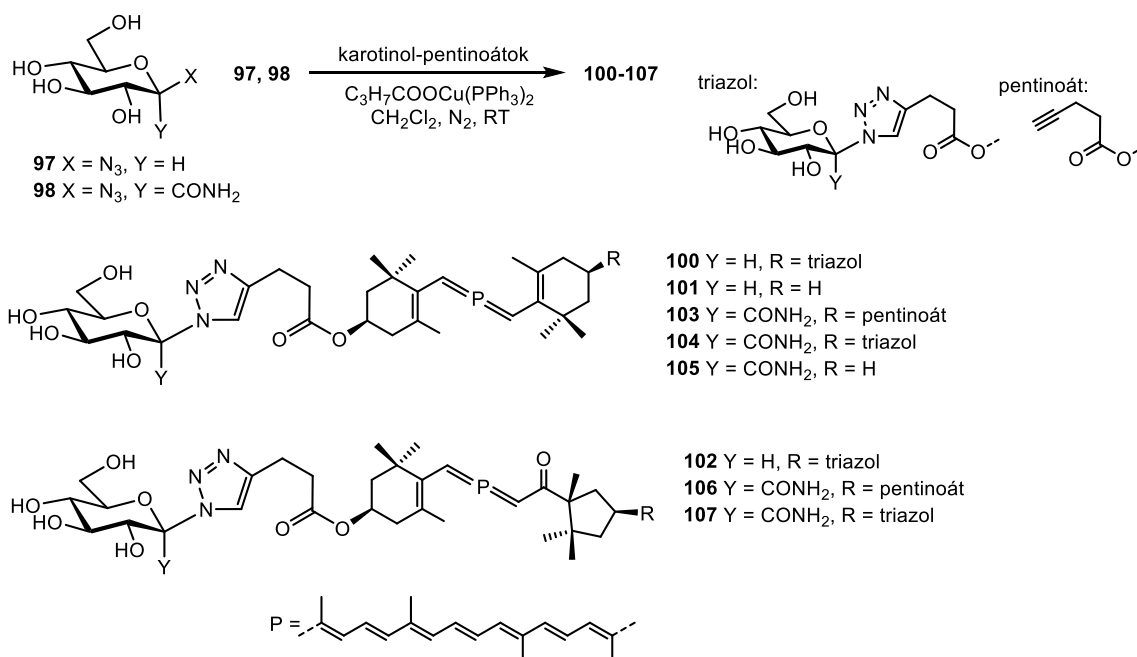


3.35. ábra. A 8'-apo- β -karotinal-pentinoát CuAAC reakciója cukor-azidokkal

3.6. táblázat. A 8'-apo- β -karotinol-pentinoát CuAAC reakciója cukor-azidokkal

No.	Cukor	R ₁	R ₂	X	Y	Termék	R ₁	R ₂	X	Y	Reakció-idő	Kit.
1	85	OAc	OAc	N ₃	H	91	OAc	OAc	triazol	H	1.5 h	92%
2	86	OAc	OAc	H	N ₃	92	OAc	OAc	H	triazol	2 h	95%
3	87	OBz	OBz	N ₃	CONH ₂	93	OBz	OBz	triazol	CONH ₂	7 h	93%
4	88	OAc	N ₃	OAc/H		94	OAc	triazol	OAc/H		8 h	63%
5	89	OH	OH	N ₃	H	95	OH	OH	triazol	H	6 h	72%
6	90	OH	OH	N ₃	CONH ₂	96	OH	OH	triazol	CONH ₂	2 nap	49%

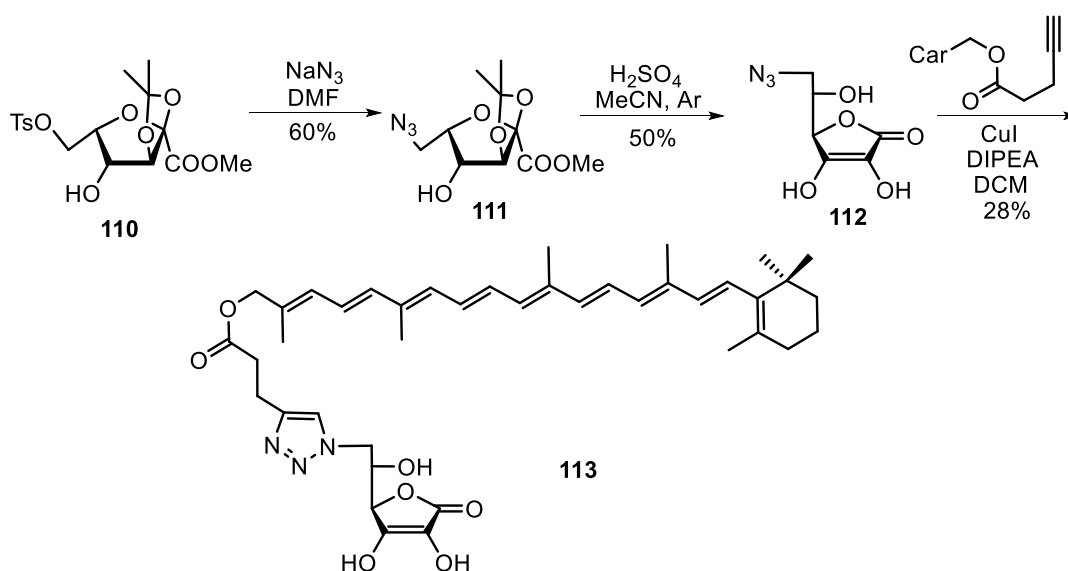
A korábbi tapasztalatok alapján a klikk-reakció kulcsfontosságú követelménye,¹⁰⁹ hogy a reaktánsok oldott állapotban legyenek.¹¹⁰ Kísérleteink során azonban azt találtuk, hogy a diklór-metánban oldhatatlan, védetlen cukrokkal történő reakciókban alacsonyabb, de még elfogadható kitermeléssel keletkeztek a termékek (3.36. ábra, 3.7. táblázat). Ezek a körülmények lehetővé teszik a nem védett glikozil-triazolok egyszerű szintézisét, különben a cukor szelektív dezacilezése nehezen valósítható meg.

**3.36. ábra.** Karotinol-pentinoátok CuAAC reakciója védetlen cukor-azidokkal

3.7. táblázat. Karotinol-pentinoátok CuAAC reakciója védetlen cukor-azidokkal

Cukor	Karotinol-pentinoát	Reakcióidő	Termékek (kit.)
97	zeaxantin-dipentinoát	12 h	100 ditriazol (65%)
97	β -kriptoxantin-pentinoát	12 h	101 (76%)
97	kapszantin-dipentinoát	12 h	102 ditriazol (71%)
98	zeaxantin-dipentinoát	2 nap	103 monotriazol (< 5%) 104 ditriazol (< 5%)
98	β -kriptoxantin-pentinoát	2 nap	105 n.a.
98	kapszantin-dipentinoát	2 nap	106 monotriazol (< 5%) 107 ditriazol (15%)

Szintén eredményesen alkalmaztuk az azid-alkin klikk-reakciót L-aszkorbinsav karotinoid-pentinoáthoz való kapcsolására. A reakcióhoz védetlen azidra volt szükségünk, hogy a védőcsoport eltávolításával járó kudarcokat elkerüljük. A 6-azido-L-aszkorbinsav szintézisére (**112**) nem volt irodalmi példa, ám az aszkorbinsav 6-monotizilezése és a tozil cseréje nem hozott eredményt a védetlen cukron. Előállították viszont a 6-fluoro-származékot 2,3:4,6-di-*O*-izopropilidén-2-keto-L-gulonsavból 4 lépésben.¹¹¹ A szintézis szubsztitúciós lépését módosítva (**110-111**) jó kitermeléssel sikerült előállítanunk a **112** 6-azidot nátrium-aziddal (3.37. ábra).

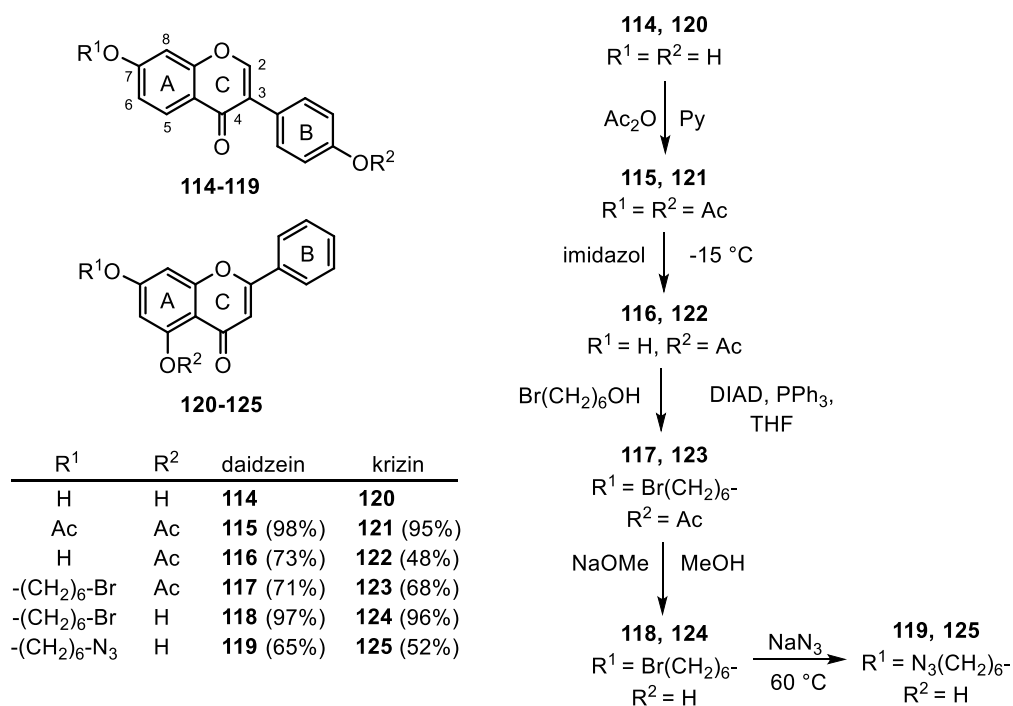
3.37. ábra. Védetlen aszkorbinsav klikk-reakciója 8'-apo- β -karotinol-pentinoáttal

Az azidot 8'-apokarotinol-pentinoáttal reagáltatva, a cukroknál használt Cu(I)-komplexszel sikerült megkapnunk a **113** triazolt szerény kitermeléssel. A termék meglehetősen érzékeny oxidációra, ezért nehéz tiszta formában kinyerni. Mindenesetre a „proof of concept”

bizonyításra került és további hasonló konjugátumok előállítása elvileg lehetséges lesz a jövőben.

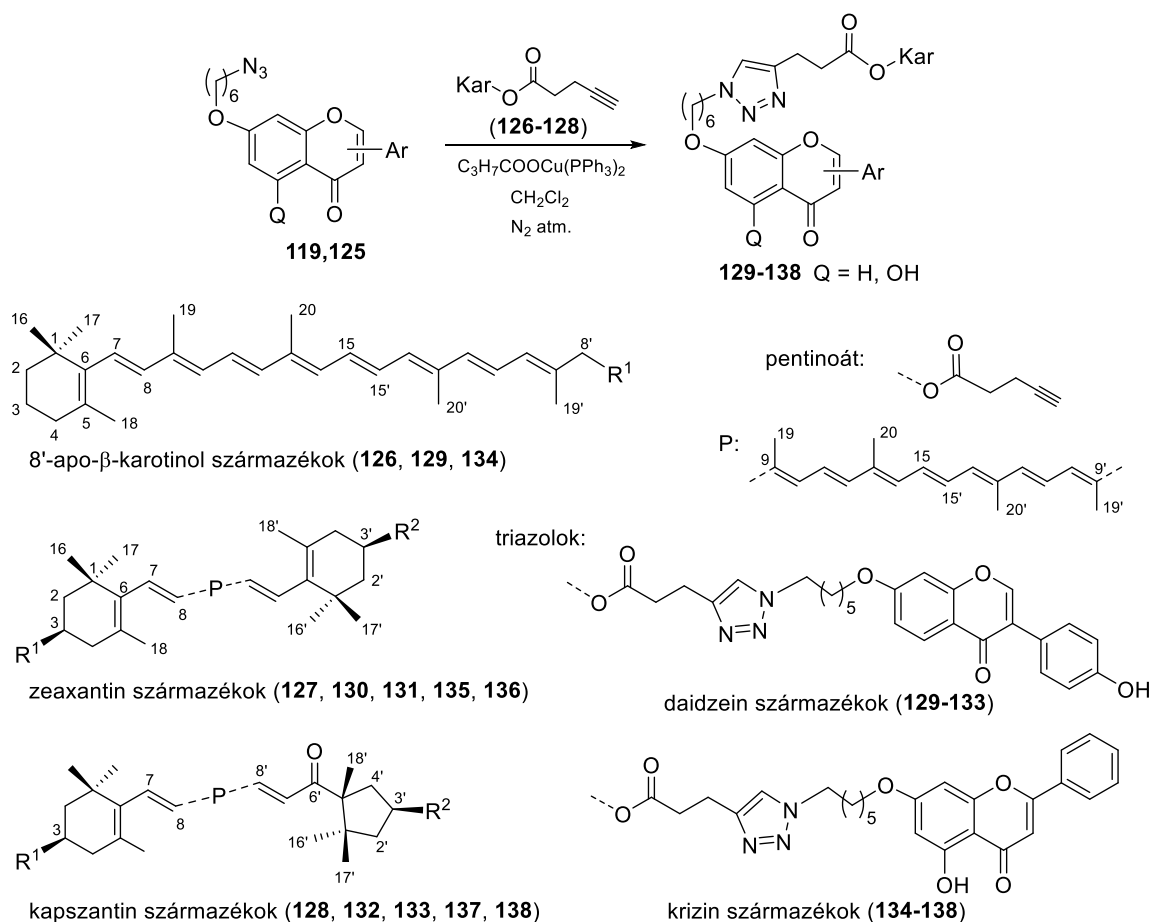
3.2.4. Karotinoid-flavonoid konjugátumok

A flavonoidok sokféle pozitív élettani hatással rendelkeznek, többek között magas antioxidáns kapacitással, antikarcinogén, immunmoduláló és gyulladásgátló tulajdonsággal. A hidrofób karotinoidok kovalens kapcsolása a hidrofílebb flavonoidokkal, például daidzeinnel (**114**) és krizinnel (**120**), új amfipatikus és potenciálisan bifunkciós vegyületeket eredményezhet. A kétféle vegyület klikk-reakcióval történő kapcsolásához a daidzein és a krizin 7-azidohexil-étereit állítottuk elő öt lépésben (3.38. ábra).¹¹² A kvercetin esetében az azidot nem sikerült előállítani, komplex reakcióelegy keletkezett.



3.38. ábra. A daidzein és krizin 7-azidohexil-étereinek szintézise

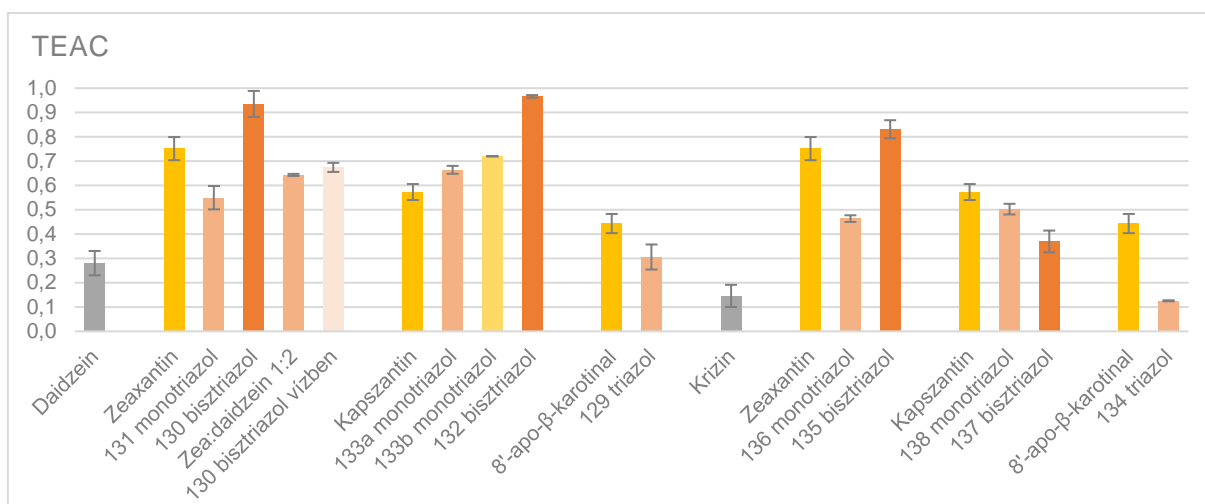
A flavonoid-azidokat azid-alkin cikloaddícióban 8'-apo-β-karotinol, zeaxantin és kapszantin pentinoátjaival reagáltattuk és a **16-25** mono- vagy bisztriazol karotinoid-flavonoid konjugátumokat kaptuk. A konverzió nem mindig volt teljes, közepes kitermeléssel (a krizin esetében magasabban) kaptuk a termékeket a már korábban alkalmazott Cu(I)-butirát komplexszel (3.39. ábra).



flavonoid	Kar-pentinoát	R ¹ = R ² = triazol	R ¹ = triazol, R ² = pentinoát
119	126 (8'-apo-β-karotinol)	129 (monotriazol) 62%	-
119	127 (zeaxantin)	130 (bisztriazol) 42%	131 (monotriazol) 7%
119	128 (kapszantin)	132 (bisztriazol) 40%	133a (monotriazol) 22%
			133b (R ¹ = pentinoát, R ² = triazol) 23%
125	126 (8'-apo-β-karotinol)	134 (monotriazol) 75%	-
125	127 (zeaxantin)	135 (bisztriazol) 59%	136 (monotriazol) 60%
125	128 (kapszantin)	137 (bisztriazol) 88%	138 (monotriazol) 21%

3.39. ábra. A daidzein és krizin 7-azidohexil-étereinek kapcsolása karotinoid-pentinoátokkal azid-alkin klikk-reakcióval.

Az antioxidáns hatás változását az ABTS^{•+} gyökkationnal etanolban meghatározott trolox-ekvivalens antioxidáns kapacitással (TEAC) jellemeztük. Az 1:1 arányú flavonoid-karotinoid konjugátumok általában magasabb antioxidáns aktivitást mutattak, mint az eredeti flavonoidok, de alacsonyabbat, mint a megfelelő karotinoidok (3.40. ábra)



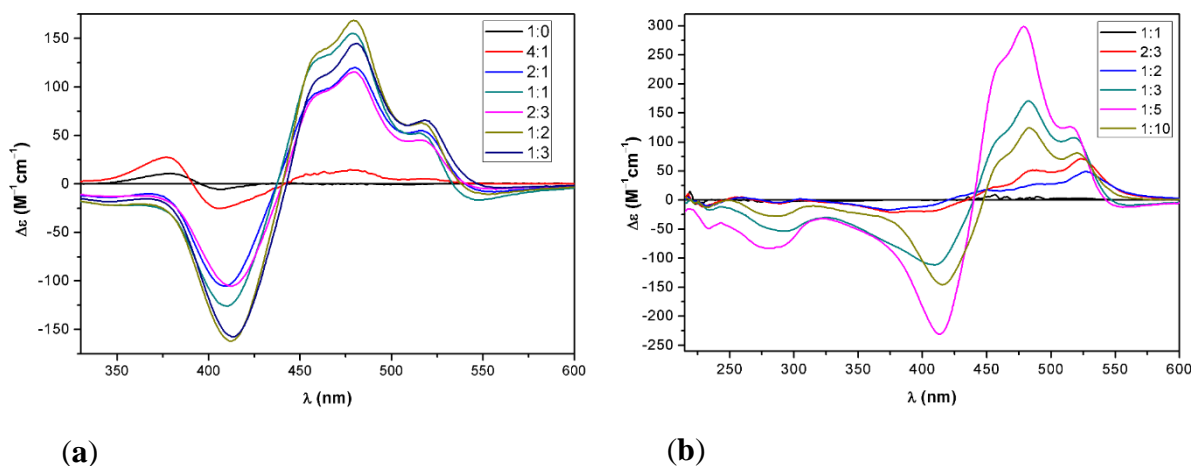
3.40. ábra. A kiindulási flavonoidok és karotinoidok, valamint konjugátumaik TEAC értékei etanolban.

A két flavonoidmolekulával konjugált zeaxantin- és a kapszantin-daidzein-bisztriazol származékok voltak a legjobb antioxidánsok a vizsgált körülmények között. Egy egyszerű zeaxantin:daidzein 1:2 arányú keverék TEAC értéke sokkal alacsonyabb, mint a **130** bisztriazol-konjugátumé, ami az antioxidáns kapacitás szinergikus növekedését jelzi, hasonlóan a **132** bisztriazoléhoz. A **130** vegyület antioxidáns tulajdonságát vizes ABTS⁺ oldatban is meghatároztuk, ahol a TEAC érték a felére esett vissza. A jelenség oka a karotinoidszármazékok víz által kiváltott aggregációjával magyarázható,¹¹³ ami befolyásolja az antioxidáns hatást, ezért megvizsgáltuk a termékek aggregációs hajlamát is.

A karotinoidokról ismert, hogy bizonyos körülmények között a természetben is aggregálódnak. A kialakuló szupramolekuláris egységek gyakran rendezett szerkezetűek (H- vagy J-típusú aggregátumok), ami jelentős változásokat eredményez a karotinoidok UV-Vis spektrumában.¹¹⁴ Ezen túlmenően az optikailag aktív szerkezetű aggregátumok úgynevezett szupramolekuláris exciton kiralitást mutathatnak, amely elektronikus cirkuláris dikroizmus (ECD) spektroszkópiával vizsgálható.¹¹⁵

Mivel a **129** daidzein-8'-apo-β-karotinal hibrid nem királis szerkezetű, aggregációját csak UV-Vis spektrumának változásával vizsgáltuk. A **129** vízzel hígított etanos oldatának abszorpciós spektruma intenzív hipszokrom és kismértékű hipokrom eltolódást mutatott, ami a **129** önszerveződésére utal H-aggregátum képződésével. Az optikailag aktív **130**, **132**, **135** és **137** bisztriazolok, valamint a **136** monotriazol aggregációs tulajdonságait ECD spektroszkópiával is tanulmányoztuk. Ezen származékok acetonos vagy tetrahidro-furános oldatát vízzel hígítottuk, és a különböző hígításokkal ECD spektrumokat vettünk fel. Vízzel

hígítva az optikailag aktív kapszantin származékok (**132**, **137**) ECD spektrumai nem mutattak szignifikáns intenzitásnövekedést, ami szupramolekuláris szerveződésre utalt volna. Ezzel szemben a **130** bisztriazol daidzein-zeaxantin konjugátum spektrumában intenzív ECD-sávok jelentek meg acetonban, amikor a víztartalom 25% fölé emelkedett (3.41a. ábra).



3.41. ábra. A bisztriazol daidzein-zeaxantin konjugátum (**130**) ECD spektrumai
(a) aceton/víz 1:0-1:3 elegyben, (b) THF/víz 1:1-1:10 elegyben.

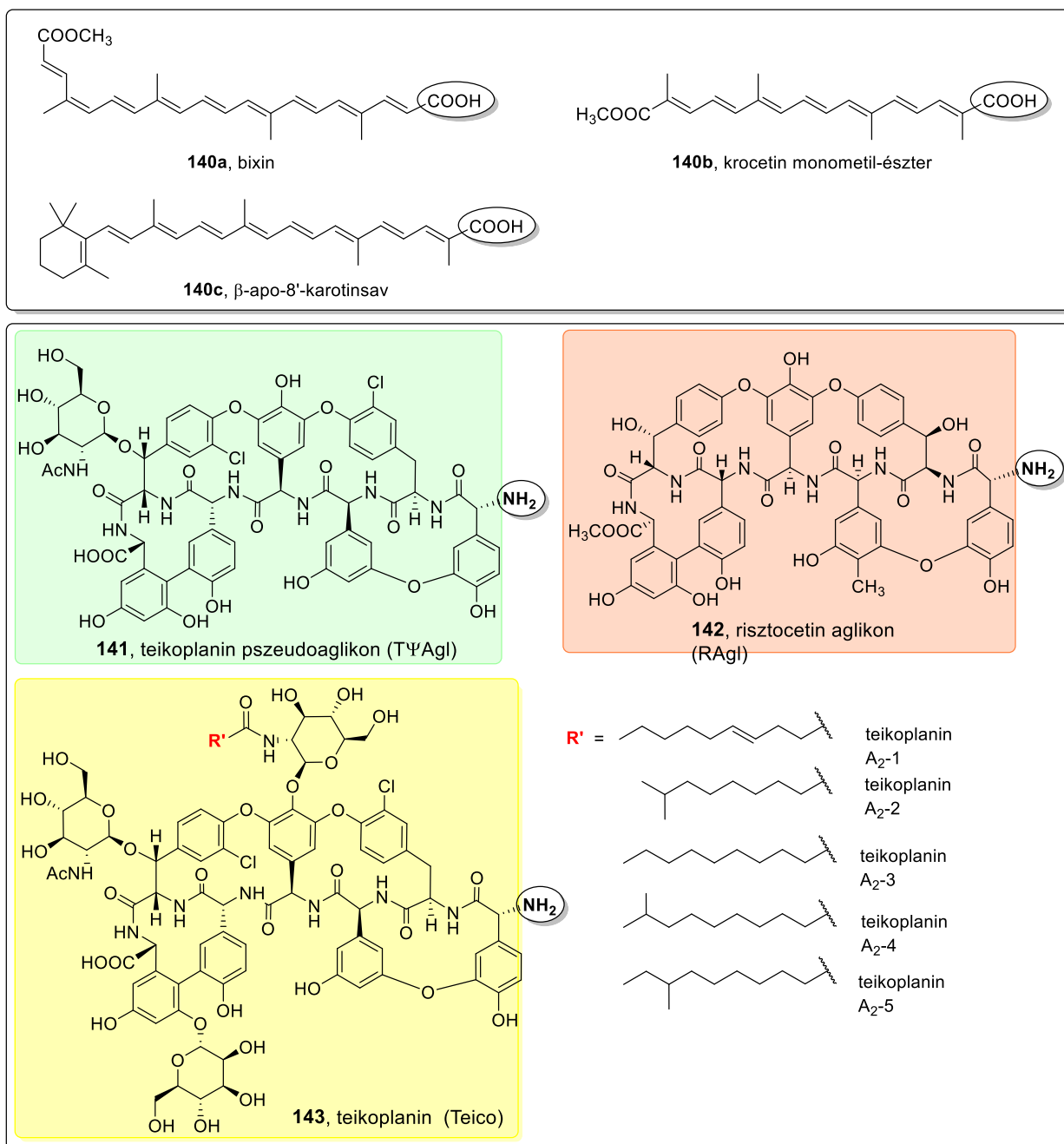
THF-ben hasonló ECD-sáv jelent meg a víz arányának növekedésével és a maximális ECD-intenzitást 1:5 aránynál kaptuk, míg a víztartalom további növelése csökkentette a Cotton-effektusok amplitúdóját (3.41b. ábra).

A zeaxantin-flavonoid konjugátumok ECD és UV-vis analízise azt mutatta, hogy az alkalmazott aprotikus poláros oldószer arányától és típusától függően különböző, optikailag aktív J-aggregátumok képződnek aceton/víz és THF/víz keverékekben, míg a kapszantinszármazékok nem mutattak aggregációt. A zeaxantin daidzeinnel és krizinnel alkotott konjugátumai (**130** és **135**), amelyek csak a fenolos hidroxilcsoport helyzetében különböznek egymástól víz hozzáadására szignifikánsan eltérő aggregációs profilt mutattak.

3.2.5. Antivirális glikopeptid-karotinoid konjugátumok

A globális COVID-19 járvány új gyógyszerek kifejlesztését indította el a SARS-CoV-2 kórokozó ellen. A klinikailag használt glikopeptid antibiotikum, a teikoplanin módosított változatai bizonyítottan vírusellenes hatással is rendelkeznek, leginkább akkor, ha lipofil csoportok kerülnek a molekulára.

Teikoplaninból (**143**), annak pszeudoaglikonjából (**141**) és a rokon risztocetin-aglikonból (**142**) új lipofil apokarotinoid-konjugátumokat készítettünk (3.42. ábra).¹¹⁶



3.42. ábra. A glikopeptid konjugátumok szintéziséhez használt apokarotinoidok (felső panel) és glikopeptid-antibiotikum származékok (alsó panel).

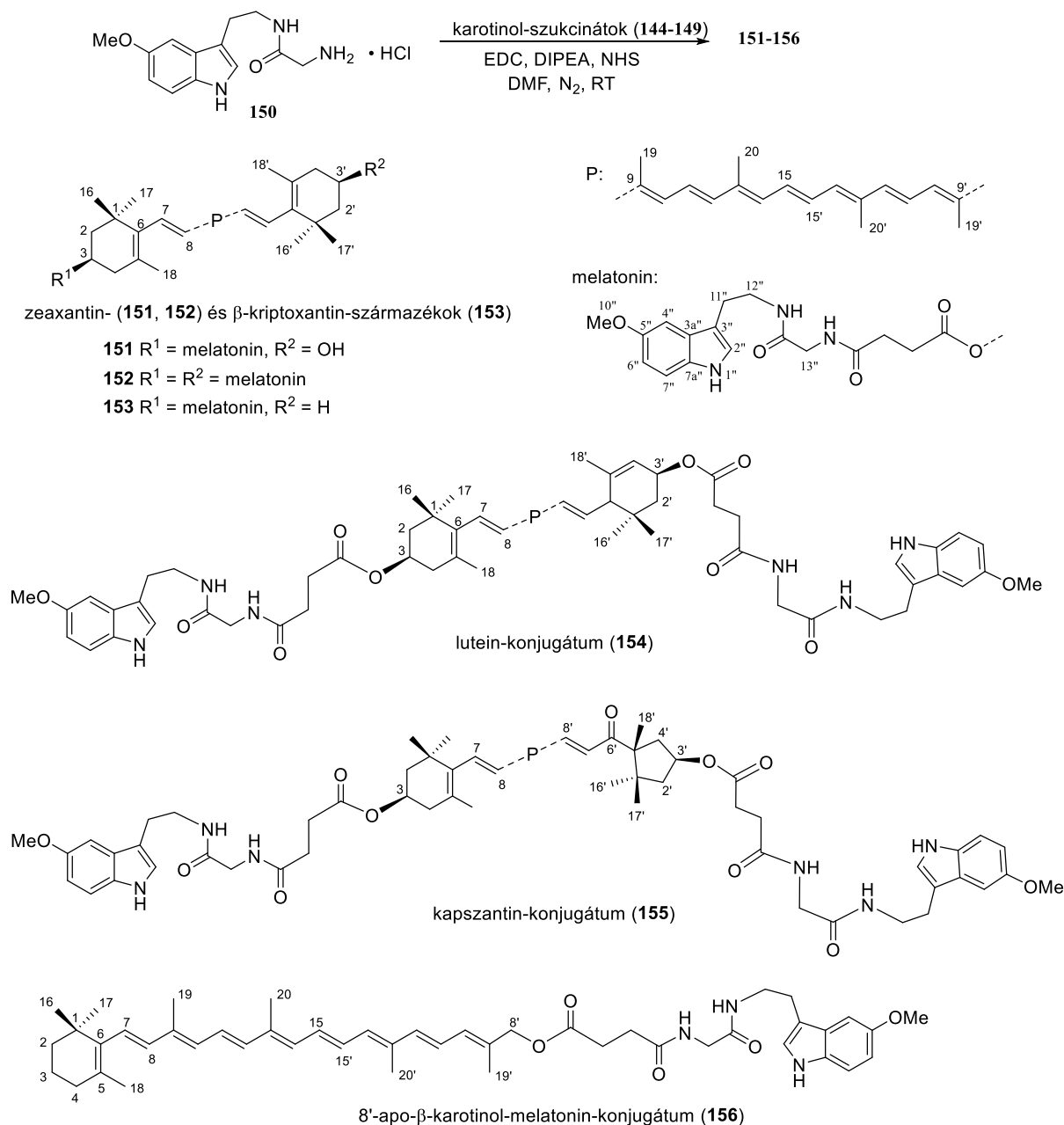
A vírusellenes hatást SARS-CoV-2 ellen teszteltük Vero E6 sejtekben, sejtéletképességi vizsgálattal és vírus-RNS kvantitatív PCR-al, megerősítve a vírusreprodukció elleni mikromoláris gátló hatásukat. Érdekes módon a kiindulási apokarotinoidok közül kettő, a bixin (**140a**) és a 8'- β -apo-karotinsav (**140b**) önmagában is figyelemreméltó SARS-CoV-2 elleni aktivitást fejtett ki. Számítógépes modellezéssel és enzimaktivitás-méréssel is vizsgáltuk továbbá a vegyületek hatását a vírus proteázok közül a katepszin L- és B-re, valamint a fő

proteázra, a 3CLPro-ra. A glikopeptid konjugátumok minden proteázt gátoltak, míg az apokarotinoidek főként katepszin B és L affinitással rendelkeztek. Mivel a teikoplanin egy forgalomban lévő antibiotikum, a természetes bixin pedig egy engedélyezett, olcsó és széles körben használt piros színezék, élelmiszer-adalékanyag, ezek a könnyen hozzáférhető vegyületek és konjugátumaik potenciálisan alkalmazhatók a SARS-CoV-2 fertőzések kezelésében és a bixin esetében mellékhatásoktól sem kell tartani.

3.2.6. Karotinoid-melatonin konjugátumok előállítása

A melatonin hormonként elsősorban a cirkadián ritmust szabályozza, de egyben az egyik legjobb természetes antioxidáns és gyökfogó is. Közvetlen hatásai mellett a melatonin jelátvitelt folyamatokat is indukál a melatonin receptorokon keresztül.¹¹⁷ Elősegíti az olyan antioxidáns enzimek expresszióját, mint a szuperoxid-diszmutáz, glutation-peroxidáz, glutation-reduktáz és kataláz.¹¹⁸ Az immunrendszerre is hatással van, valószínűleg gyulladáscsökkentőként hat.¹¹⁹ Egyre több bizonyíték van arra, hogy a melatonin szerepet játszik különböző betegségek, például a rák megelőzésében, és még a COVID-19-et kiváltó SARS-CoV-2 vírus által okozott kórképek súlyosságát is enyhítheti.¹²⁰ A jelátvitelben való részvétele miatt a melatonint használják különféle neurodegeneratív betegségek kezelésére is, mint például a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór.¹²¹

A melatonin pleiotróp hatása tovább javítható kovalens származékképzéssel, amint ezt néhány irodalmi példa már bizonyította.¹²² Mi természetesen karotinoidokkal szerettük volna konjugálni, ehhez karotinoid-szukcinátokat használtunk, melyeket amidkötéssel keresztül kapcsoltunk a melatonin kereskedelmi forgalomban kapható aminoszármazékához. A kapcsolási reakciók a katalizátor és a körülmények optimalása után elfogadható és jó kitermeléssel adták a konjugátumokat (3.43. ábra). A szukcinilálás növelte a karotinoidok vízoldhatóságát, míg a melatoninnal való konjugáció lipofilebb származékokat eredményezett.¹²³ A termékeket elsősorban szemészeti alkalmazásra készítettük, de sem a konjugátumok, sem a szukcinátok oldhatósága nem volt megfelelő a döntően vizes rendszerekben. Az elmúlt évben azonban magyar farmakológusok is érdeklődni kezdtek a lutein és zeaxantin származékai iránt. A lutein- és zeaxanthin-szukcinátot ciklodextrinbe (RAMEB) zárva már *in vivo* is alkalmazhatónak tűnik szemcseppként, ezzel kapcsolatosan sikeres vizsgálatokat végeztünk a Semmelweis Egyetemmel kooperációban.¹²⁴



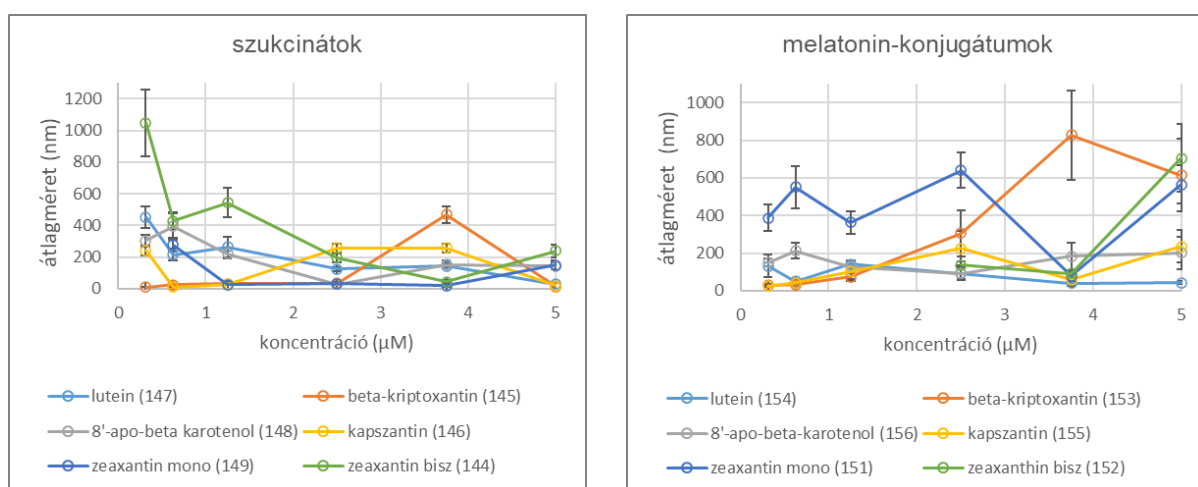
Karotinol-szukcinát	Termék (Kitermelés)
zeaxantin mono- (149) és biszszukcinát (144)	151 monomelatonin (73%), 152 biszmelatonin (72%)
β-kriptoxantin-szukcinát (145)	153 monomelatonin (55%)
kapszantin-biszszukcinát (146)	155 biszmelatonin (57%)
lutein-biszszukcinát (147)	154 biszmelatonin (48%)
8'-apo-β-karotinol-szukcinát (148)	156 monomelatonin (52%)

3.43. ábra. Karotinol-szukcinátok kapcsolási reakciója amino-melatoninnal

Megvizsgáltuk a szukcinát- és melatoninszármazékok aggregációs tulajdonságait is. A DMSO vagy THF oldószerekben készült törzsoldatokat foszfátpufferrel hígítottunk, miközben

felvettük az oldatok UV-vis spektrumait. THF-es törzsoldatból kiindulva azt találtuk, hogy a biszszukcinátok (**144**, **146**, **147**) és a 8'-apo- β -karotin-származékainak (**148**, **156**) oldatai nem mutatnak aggregációra utaló UV-elnyelést, azonban a többi melatonin-konjugátum (**151-156**) J-típusú aggregátumokat képzett. Ezzel szemben a DMSO-s törzsoldatból kiindulva az UV-vis spektrumok alapján mindegyik konjugátum H-típusú (card-pack) aggregátumokat adott.

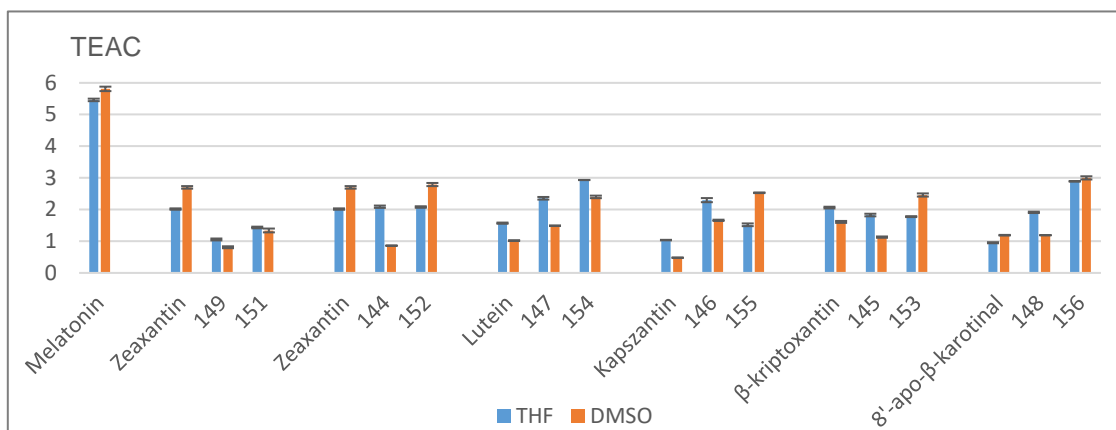
Mivel a DMSO-tartalmú vizes rendszerek alkalmasabbak biológiai vizsgálatokra, ezért ezeket az oldatokat dinamikus fényszórásos (DLS) spektroszkópiával is vizsgáltuk, hogy több információt kapjunk az aggregálódott részecskék méreteloszlásáról. A melatoninszármazékok általában 10-200 nm közötti aggregátumokat képeztek (3.44. ábra). A kivétel a zeaxantin-monomelatonin konjugátum (**151**), amely általában 400-600 nm méretű részecskéket képez, és a β -kriptoxantin-melatonin (**153**), amely mérete erős koncentrációfüggőséget mutatott. A zeaxantin (**152**) biszmelatonin konjugátuma alacsony koncentrációban olyan nagy részecskéket adott, hogy méretüket DLS-sel nem lehetett meghatározni. A ζ -potenciálok alapján az elkészített oldatok többsége viszonylag stabil kolloid rendszernek bizonyult. A szukcinátok legalább tízszer jobban oldódnak/diszpergálódnak vízben, mint a karotinoidok, de esetükben inkább stabil kolloid oldatokról beszélhetünk.



3.44. ábra. Az aggregátumok DLS-el meghatározott átlagos mérete (hidrodinamikai átmérője) különböző koncentrációkban (DMSO/PBS rendszerben)

Az *in vitro* antioxidáns hatás mérését ABTS és FRAP módszerekkel végeztük troloxhoz viszonyítva. A foszfát-pufferben végzett ABTS mérésnél a trolox-ekvivalens (TEAC) értékek erősen függenek a kiindulási szerves oldószer (THF vagy DMSO) minőségétől, annak ellenére, hogy ezek a végső oldatban nagyon kis mennyiségben (0,25-2%) vannak jelen. Mivel a vizes közeg a karotinoidszármazékok önszerveződését indukálja, a meghatározott TEAC értékek

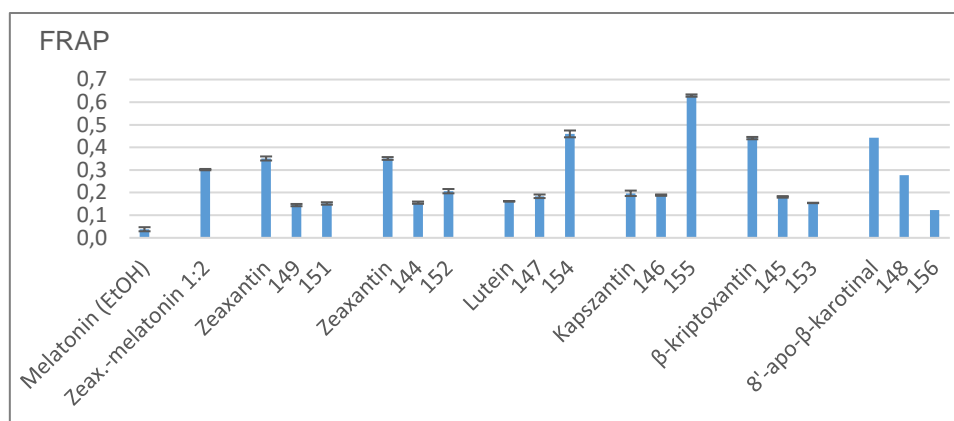
nagy valószínűséggel nem az egyes molekulákhoz, hanem azok aggregátumaihoz tartoznak (3.45. ábra).



3.45. ábra. Szukcinátok és melatonin-származékok TEAC értékei ABTS^{•+}-gyökkel ($p < 0.05$).

A lutein, a kapszantin és a 8'-apo-β-karotinol összes származéka magasabb antioxidáns aktivitást mutatott, mint a megfelelő kiindulási karotinoid. A karotinoidok hidrophil származékairól, például a szukcinátokról ismert, hogy általában magasabb antioxidáns hatást fejtenek ki vizes közegben, mint hidrofób kiindulási vegyületeik.⁴⁰ Érdekes módon kísérleteinkben a lutein, kapszantin és a 8'-apo-β-karotinol még inkább hidrofób melatonin-konjugátumai is kiemelkedő TEAC értékeket adtak. Ezen melatonin konjugátumok aggregátumainak hidrodinamikai átmérője (**153-155**) mutatta a legkisebb változást a koncentráció függvényében.

A FRAP módszer esetében az antioxidáns acetát-pufferben a Fe³⁺-t Fe²⁺-vé redukálja.¹²⁵ Itt is a troloxhoz viszonyítottuk az aktivitást, mint az ABTS teszteknel. A melatonin rendkívül alacsony antioxidáns kapacitást mutatott (3.46. ábra). A FRAP értékeket összehasonlítva, a lutein és a kapszantin melatonin konjugátumainak értékei kiugróak voltak, felülmúlva az összes többi karotinoidot. Ezekben az esetekben az antioxidáns kapacitás növekedése a melatonin és a karotinoid molekularészletek szinergizmusát mutatja. A többi karotinoid melatonin-származékainak antioxidáns aktivitása inkább csökkenést mutatott a natív karotinoidokéhoz képest.



3.46. ábra. Fe(III)-TPTZ használatával mért FRAP értékek ($p < 0.05$).

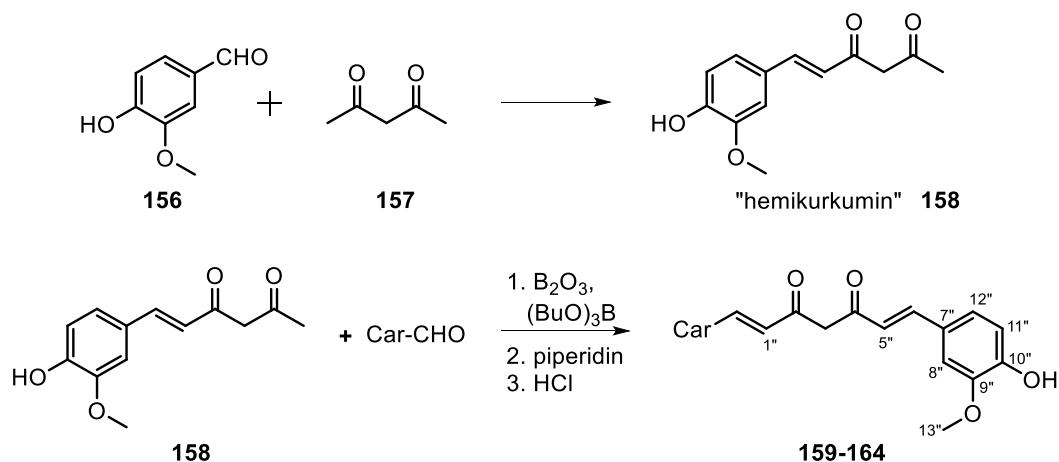
A melatonin konjugátumok erősen lipofilek, PAMPA méréseink szerint passzív módon nem tudnak felszívódni a bélből és átjutni a vér-agy gáton. A vizes közegben történő aggregáció azonban olyan nanorészecskék képződését eredményezi, amelyeket egyes sejtek (pl. makrofágok) fagocitózissal felvesznek, így elképzelhető, hogy a melatoninszármazékok mint hibrid/bifunkciós molekulák *in vivo* fejthetik ki teljes potenciáljukat például az oxidatív stressz elleni védelemben.

3.2.7. Karotinoid-kurkumin konjugátumok előállítás

A kurkumát évezredek óta terápiás szerként használja az emberiség. Fő színanyagáról, a kurkuminról kimutatták, hogy számos biológiai aktivitással rendelkezik, például antioxidáns, kardio- és neuroprotektív, antidiabetikus, antimikrobiális, maláriaellenes, HIV-ellenes, trombólis-szuppresszív, daganatellenes és kemopreventív hatású. A kurkuminnak sokféle molekuláris célpontja van, amiből következik pleiotróp hatása is,¹²⁶ egy kismolekula, amely számos biokémiai folyamatot befolyásolhat.¹²⁷ Érdekes megemlíteni, hogy a melatonint és a kurkumint egymással is összekapcsolták és neurodegeneratív betegségekben tanulmányozták a termék hatását.¹²⁸

A karotinoidok és a kurkumin előnyös tulajdonságai alapján feltételezhetjük, hogy a két molekula összekapcsolásával erős antioxidáns és/vagy egy eddig ismeretlen előnyös tulajdonságokkal rendelkező molekula keletkezik. A két molekula kombinálására két módszert választottunk: apokarotinoid-hemikurkumin hibridek szintézisét aldol kondenzációs reakcióval és észterezést karotinoid-szukcinátokkal.¹²⁹

Maga a kurkumin a vanillin (**156**) és az acetil-aceton (**157**) kondenzációjával szintetizálható. Hasonló reakcióban a „hemikurkumin” (**158**, (*E*)-6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)hex-5-én-2,4-dion) nagy mennyiségben állítható elő irodalmi eljárás segítségével.¹³⁰

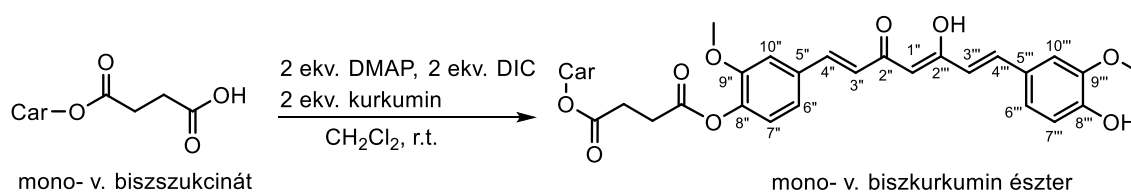


No.	Karotinoid-aldehyd (CAR-CHO)	hozam
159	<p>8'-apo-β-karotinal</p>	50 %
160	<p>12'-apo-β-karotinal</p>	45 %
161	<p>8'-apo-β-asztaxantinal</p>	44 %
162	<p>8'-apolikopinal</p>	46 %
163	<p>12,12'-apo-dialdehyd (C10-dial)</p>	39 %
164	<p>krocetindial</p>	kb. 30 %

3.47. ábra. Kurkuminhibridek szintézise karotinoid-aldehidekből

A hemikurkumin kondenzáltatható karotinoid-aldehidekkel (3.47. ábra). A karotinoid-aldehidek nem túl gyakoriak a természetben, viszont a karotinoidok (akár ipari méretű) totálszintézisének köztermékei, ezért viszonylag könnyen hozzáférhetőek. A hemikurkumint bór-komplex formában aktiválva a láncvégi hidrogének elég savasak lesznek ahhoz, hogy egyszerűen deprotonáljuk őket és lejátszódjon az aldol-addíció. A termékek mély lila színűek, mivel a konjugált lánc hossza jelentősen megnőtt a kapcsolással.

A karotinoidok és a kurkumin lehetséges szinergizmusának tesztelésére e kettő konjugátumainak szintézisét is megvalósítottuk: a már szokásos Steglich-típusú észterezéssel kapcsoltunk karotinoid-szukcinátokat kurkuminhoz, utóbbi minden reakcióban feleslegben volt jelen (3.48. ábra).



Karotinoid (Car-OH)	Termék (Kit.)
<p>8'-apo-β-karotinal</p>	165 monokurkumin (70%)
<p>zeaxantin</p>	166 biszszukcurkumin (81%)
<p>β-kriptoxantin</p>	167 monokurkumin (69%)
<p>kapszantin</p>	168 biszszukcurkumin (45%)
<p>lutein</p>	169 biszszukcurkumin (73%)

3.48. ábra. Kurkumin konjugátumok szintézise karotinoid mono- és biszszukcinátokból.

A reakciók jó kitermeléssel zajlottak, de a termékek általában hasonló R_f -értékkel rendelkeztek, mint a kurkumin, ezért az elválasztás csak preparatív vékonyrétegen volt lehetséges. Az elméleti bélhám- és vér-agy-gát penetrációs modellszámítások – hasonlóan a melatoninszármazékokhoz – itt is azt jósolták, hogy a termékek passzív transzpottal nem tudnak felszívódni, ezért kísérletes felszívódási vizsgálatokat (PAMPA) ezekben az esetekben nem végeztünk.

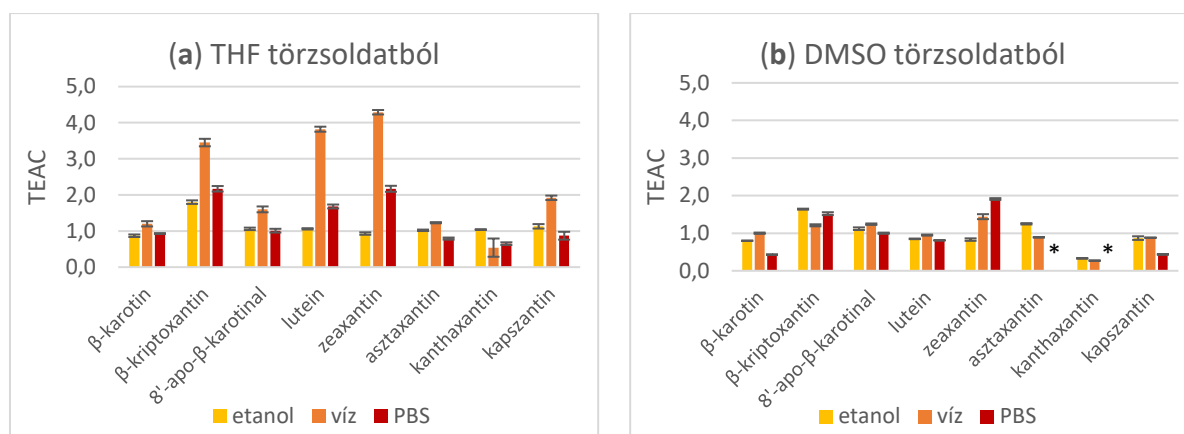
Minden előállított vegyület antioxidáns hatását és aggregációs hajlamát is megvizsgáltuk. Mint korábban láthattuk, az aggregációs viselkedés befolyásolja az antioxidáns hatást, ezért az ABTS-TEAC méréseket kétféle közegben, etanolban és foszfát-pufferben is elvégeztük. Míg etanolban aggregációval nem kell számolnunk, foszfát-pufferben nagy méretű (200-1000 nm-es) aggregátumok képződnek. A **165-169** szukcinát-észterek és a natív kurkumin etanolban hasonló TEAC-értékeket mutattak, függetlenül a kurkumin-egységek számától. Ezek a konjugátumok a zeaxantin kivételével, valamint a hemikurkumin hibridek (**159-164**) oldószerből függetlenül hatékonyabb antioxidánsnak bizonyultak, mint a kiindulási karotinoidek. A hemikurkumin hibridek esetében megállapítottuk, hogy oldószerből függetlenül a fenolos rész hozzájárulása az antioxidáns hatáshoz sokkal jelentősebb, mint a konjugált kettőskötések száma, az antioxidáns hatás arányos a hemikurkumin egységek számával.

3.2.8. Karotinoidek szupramolekuláris szerveződésének és antioxidáns hatásának komplex vizsgálata

Ahogy korábban láthattuk, a karotinoidek, hasonlóan egyéb lipofil molekulákhoz hajlamosak aggregálódni vizes közegben. Az aggregáció megváltoztatja az egyes karotinoidek fizikai és kémiai tulajdonságait, például a fényelnyelést, a reakcióképességet, az effektív méretet és az oldhatóságot. A karotinoidek antioxidáns tulajdonságainak becsléséhez igen gyakran használják az ABTS^{••} reagenssel meghatározott trolox-ekvivalens antioxidáns kapacitást (TEAC), ahogy mi is tettük sok származék esetén. Mivel ez a reagens ionvegyület, többnyire vizes oldatokban alkalmazzák, amelyekhez szerves oldószerben adják hozzá a karotinoideket. Az egyes karotinoidek oldhatóságától függően különféle szerves segédoldószereket használnak, nincs egységes eljárás a TEAC értékek meghatározására, így a különböző irodalmi TEAC értékek összehasonlítása meglehetősen nehézkes. Szisztematikus vizsgálatot végeztünk nyolc természetes karotinoidek TEAC mérésének oldószerfüggésével kapcsolatban, tanulmányoztuk az aggregáció és a TEAC értékek kapcsolatát, valamint a segédoldószer hatását az aggregációra (3.49. ábra).¹³¹

Az ABTS⁺-t etanolban, vízben és izotóniás foszfátpufferben (PBS, pH = 7,4) reagáltattuk a THF vagy DMSO segédoldószerben felvett karotinoidokkal. A reakcióelegyekben keletkező karotinoid aggregátumokat UV-látható, ECD- és dinamikus fényszórás fotometriával, valamint pásztázó elektronmikroszkópiával vizsgáltuk.

Etanolos közegben nem tapasztaltunk aggregációt, a mért TEAC értékek a különböző segédoldószerben hasonlóak voltak. Ezzel szemben vizes közegben a karotinoidok jellegzetes aggregációs viselkedést produkáltak, amely szignifikáns hatással volt az antioxidáns viselkedésre is (3.50. ábra).

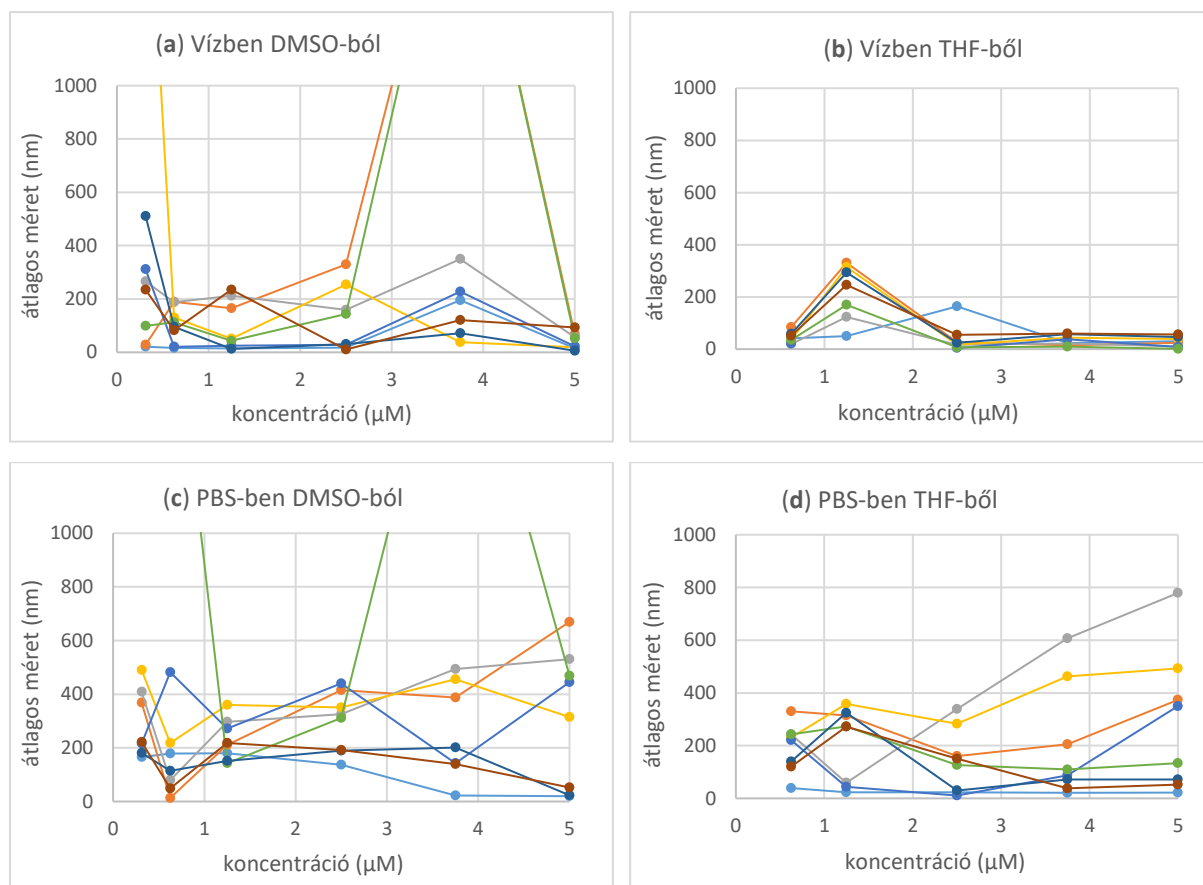


3.49. ábra. TEAC-értékek függése a segédoldószerrel. *Nem határozható meg.

Az UV-vis és ECD spektrumaik alapján a DMSO törzsoldatból származó karotinoidok jellemzően H-típusú aggregátumokat eredményeztek, míg a THF törzsoldatból kiindulva mind H-, mind J-, ill. kevert típusú aggregátumok is kimutathatók voltak. Az aggregátumok hidrodinamikai átmérőjét vizsgálva (3.50. ábra) a PBS-ben a képződött részecskék mérete legalább kétszerese, egyes esetekben még nagyobb is volt, mint a vízben képződöttek, függetlenül a segédoldószerrel. A karotinoidok általában kisebb méretű aggregátumokat és magasabb TEAC-értékeket adtak a THF/PBS oldószerben, mint a DMSO/PBS-ben (3.49. és 3.50. ábra). Az aggregáció típusa (J/H) láthatólag kevésbé volt hatással az antioxidáns viselkedésre, mint az aggregátumok mérete.

Érdekes módon a vizes rendszerekben kapott TEAC értékek a legtöbb vegyület esetén magasabbak voltak, mint etanolban, különösen a 3-hidroxi-β-végcsoporttal rendelkező molekulák adtak kiugróan magas TEAC értéket THF törzsoldatból tiszta vízben. Ebben a rendszerben viszonylag egységes, kis méretű (< 50 nm) aggregátumok keletkeztek. Bár az aggregálódott karotinoidok nyilvánvalóan kevésbé hozzáférhetőek az ABTS számára, a kísérleteink azt mutatják, hogy bizonyos mértékű aggregáció mégis elősegítheti a reakciót.

Ennek háttérében az állhat, hogy a közeli karotinoidmolekulák között hatékony elektronátadás valósulhat meg, a $\text{Kar}^{+}/(\text{Kar})_n$ rendszer oxidációs potenciálja alacsony n értékeknél jóval magasabb lehet, mint a $\text{Kar}^{+}/\text{Kar}$ rendszeré. A 10-20 nm-es méretű, 5-7 molekulát tartalmazó részecskék tűnnek optimálisnak a magas oxidációs potenciál és a fokozott antioxidáns aktivitás szempontjából.



3.50. ábra. Aggregátumok hidrodinamikai átmérőjének meghatározása DLS-sel különböző koncentrációknál (a) DMSO törzsoldatból vízben, (b) THF törzsoldatból vízben, (c) DMSO törzsoldatból PBS-ben, (d) THF törzsoldatból PBS-ben. Színek: **β-karotin**, **β-kriptoxantin**, **8'-apo-β-karotinal**, **lutein**, **zeaxantin**, **asztaxantin**, **cantaxantin**, **kapszantin**.

A vizes közegben mért TEAC értékek tehát nem az egyes molekulákat, hanem az azokból kialakuló kolloid rendszereket jellemzik, amelyek szerkezete (részecskemérete) erősen függ az előállítás módjától. A különböző segédoldószerek még azonos főoldószerekben is befolyásolják az aggregáció folyamatát.

Az ABTS-TEAC mérések egységesítése érdekében néhány ajánlást is megfogalmaztunk a fentiek alapján. Ha az egyedi molekulák antioxidáns viselkedésére vagyunk kíváncsiak, etanolban célszerű mérni, ekkor a segédoldószerek érdemben nem

befolyásolja az eredményeket. Bár a DMSO/PBS rendszer tűnik leginkább biológiailag relevánsnak, a karotinoidok egy részénél (általában a keto-származékoknál) nem használható ez az oldószerkombináció, mert a PBS-es hígításkor kicsapódnak, vagy nem reprodukálható eredményeket adnak. THF segédoldószert használva nincs ilyen probléma (THF/PBS rendszer) és az aggregátumok mérete sok esetben hasonló, mint a DMSO/PBS rendszer esetén. Mivel a valódi biológiai rendszerekben sok egyéb anyag jelenléte további hatással lehet a karotinoidok aggregációjára, az egyszerű PBS-ben mért TEAC értékek véleményünk szerint nem relevánsak az *in vivo* antioxidáns viselkedés jellemzésére. Mindazonáltal, kontrollált mintakészítéssel az ABTS-módszer vizes közegben alkalmas lehet karotinoid nanorészecskék antioxidáns tulajdonságainak vizsgálatára.

3.2.9. Sejtvonalakon végzett *in vitro* antioxidáns vizsgálatok

A karotinoidok gyökfogó hatása jól vizsgálható a RAW264.7 egér makrofág sejtvonalon, amely gyors proliferációja és könnyű kezelhetősége miatt nagyon népszerű, és gyakran használják gyulladási modellként. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelése a gyulladási makrofágok indukciójának egyik legfontosabb jele, ezért a ROS szintjét bakteriális lipopoliszacharid (LPS)-indukált és karotinoiddal kezelt makrofág sejtekben mértük. Bár egy-egy karotinoid ROS gátlását korábban is leírták, akárcsak az ABTS-TEAC esetében, ebben sincs egységes protokoll, ezért összehasonlító vizsgálatot végeztünk a természetes karotinoidok valamint a szintetikus származékok hatásairól.

A kezelés során egyik származék sem fejtett ki citotoxikus hatást a sejtekre. Valamennyi felhasznált karotinoid ígéretes ROS-szint csökkenést mutatott, de a ROS-koncentráció csökkenése erősen függött a karotinoid koncentrációjától. A karotinoidokat 10 μM koncentrációban összehasonlítva az asztaxantin csökkentette a leghatékonyabban a ROS szintet, körülbelül 30 %-kal. A zeaxantinnal, kapszantinnal, illetve 8'-apo- β -karotinnal kezelt, LPS-aktivált makrofág sejtekben körülbelül 20 %-os ROS-koncentráció csökkenést figyeltünk meg, míg a lutein és a β -kriptoxantin csak körülbelül 10 %-os csökkenést mutatott. A szukcinátok közül 10 μM koncentrációban a kapszantin-biszsukcinát kiemelkedő, 37 %-os ROS-szint csökkenést mutatott, míg az asztaxantin-biszsukcinát csak a második legjobb gyökfogó volt 30 % körüli ROS-csökkenéssel. A zeaxantin-biszsukcinát és a β -kriptoxantin-szukcinát körülbelül azonos, 20 %-os csökkenést eredményezett, míg a 8'-apo- β -karotin-szukcinát és a lutein-biszsukcinát bizonyult a leggyengébb gyökfogónak az LPS-sel kezelt

makrofágsejtekben. A szukcinilezés a vártnak megfelelően szignifikánsan növelte a gyökfogó képességet, leginkább a kapszantin-biszsukcinát esetében.

A karotinoidok gyulladáscsökkentő hatását tovább vizsgáltuk az NF- κ B gátlás és a gyulladással kapcsolatos citokinek csökkentése tekintetében. Ezekhez a kísérletekhez a luteint, a lutein-biszsukcinátot, a kapszantint és a kapszantin-biszsukcinátot választottunk, mint legjobb ROS-inaktivátorokat. Azonban eddigi eredményeink alapján egyik alkalmazott karotinoid sem tudta gátolni az NF- κ B aktivációt és csökkenteni a gyulladással kapcsolatos citokinek mennyiségét a makrofágok aktiválásakor. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a karotinoidok elsősorban mint primer gyökfogók töltenek be hatékony védőfunkciót.

4. Összefoglalás és az eredmények hasznosítása

A dolgozatomban az elmúlt 20 évben a PTE ÁOK Karotinoidkémiai Kutatócsoportban végzett projektekről adtam számot. A nagy hagyományokkal rendelkező csoport új lendületet kapott, amikor néhány fiatal kutató csatlakozott hozzá 2005 körül. A hagyományos, elsősorban izolálással kapcsolatos munkát többen elsajátítottuk és tovább is fejlesztettük, valamint a saját előképzettségünknek megfelelően a szerves szintézist is előtérbe helyeztük és eleinte kevesebb, később több sikerrel alkalmaztuk karotinoidszármazékok előállítására.

A karotinoidokkal kapcsolatos szerteágazó vizsgálódásaink során az alábbi eredményeket értük el:

1. Meghatároztuk a mamey (*Pouteria sapote*) karotinoid-összetételét, a HPLC-n megkülönböztethető csaknem 50 komponens nagy részét azonosítottuk. A csúcsok többsége kappa végcsoporttal rendelkező karotinoidokhoz tartozott.
2. A rendkívül összetett mamey extraktumot többlépéses kromatográfiával alkotórészeire bontottunk, számos addig ismeretlen, dezoxi-kappa végcsoportot tartalmazó karotinoidot (szapotexantin, dezoxi-kapszorubin, didezoxi-kapszorubin, 3'-dezoxi-kapszantin) izoláltunk, illetve azok epoxidjait, *cisz*-izomereit írtuk le és jellemeztük spektroszkópiai módszerekkel.
3. A mamey karotinoid-összetétele és az előforduló karotinoidok koncentrációja alapján kiegészítettük a karotinoidok bioszintetikus sémáját és elhelyeztük abban az újonnan felfedezett dezoxi κ -karotinoidokat.
4. Magas kapszorubintartalmú trópusi növényeket találtunk, amelyek közül a *Carludovica palmata*-nak és a *Zamia dressleri*-nek a karotinoid-összetételét is meghatároztuk. Ez utóbbi zamia faj levelei barnán bújnak elő és csak több hónap alatt válnak zölddé. Ezt az érdekes jelenséget is leírtuk és megmagyaráztuk.
5. Vizsgáltuk különböző citrusfélék – különösen a kumquat – héjának és húsának karotinoid-összetételét, ami élelmiszeripari szempontból is fontosnak bizonyult és a hivatkozások szerint egy referenciamunkának tekinthető ezen a területen.
6. Az epoxi-karotinoidok elválasztására a kereskedelmi forgalomban lévónél olcsóbb, enyhén lúgos szilikagélt fejlesztettünk ki (Silica-9), amit azóta is használunk nagyobb mennyiségű karotinoid-extraktumok tisztítására.

7. Szentesi sárga paradicsompaprikából sikerült izolálnunk nagyobb mennyiségű (1-2 mg) lutoxantint, amely egy 3,5,6-trihidroxi- β -végcsoporttal is rendelkező epoxi-karotinoid. Más trihidroxi-karotinoidokkal is összehasonlítva meghatároztuk a hidroxilcsoportok konfigurációját és magyarázatot adtunk ezen vegyületek természetes keletkezésére.

8. Meghatároztuk számos gyógynövény teljes karotinoid-összetételét. Ezek közül a *Telekia speciosa* különösen érdekes volt, mert sok β -karotin-5,6-epoxidot és β -karotin-5,6,5',6'-diepoxidot találtunk benne, ami nagyon ritkán fordul elő növényekben, általában továbbalakulnak.

9. A lutein a szem és az agy egészséges működéséhez elengedhetetlen karotinoid. Megvizsgáltuk 20 növény virágának luteintartalmát. Ezek a virágok különösen sok (9Z)-, (9'Z)- és (13Z)-, (13'Z)-lutein izomert tartalmaztak, néha szokatlan karotinoid-összetétel mellett. A *cisz*-izomerek általában jobban felszívódnak és antioxidáns hatásuk is nagyobb lehet. A *Calendula officinalis*-ban viszonylag sok 5,8-epoxi-karotinoidot találtunk, amelyek analízisekor kiderült, hogy egyes epoxidok konfigurációjának megadása helytelen az irodalomban, így ezt is javítottuk.

10. Vizsgáltuk a lutein, a 3'-epilutein és az oxolutein védőhatását idegsejtekre a glutamát által kiváltott oxidatív stresszben és hatásukat a sejtek vas anyagcseréjére és a lipidperoxidációra. Mindegyik karotinoid kimutatható védőhatást mutatott, különösen a 3'-epilutein.

11. Magyarországon is honos, különböző taxonómiájú algafajok karotinoid-összetételét vizsgáltuk. A *Dunaliella salina*, az *Euglena sanguinea* és a *Nostoc sp.* is nagy mennyiségű karotinoidot tartalmazott, de nagyon különbözőeket: a *Dunaliellában* lutein, az *Euglenában* a ritka diatoxantin, a *Nostoc*-ban az echinenon volt a fő karotinoid.

12. Egy további cianobaktérium, a *Cylindrospermopsis raciborskii* karotinoid-összetételét is megvizsgáltuk. Izolálást és származékképzést követően spektroszkópai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a 2-hidroxi-(3R,2'S)-mixol-2'- α -L-fukozid a fő összetevő, amelyet korábban csak nagyon minor komponensként izoláltak egy termofil cianobaktériumból.

13. Az antioxidáns hatás növelésének céljából karotinoid-dimer és trimer észtereket állítottunk elő két- és háromértékű aromás és alifás savakból hidroxikarotinoidok acilezésével. Két- és háromértékű aromás alkoholokkal is sikerült karotinoid-észtereket képezni, ehhez karotinoid-szukcinátokat használtunk fel.

14. Elsőként kapcsoltunk kovalensen polietilén-glikolokat karotinoidokhoz. A karotinoid-szukcinátok PEG-észterei sokkal jobban oldódtak vízben, mint a szukcinátok, a vízdoldhatóság

a PEG-tartalommal nőtt, ám csak a két hosszabb PEG-láncot tartalmazó mPEG550 származékok mutattak valódi vízoldhatóságot. Szerkezetileg legérdekesebbek azok a “szélkerék”-trimerek, melyek a korábban előállított karotinoid-trimerekre hasonlítanak, de egy TEG v. OEG összekötő elem is található bennük.

15. Először végeztünk azid-alkin klikk-reakciók karotinoidokkal. A fenti PEG-származékhoz hasonló triazolokat állítottunk elő PEG-azidból és karotinoid-pentinoátokból a kiindulási anyagok és a reakciókörülmények optimalása után közepes kitermeléssel. A karotinoid-pentinoátokat a továbbiakban is használtuk klikk-reakciókban.

16. Hidrolitikusan stabil karotinoid-cisztein tioéter konjugátumot állítottunk elő úgy, hogy izo-zeaxantinból trifluor-ecetsavval dikationt képeztünk és azt *N*-acetyl-ciszteinnel reagáltattuk, ami elsősorban a nukleofilebb tiol-csoportjával reagált. Az így kapott aminosav adduktum emberi májsejtenyésztésben hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stresszben enyhe védőhatást mutatott.

17. A karotinoidok savak hatására történő jellegzetes kationképzését kihasználva tioglikozidokat állítottunk elő izo-zeaxantinból és β -karotinból kiindulva. Bár a védőcsoportok eltávolítása több módszerrel sem sikerült, a kidolgozott módszerrel megvalósítottuk a termoxantin-mimetikumok szintézisének kulcs lépését, és nagyon hatékonyan, egy lépésben tudtuk a könnyen hozzáférhető kiindulási karotinoidokat glikoziddá alakítani.

18. Karotinoid-glikozidok előállítására az irodalomban csak a kevésbé hatékony klasszikus Königs-Knorr reakció volt ismert, ezért modernebbnek tekinthető módszerek alkalmazását is megvizsgáltuk. Triklór-acetimidát donorral megfelelő katalizátor használatával azokat a hidroxikarotinoidokat sikerült glikozilezni, amelyek nem allil- vagy homoallil hidroxilcsoportot tartalmaztak, azok ugyanis a savkatalizátor hatására bomlottak. Érdekes módon a Ferrier-reakció klasszikus körülményei között (bór-trifluorid-éteráttal) sikerült bisz-dezoxi-glikozidokat előállítani kapszantinból és zeaxantinból triacetyl-glükállal. A védőcsoportok eltávolítása itt sem járt sikerrel.

19. Mivel cukrokból rutinszerűen készíthető glikozil-azid, kézenfekvő volt ezeket a már előállított karotinoid-pentinoátokkal reagáltatni klikk-reakcióban. Ebben az esetben az egyszerű réz(I)-sók nem működtek, viszont bisz-trifenilfoszfano-réz(I)-butirát komplexszel nagyon jó kitermeléssel játszódtak le a reakciók még védetlen cukrokkal is, így akár egy lépésben is hidrofil karotinoid-monoszacharid konjugátumokat kaphattunk. A védetlen L-aszkorbinsav 6-azidját is előállítottuk és reagáltattuk pentinoátokkal.

20. Karotinoid-flavonoid konjugátumokat állítottunk elő úgy, hogy a daizeint és a krizint egy összekötő elemmel azido-csoporttal láttuk el és ezeket kapcsoltuk karotinoid-pentinoátokhoz. Tanulmányoztuk a termékek antioxidáns hatását és az ezzel összefüggő aggregációs viselkedésüket. A zeaxantin és kapszantin konjugátumoknál nőtt szignifikánsan az antioxidáns hatás, de míg a zeaxantin származékok különböző aggregátumokat képeztek, a kapszantinál nem volt ilyen megfigyelhető.

21. Teikoplaninból, annak pszeudoaglikonjából és a rokon risztocetin-aglikonból új lipofil apokarotinoid-glikopeptid konjugátumokat készítettünk. A vírusellenes hatást SARS-CoV-2 ellen teszteltük Vero E6 sejtekben sejttéletképességi vizsgálattal, és vírus-RNS kvantitatív PCR-rel megerősítve a vírusreprodukció elleni mikromoláris gátló hatásukat. Érdekes módon a kiindulási apokarotinoidok közül a bixin és a 8'- β -apo-karotinsav önmagában is figyelemreméltó SARS-CoV-2 elleni aktivitást fejtett ki. A glikopeptid konjugátumok gátolták az összes vizsgált vírus proteázt, míg az apokarotinoidok főként katepszin B és L affinitással rendelkeztek.

22. Az önmagában is pleiotróp hatású melatonin amidszármazékával karotinoid-konjugátumokat állítottunk elő a szinergikus hatás reményében. Két módszerrel mértünk antioxidáns hatást (ABTS és FRAP): a lutein és a kapszantin-szukcinátjai, valamint melatonin-konjugátumai is jóval magasabb értéket mutattak, mint a kiindulási anyagok, a többi karotinoidnál nem volt ilyen egyértelmű tendencia. Vizsgáltuk a termékek aggregációját is vizes oldatban. A melatonin-származékok általában 10-200 nm közötti aggregátumokból álló stabil kolloidokat képeznek.

23. A melatoninhoz hasonlóan a kurkuminből is készítettük konjugátumokat karotinoid-szukcinátok felhasználásával. Kurkumin-karotinoid hibrideket is előállítottunk apokarotinoid-aldehidek és hemikurkumin aldol kondenzációjával. Ezen vegyületek egyik oldala kurkuminszerű, míg a másik karotinoid, így igen hosszú konjugált kettőskötés rendszerrel rendelkeznek. Minden előállított vegyület antioxidáns hatását és aggregációs hajlamát is megvizsgáltuk.

24. Mivel a karotinoidok ABTS mérésére az irodalomban nem található sztenderd protokoll, és a korábbi tapasztalataink alapján sokszor történik aggregáció karotinoidszármazékok vizes oldatában, szisztematikus vizsgálatot végeztünk 8 karotinoid TEAC mérésének oldószer- és koncentrációfüggésére, megvizsgáltuk az aggregáció és a TEAC értékek kapcsolatát is. A keletkező aggregátumok méretét nagyban befolyásolja az alkalmazott oldószer minősége és a kiindulási karotinoidkoncentráció. Méréseink alapján bizonyos méretű (néhány molekulát

tartalmazó) aggregátumok képződése jelentősen megnöveli az antioxidáns kapacitást, míg annál nagyobbak esetében az értékek elvárt csökkenése tapasztalható.

25. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelése a gyulladásoz makrofágok indukciójának egyik legfontosabb jele, ezért a ROS szintjét LPS-indukált és karotinoiddel kezelt makrofág sejtekben mértük. Bár több karotinoid ROS gátlását is mérték korábban, a miénkhez hasonlító összehasonlító vizsgálatot nem végeztek, illetve mi a karotinoid-szukcinátokat is bevontuk a vizsgálatba. A lutein, a kapszantin és szukcinátjaik mutatták a legjobb védőhatást.

26. A karotinoidok, ill. a karotinoid-szukcinátok vízoldhatósága általában nem megfelelő orvosi alkalmazásokhoz, viszont ciklodextrinbe (RAMEB) zárva már *in vivo* is alkalmazhatónak tűnik szemcseppként. Ezzel kapcsolatos – *ex vivo* felszívódási – vizsgálatokat végeztünk a Semmelweis Egyetemmel kooperációban lutein- és zeaxanthin-biszszukcináttal.

Kutatásunk alap kutatás, így az eredmények közvetlenül nem hasznosíthatók a legtöbb esetben. Az izolált vegyületek vagy az általunk használt reakciók eredményeként kapott hidrofíl származékok és más konjugátumok további fejlesztés, formulálás után alkalmasak lehetnek élelmiszeripari (színezék vagy biofortifikáció) vagy gyógyászati felhasználásra is, mint azt a fenti szemcseppes példa is mutatja. A konjugátumok közül egyes cukorszármazékok a természetben is előfordulnak, de természetes forrásból való izolálásuk nem gazdaságos, így a szintetikus előállítás teszi lehetővé a további biológiai vizsgálatokat. Az általunk kutatott (és részben felfedezett) kappa-végcsoportot tartalmazó karotinoidok élettani hatásait eddig kevésbé vizsgálták, sok hatásuk erőteljesebb lehet, mint a β -végcsoportot tartalmazó karotinoidoké, így ezen a területen még elég nagy a potenciál. Miután felfedeztük, hogy a vadon élő mamey nagyon jó A-provitamin forrás, a jövőben e gyümölcs fogyasztása fontos lehet a jellemzően A-vitamin hiányos közép-amerikai népességnél.

Különösen érdekes megfigyelésünk, hogy a karotinoidok kis mértékű aggregációja igen jelentősen megnöveli az egyelektron-átmenetes mechanizmus szerinti antioxidáns kapacitást. Ezt a jelenséget az alkalmazott anyagtudományi kutatásokban tovább hasznosíthatják, és akár a mesterséges fotoszintézisben, vagy egyéb nanotechnológiai alkalmazásokban felhasználhatják.

Bár sejttenyészet szinten már mi is végeztünk vagy végeztettünk biológiai vizsgálatokat sok új származékkal, itt még távol vagyunk a konkrét alkalmazásuktól.

5. Irodalomjegyzék

1. (a) Saini, R. K.; Nile, S. H.; Park, S. W., Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Res Int* **2015**, *76*, 735-750; (b) Reboul, E., Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins. *Nutrients* **2013**, *5* (9), 3563-3581.
2. During, A.; Hussain, M. M.; Morel, D. W.; Harrison, E. H., Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: β -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J Lipid Res* **2002**, *43* (7), 1086-1095.
3. Clevidence, B. A.; Bieri, J. G., Association of Carotenoids with Human Plasma-Lipoproteins. *Method Enzymol* **1993**, *214*, 33-46.
4. Stahl, W.; Ale-Agha, N.; Polidori, M. C., Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem* **2002**, *383* (3-4), 553-558.
5. Fiedor, J.; Burda, K., Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* **2014**, *6* (2), 466-488.
6. Edge, R.; Truscott, G., Properties of Carotenoid Radicals and Excited States and Their Potential Role in Biological Systems. *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties* **2010**, 283-307.
7. El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortensen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. G.; Young, A. J., Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* **2004**, *430* (1), 37-48.
8. Mortensen, A.; Skibsted, L. H.; Sampson, J.; RiceEvans, C.; Everett, S. A., Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *Febs Lett* **1997**, *418* (1-2), 91-97.
9. Schwartz, J. L.; Singh, R. P.; Teicher, B.; Wright, J. E.; Trites, D. H.; Shklar, G., Induction of a 70kd Protein Associated with the Selective Cytotoxicity of Beta-Carotene in Human Epidermal Carcinoma. *Biochem Bioph Res Co* **1990**, *169* (3), 941-946.
10. Karas, M.; Amir, H.; Fishman, D.; Danilenko, M.; Segal, S.; Nahum, A.; Koifmann, A.; Giat, Y.; Levy, J.; Sharoni, Y., Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* **2000**, *36* (1), 101-111.
11. Nara, E.; Hayashi, H.; Kotake, M.; Miyashita, K.; Nagao, A., Acyclic carotenoids and their oxidation mixtures inhibit the growth of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Nutr Cancer* **2001**, *39* (2), 273-283.
12. Kotake-Nara, E.; Kushiro, M.; Zhang, H.; Sugawara, T.; Miyashita, K.; Nagao, A., Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr* **2001**, *131* (12), 3303-3306.
13. Gloria, N. F.; Soares, N.; Brand, C.; Oliveira, F. L.; Borojevic, R.; Teodoro, A. J., Lycopene and Beta-carotene Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res* **2014**, *34* (3), 1377-1386.
14. Lu, P. W.; Lin, H.; Gu, Y. T.; Li, L.; Guo, H.; Wang, F.; Qiu, X. G., Antitumor effects of crocin on human breast cancer cells. *Int J Clin Exp Med* **2015**, *8* (11), 20316-20322.
15. Kim, J. E.; Leite, J. O.; deOgburn, R.; Smyth, J. A.; Clark, R. M.; Fernandez, M. L., A Lutein-Enriched Diet Prevents Cholesterol Accumulation and Decreases Oxidized LDL and Inflammatory Cytokines in the Aorta of Guinea Pigs. *J Nutr* **2011**, *141* (8), 1458-1463.
16. Ciccone, M. M.; Cortese, F.; Gesualdo, M.; Carbonara, S.; Zito, A.; Ricci, G.; De Pascalis, F.; Scicchitano, P.; Riccioni, G., Dietary Intake of Carotenoids and Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in Cardiovascular Care. *Mediat Inflamm* **2013**, 2013.
17. Vivekananthan, D. P.; Penn, M. S.; Sapp, S. K.; Hsu, A.; Topol, E. J., Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **2003**, *361* (9374), 2017-2023.
18. Cho, E. Y.; Hankinson, S. E.; Rosner, B.; Willett, W. C.; Colditz, G. A., Prospective study of lutein/zeaxanthin intake and risk of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* **2008**, *87* (6), 1837-1843.

19. Sharoni, Y.; Linnewiel-Hermoni, K.; Khanin, M.; Salman, H.; Veprik, A.; Danilenko, M.; Levy, J., Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Mol Nutr Food Res* **2012**, *56* (2), 259-269.
20. Alvarez, R.; Vaz, B.; Gronemeyer, H.; de Lera, A. R., Functions, Therapeutic Applications, and Synthesis of Retinoids and Carotenoids. *Chem Rev* **2014**, *114* (1), 1-125.
21. Nishino, A.; Yasui, H.; Maoka, T., Reaction of Paprika Carotenoids, Capsanthin and Capsorubin, with Reactive Oxygen Species. *J Agr Food Chem* **2016**, *64* (23), 4786-4792.
22. Murillo, E.; Nagy, V.; Agócs, A.; Deli, J., Carotenoids with κ -end group. In *Carotenoids: Food Sources, Production and Health Benefits*, Yamaguchi, M., Ed. Nova Science Publishers Inc.: 2013; pp 49-78.
23. Hassan, N. M.; Yusof, N. A.; Yahaya, A. F.; Rozali, N. N. M.; Othman, R., Carotenoids of Capsicum Fruits: Pigment Profile and Health-Promoting Functional Attributes. *Antioxidants-Basel* **2019**, *8* (10).
24. Fraser, P. D.; Bramley, P. M., The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **2004**, *43* (3), 228-265.
25. Bouvier, F.; Huguency, P.; Dharlingue, A.; Kuntz, M.; Camara, B., Xanthophyll Biosynthesis in Chromoplasts - Isolation and Molecular-Cloning of an Enzyme Catalyzing the Conversion of 5,6-Epoxycarotenoid into Ketocarotenoid. *Plant J* **1994**, *6* (1), 45-54.
26. Rodriguez-Amaya, D. B., *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI PRESS: Washington D.C., USA, 2001.
27. Saini, R. K.; Keum, Y. S., Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem* **2018**, *240*, 90-103.
28. Nagy, V.; Murillo, E.; Deli, J.; Agócs, A., Isolation and analysis of carotenoids with κ -end group. In *Carotenoid Analysis*, Melendez-Martinez, A. J., Ed. Springer: 1 New York Plaza, New York, NY 10004, U.S.A., publication date: 2025, July 25th.
29. Turcsi, E.; Nagy, V.; Deli, J., Study on the elution order of carotenoids on endcapped C-18 and C-30 reverse silica stationary phases. A review of the database. *J Food Compos Anal* **2016**, *47*, 101-112.
30. Murillo, E., Far UV peaks contribute for identification of carotenoids E/Z isomers. *J Food Compos Anal* **2018**, *67*, 159-162.
31. *Carotenoids Volume 1A: Structure and Isolation*. Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 1995; Vol. 1A.
32. *Carotenoids Volume 2: Synthesis*. Birkhauser Verlag: Basel, 1996; Vol. 2.
33. (a) Ito, M.; Yamano, Y.; Tode, C.; Wada, A., Carotenoid synthesis: Retrospect and recent progress. *Arch Biochem Biophys* **2009**, *483* (2), 224-228; (b) Yamano, Y.; Tode, C.; Wada, A.; Ito, M., Biomimetic Type Total Syntheses of Carotenoids via Regiocontrolled Oxirane-Ring Cleavage. *J Syn Org Chem Jpn* **2015**, *73* (2), 161-170.
34. Kim, S. B.; Kim, H.; Lim, B.; Meang, J.; Bae, S. H.; Choi, E.; Oh, J. T.; Hong, I.; Jung, S. Y.; Yeo, J. E.; Koo, S., Convergent synthesis of new types of stabilized carotenoid compounds. *Pure Appl Chem* **2011**, *83* (3), 613-620.
35. Kodis, G.; Liddell, P. A.; Moore, A. L.; Moore, T. A.; Gust, D., Synthesis and photochemistry of a carotene-porphyrin-fullerene model photosynthetic reaction center. *J Phys Org Chem* **2004**, *17* (9), 724-734.
36. Sliwka, H. R. P., V., Syntheses with Carotenoids. In *Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology*, Kaczor, A. B., M., Ed. John Wiley & Sons: 2016; pp 261-289.
37. Nagy, V.; Deli, J.; Agócs, A., Chemical Synthesis of Carotenoid Esters. In *Carotenoid Esters in Foods*, Mercadante, A. Z., Ed. RSC Publishing: 2019; pp 68-107.
38. dos Santos, P. P.; Andrade, L. D.; Flores, S. H.; Rios, A. D., Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. *J Food Sci Tech Mys* **2018**, *55* (10), 3851-3860.
39. Hada, M.; Nagy, V.; Deli, J.; Agocs, A., Hydrophilic Carotenoids: Recent Progress. *Molecules* **2012**, *17* (5), 5003-5012.

40. Sliwka, H. R.; Melo, T. B.; Foss, B. J.; Abdel-Hafez, S. H.; Partali, V.; Nadolski, G.; Jackson, H.; Lockwood, S. E., Electron- and energy-transfer properties of hydrophilic carotenoids. *Chem-Eur J* **2007**, *13* (16), 4458-4466.
41. Szente, L.; Mikuni, K.; Hashimoto, H.; Szejtli, J., Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *J Includ Phenom Mol* **1998**, *32* (1), 81-89.
42. Lyng, S. M.; Passos, M.; Fontana, J. D., Bixin and alpha-cyclodextrin inclusion complex and stability tests. *Process Biochem* **2005**, *40* (2), 865-872.
43. Horvath, G.; Szoke, E.; Kemeny, A.; Bagoly, T.; Deli, J.; Szente, L.; Pal, S.; Sandor, K.; Szolcsanyi, J.; Helyes, Z., Lutein Inhibits the Function of the Transient Receptor Potential A1 Ion Channel in Different In Vitro and In Vivo Models. *J Mol Neurosci* **2012**, *46* (1), 1-9.
44. Polyakov, N. E.; Kispert, L. D., Water soluble biocompatible vesicles based on polysaccharides and oligosaccharides inclusion complexes for carotenoid delivery. *Carbohydr Polym* **2015**, *128*, 207-219.
45. Frey, D. A.; Kataisto, E. W.; Ekmanis, J. L.; O'Malley, S.; Lockwood, S. F., The efficient synthesis of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax). *Org Process Res Dev* **2004**, *8* (5), 796-801.
46. Lauver, D. A.; Booth, E. A.; White, A. J.; Lockwood, S. F.; Lucchesi, B. R., Cardax (TM) (disodium disuccinate astaxanthin) attenuates inflammation and myocardial injury following ischemia/reperfusion. *Faseb J* **2005**, *19* (4), A533-A533.
47. Hix, L. M.; Frey, D. A.; McLaws, M. D.; Osterlie, M.; Lockwood, S. F.; Bertram, J. S., Inhibition of chemically-induced neoplastic transformation by a novel tetrasodium diphosphate astaxanthin derivative. *Carcinogenesis* **2005**, *26* (9), 1634-1641.
48. Jackson, H. L.; Cardounel, A. J.; Zweier, J. L.; Lockwood, S. F., Synthesis, characterization, and direct aqueous superoxide anion scavenging of a highly water-dispersible astaxanthin-amino acid conjugate. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14* (15), 3985-3991.
49. Foss, B. J.; Nadolski, G.; Lockwood, S. F., Hydrophilic carotenoid amphiphiles: Methods of synthesis and biological applications. *Mini-Rev Med Chem* **2006**, *6* (9), 953-969.
50. (a) Foss, B. J.; Sliwka, H. R.; Partali, V.; Naess, S. N.; Elgsaeter, A.; Melo, T. B.; Naqvi, K. R.; O'Malley, S.; Lockwood, S. F., Hydrophilic carotenoids: surface properties and aqueous aggregation of a rigid, long-chain, highly unsaturated dianionic bolaamphiphile with a carotenoid spacer. *Chem Phys Lipids* **2005**, *135* (2), 157-167; (b) Popplewell, L. J.; Abu-Dayya, A.; Khanna, T.; Flinterman, M.; Khalique, N. A.; Raju, L.; Opstad, C. L.; Sliwka, H. R.; Partali, V.; Dickson, G.; Pungente, M. D., Novel Cationic Carotenoid Lipids as Delivery Vectors of Antisense Oligonucleotides for Exon Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecules* **2012**, *17* (2), 1138-1148; (c) Foss, B. J.; Nalum Naess, S.; Sliwka, H. R.; Partali, V., Stable and highly water-dispersible, highly unsaturated carotenoid phospholipids - Surface properties and aggregate size. *Angew Chem Int Edit* **2003**, *42* (42), 5237-5240.
51. Breukers, S.; Opstad, C. L.; Sliwka, H. R.; Partali, V., Hydrophilic Carotenoids: Surface Properties and Aggregation Behavior of the Potassium Salt of the Highly Unsaturated Diacid Norbixin. *Helv Chim Acta* **2009**, *92* (9), 1741-1747.
52. Willibald, J.; Rennebaum, S.; Breukers, S.; Hafez, S. H. A.; Patel, A.; Opstad, C. L.; Schmid, R.; Naess, S. N.; Sliwka, H. R.; Partali, V., Hydrophilic carotenoids: facile syntheses of carotenoid oxime hydrochlorides as long-chain, highly unsaturated cationic (bola)amphiphiles. *Chem Phys Lipids* **2009**, *161* (1), 32-37.
53. Sliwka, H. R. P., V.; Lockwood, S.F, Hydrophilic Carotenoids: Carotenoid Aggregates. In *Carotenoids: Physical Chemical, and Biological Functions and Properties*, Landrum, J. T., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010; pp 31-60.
54. Yokoyama, A.; Sandmann, G.; Hoshino, T.; Adachi, K.; Sakai, M.; Shizuri, Y., Thermozeaxanthins, New Carotenoid-Glycoside-Esters from Thermophilic Eubacterium *Thermus-Thermophilus*. *Tetrahedron Lett* **1995**, *36* (27), 4901-4904.
55. Clauditz, A.; Resch, A.; Wieland, K. P.; Peschel, A.; Götz, F., Staphyloxanthin plays a role in the fitness of and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun* **2006**, *74* (8), 4950-4953.
56. Pfander, H., Carotenoid Glycosides. *Pure Appl Chem* **1976**, *47* (2-3), 121-128.

57. Yamano, Y.; Sakai, Y.; Yamashita, S.; Ito, M., Synthesis of zeaxanthin- and cryptoxanthin- β -D-glucopyranosides. *Heterocycles* **2000**, *52* (1), 141-146.
58. Yokoyama, A.; Shizuri, Y.; Misawa, N., Production of new carotenoids, astaxanthin glucosides, by transformants carrying carotenoid biosynthetic genes. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39* (22), 3709-3712.
59. Pfander, H.; Dumont, R.; Laderach, M., Synthesis of New Carotenoid-Glycosyl-Esters. *Chimia* **1980**, *34* (1), 20-23.
60. Komba, S.; Kotake-Nara, E.; Machida, S., Fucoxanthin Derivatives: Synthesis and their Chemical Properties. *J Oleo Sci* **2015**, *64* (9), 1009-1018.
61. Weintraub, S.; Shpigel, T.; Harris, L. G.; Schuster, R.; Lewis, E. C.; Lewitus, D. Y., Astaxanthin-based polymers as new antimicrobial compounds. *Polym Chem-Uk* **2017**, *8* (29), 4182-4189.
62. Levy, L. W. B., Richard H.; Tabatznik, Anthony S. Preparation of carotenoid esters containing a carotenoid in both the carboxylic acid and alcohol moieties. WO 2002068385, 2002.
63. Larsen, E.; Abendroth, J.; Partali, V.; Schulz, B.; Sliwka, H. R.; Quartey, E. G. K., Combination of vitamin E with a carotenoid: alpha-tocopherol and trolox linked to beta-apo-8'-carotenoic acid. *Chem-Eur J* **1998**, *4* (1), 113-117.
64. Hu, F.; Bu, Y. Z.; Liang, R.; Duan, R. M.; Wang, S.; Han, R. M.; Wang, P.; Ai, X. C.; Zhang, J. P.; Skibsted, L. H., Quercetin and daidzein beta-apo-14'-carotenoic acid esters as membrane antioxidants. *Free Radical Res* **2013**, *47* (5), 413-421.
65. Humeau, C.; Rovel, B.; Girardin, M., Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. *Biotechnol Lett* **2000**, *22* (2), 165-168.
66. Osuka, A.; Kume, T., Fucoxanthin- and peridinin-pheophorbide- α molecules as a new light-harvesting model. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (7), 655-658.
67. Polivka, T.; Pellnor, M.; Melo, E.; Pascher, T.; Sundstrom, V.; Osuka, A.; Naqvi, K. R., Polarity-tuned energy transfer efficiency in artificial light-harvesting antennae containing carbonyl carotenoids peridinin and fucoxanthin. *J Phys Chem C* **2007**, *111* (1), 467-476.
68. Agocs, A.; Turcsi, E.; Nagy, V.; Deli, J., Isolation and Analysis of Carotenoids in Hungary from Zechmeister until Today. *Processes* **2022**, *10* (4).
69. Maoka, T.; Akimoto, N.; Fujiwara, Y.; Hashimoto, K., Structure of new carotenoids with the 6-oxo-end group from the fruits of Paprika. *J Nat Prod* **2004**, *67* (1), 115-117.
70. Murillo, E.; Turcsi, E.; Szabó, I.; Mosquera, Y.; Agócs, A.; Nagy, V.; Gulyás-Fekete, G.; Deli, J., Carotenoid Composition of the Fruit of Red Mamey (*Pouteria sapota*). *J Agr Food Chem* **2016**, *64* (38), 7148-7155.
71. Murillo, E.; McLean, R.; Britton, G.; Agocs, A.; Nagy, V.; Deli, J., Sapotexanthin, an A-Provitamin Carotenoid from Red Mamey (*Pouteria sapota*). *J Nat Prod* **2011**, *74* (2), 283-285.
72. Lakey-Beitia, J.; Vasquez, V.; Mojica-Flores, R.; Fuentes, A. L. F.; Murillo, E.; Hegde, M. L.; Rao, K. S., *Pouteria sapota* (Red Mamey Fruit): Chemistry and Biological Activity of Carotenoids. *Comb Chem High T Scr* **2022**, *25* (7), 1134-1147.
73. Gulyas-Fekete, G.; Murillo, E.; Kurtan, T.; Papp, T.; Illyes, T. Z.; Drahos, L.; Visy, J.; Agocs, A.; Turcsi, E.; Deli, J., Cryptocapsin epoxide-Type Carotenoids from Red Mamey, *Pouteria sapota*. *J Nat Prod* **2013**, *76* (4), 607-614.
74. Turcsi, E.; Murillo, E.; Kurtan, T.; Szappanos, A.; Illyes, T. Z.; Gulyas-Fekete, G.; Agocs, A.; Avar, P.; Deli, J., Isolation of beta-Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3'-Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*). *J Agr Food Chem* **2015**, *63* (26), 6059-6065.
75. Murillo, E.; Agócs, A.; Nagy, V.; Király, S. B.; Kurtán, T.; Toribio, E. M.; Lakey-Beitia, J.; Deli, J., Isolation and identification of sapotexanthin 5,6-epoxide and 5,8-epoxide from red mamey (*Pouteria sapota*). *Chirality* **2020**, *32* (5), 579-587.
76. Murillo, E.; Mosquera, Y.; Kurtán, T.; Gulyás-Fekete, G.; Nagy, V.; Deli, J., Isolation and Characterization of Novel Capsorubin-Like Carotenoids from the Red Mamey (*Pouteria sapota*). *Helvetica Chimica Acta* **2012**, *95* (6), 983-988.
77. Agócs, A.; Murillo, E.; Turcsi, E.; Béni, S.; Darcsi, A.; Szappanos, A.; Kurtán, T.; Deli, J., Isolation of allene carotenoids from mamey. *J Food Compos Anal* **2018**, *65*, 1-5.

78. Deli, J.; Molnar, P.; Osz, E.; Toth, G., Capsoneoxanthin, a new carotenoid isolated from the fruits of *Asparagus falcatus*. *Tetrahedron Lett* **2000**, *41* (42), 8153-8155.
79. Agocs, A.; Murillo, E.; Turcsi, E.; Beni, S.; Darcsi, A.; Szappanos, A.; Kurtan, T.; Deli, J., Isolation of allene carotenoids from mamey. *J Food Compos Anal* **2018**, *65*, 1-5.
80. Nagy, V.; Agocs, A.; Balazs, V. L.; Purger, D.; Filep, R.; Sandor, V.; Turcsi, E.; Gulyas-Fekete, G.; Deli, J., Lutein Isomers: Preparation, Separation, Structure Elucidation, and Occurrence in 20 Medicinal Plants. *Molecules* **2023**, *28* (3).
81. Murillo, E.; Deli, J.; Nagy, V.; Molinar-Toribio, E.; Sandor, V.; Marton, K.; Agocs, A., Carotenoid profile of two capsorubin-rich tropical plants. *J Food Compos Anal* **2021**, *97*.
82. Yamano, Y.; Ito, M., Total synthesis of capsanthin and capsorubin using Lewis acid-promoted regio- and stereoselective rearrangement of tetrasubstituted epoxides. *Org Biomol Chem* **2007**, *5* (19), 3207-3212.
83. Murillo, E.; Nagy, V.; Menchaca, D.; Deli, J.; Agócs, A., Changes in the Carotenoids of *Zamia Dressleri* Leaves during Development. *Plants* **2024**, *13* (9).
84. Agócs, A.; Nagy, V.; Szabó, Z.; Márk, L.; Ohmacht, R.; Deli, J., Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innov Food Sci Emerg* **2007**, *8* (3), 390-394.
85. Deli, J.; Molnar, P.; Matus, Z.; Toth, G.; Steck, A.; Pfander, H., Isolation and characterization of 3,5,6-trihydroxy-carotenoids from petals of *Lilium tigrinum*. *Chromatographia* **1998**, *48* (1-2), 27-31.
86. Deli, J.; Molnar, P.; Matus, Z.; Toth, G.; Steck, A.; Pfander, H., Isolation of carotenoids with 3,5,6-trihydroxy-5,6-dihydro-beta-end groups from red paprika (*Capsicum annum*). *Helv Chim Acta* **1998**, *81* (7), 1233-1241.
87. Nagy, V.; Agocs, A.; Turcsi, E.; Deli, J., Isolation and purification of acid-labile carotenoid 5,6-epoxides on modified silica gels. *Phytochem Analysis* **2009**, *20* (2), 143-148.
88. Nagy, V.; Agocs, A.; Turcsi, E.; Molnar, P.; Szabo, Z.; Deli, J., Latoxanthin, a minor carotenoid isolated from the fruits of yellow paprika (*Capsicum annum* var. *lycopersiciforme flavum*). *Tetrahedron Lett* **2007**, *48* (51), 9012-9014.
89. Varga, E.; Balázs, V. L.; Sándor, V.; Agócs, A.; Nagy, V.; Király, S. B.; Kurtán, T.; Molnár, P.; Deli, J., Carotenoid Composition of *Telekia speciosa*. *Plants* **2023**, *12* (24).
90. Balazs, V. L.; Gulyás-Fekete, G.; Nagy, V.; Zubay, P.; Szabó, K.; Sándor, V.; Agócs, A.; Deli, J., Carotenoid Composition of *Calendula officinalis* Flowers with Identification of the Configuration of 5,8-Epoxy-carotenoids. *Acs Agr Sci Technol* **2023**, *3* (11), 1092-1102.
91. Honda, M. M., H.; Fukaya, T.; Goto, M., Effects of Z-Isomerization on the Bioavailability and Functionality of Carotenoids: A Review. In *Progress in Carotenoid Research*, Leila Queiroz Zepka, E. J.-L. a. V. V. D. R., Ed. IntechOpen Limited: London, UK, 2018.
92. Nagy, V.; Agocs, A.; Deli, J., In Vitro and In Vivo Transformations of Lutein. *Mini-Rev Org Chem* **2009**, *6* (3), 211-219.
93. Pap, R.; Pandur, E.; Janosa, G.; Sipos, K.; Agocs, A.; Deli, J., Lutein Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects and Influences Iron Utilization of BV-2 Microglia. *Antioxidants* **2021**, *10* (3).
94. Pap, R.; Pandur, E.; Janosa, G.; Sipos, K.; Nagy, T.; Agocs, A.; Deli, J., Lutein Decreases Inflammation and Oxidative Stress and Prevents Iron Accumulation and Lipid Peroxidation at Glutamate-Induced Neurotoxicity. *Antioxidants-Basel* **2022**, *11* (11).
95. Pap, R.; Pandur, E.; Janosa, G.; Sipos, K.; Fritz, F. R.; Nagy, T.; Agocs, A.; Deli, J., Protective Effects of 3'-Epilutein and 3'-Oxolutein against Glutamate-Induced Neuronal Damage. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (15).
96. Deli, J.; Gonda, S.; Nagy, L. Z.; Szabo, I.; Gulyas-Fekete, G.; Agocs, A.; Marton, K.; Vasas, G., Carotenoid composition of three bloom-forming algae species. *Food Res Int* **2014**, *65*, 215-223.
97. Nagy, V.; Agocs, A.; Deli, J.; Gulyas-Fekete, G.; Illyes, T. Z.; Kurtan, T.; Turcsi, E.; Beni, S.; Dekany, M.; Ballot, A.; Vasas, G., Carotenoid glycoside isolated and identified from cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Food Compos Anal* **2018**, *65*, 6-10.

98. Iwai, M.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Inoue, Y.; Ikeuchi, M., Absence of the PsbZ subunit prevents association of PsbK and Ycf12 with the PSII complex in the thermophilic cyanobacterium BP-1 (vol 48, pg 1758, 2007). *Plant Cell Physiol* **2008**, *49* (6), 998-998.
99. Hada, M.; Nagy, V.; Takatsy, A.; Deli, J.; Agocs, A., Dicarotenoid esters of bivalent acids. *Tetrahedron Lett* **2008**, *49* (21), 3524-3526.
100. Hada, M.; Nagy, V.; Gulyas-Fekete, G.; Deli, J.; Agocs, A., Towards Carotenoid Dendrimers: Carotenoid Diesters and Triesters with Aromatic Cores. *Helv Chim Acta* **2010**, *93* (6), 1149-1155.
101. Hada, M.; Petrovics, D.; Nagy, V.; Boddi, K.; Deli, J.; Agocs, A., The first synthesis of PEG-carotenoid conjugates. *Tetrahedron Lett* **2011**, *52* (25), 3195-3197.
102. Hada, M.; Nagy, V.; Takatsy, A.; Deli, J.; Hait, J.; Agocs, A., Introduction of click chemistry to carotenoids. *Tetrahedron Lett* **2012**, *53* (19), 2480-2482.
103. Lutnaes, B. F.; Kildahl-Andersen, G.; Krane, J.; Liaaen-Jensen, S., Delocalized carotenoid cations in relation to the soliton model. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (29), 8981-8990.
104. Zand, A.; Agocs, A.; Deli, J.; Nagy, V., Synthesis of carotenoid-cysteine conjugates. *Acta Biochimica Polonica* **2012**, *59* (1), 149-150.
105. Yamano, Y.; Sakai, Y.; Hara, M.; Ito, M., Carotenoids and related polyenes. Part 9. Total synthesis of thermozeaxanthin and thermocryptoxanthin and the stabilizing effect of thermozeaxanthin on liposomes. *J Chem Soc Perk T 1* **2002**, (17), 2006-2013.
106. Hanaura, M.; Agocs, A.; Boddi, K.; Deli, J.; Nagy, V., New methods for the synthesis of carotenoid glycosides. *Tetrahedron Lett* **2014**, *55* (26), 3625-3627.
107. Gonda, Z.; Novák, Z., Highly active copper-catalysts for azide-alkyne cycloaddition. *Dalton T* **2010**, *39* (3), 726-729.
108. Agocs, A.; Bokor, E.; Takatsy, A.; Lorand, T.; Deli, J.; Somsak, L.; Nagy, V., Synthesis of carotenoid-monosaccharide conjugates via azide-alkyne click-reaction. *Tetrahedron* **2017**, *73* (5), 519-526.
109. Molander, G. A.; Ham, J., Synthesis of functionalized organotrifluoroborates via the 1,3-dipolar cycloaddition of azides. *Org Lett* **2006**, *8* (13), 2767-2770.
110. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem Rev* **2008**, *108* (8), 2952-3015.
111. Madaj, J.; Nishikawa, Y.; Reddy, V. P.; Rinaldi, P.; Kurata, T.; Monnier, V. M., 6-Deoxy-6-fluoro-L-ascorbic acid: crystal structure and oxidative degradation. *Carbohydr Res* **2000**, *329* (2), 477-485.
112. Linzembold, I.; Czett, D.; Boddi, K.; Kurtan, T.; Kiraly, S. B.; Gulyas-Fekete, G.; Takatsy, A.; Lorand, T.; Deli, J.; Agocs, A.; Nagy, V., Study on the Synthesis, Antioxidant Properties, and Self-Assembly of Carotenoid-Flavonoid Conjugates. *Molecules* **2020**, *25* (3).
113. Polyakov, N. E.; Magyar, A.; Kispert, L. D., Photochemical and Optical Properties of Water-Soluble Xanthophyll Antioxidants: Aggregation vs Complexation. *J Phys Chem B* **2013**, *117* (35), 10173-10182.
114. Tay-Agbozo, S.; Street, S.; Kispert, L. D., The carotenoid bixin: Optical studies of aggregation in polar/water solvents. *J Photoch Photobio A* **2018**, *362*, 31-39.
115. Simonyi, M.; Bikadi, Z.; Zsila, F.; Deli, J., Supramolecular exciton chirality of carotenoid aggregates. *Chirality* **2003**, *15* (8), 680-698.
116. Bereczki, I.; Papp, H.; Kuczmog, A.; Madai, M.; Nagy, V.; Agocs, A.; Batta, G.; Milankovits, M.; Ostorhazy, E.; Kos, J.; Zsigmond, A.; Hajdu, I.; Bajusz, D.; Hodek, J.; Weber, J.; Jakab, F.; Herczegh, P.; Borbas, A.; Mitrović, A.; Lorincz, Z.; Keserii, G. M., Natural Apocarotenoids and Their Synthetic Glycopeptide Conjugates Inhibit SARS-CoV-2 Replication. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (11).
117. Galano, A.; Tan, D. X.; Reiter, R. J., Melatonin and Related Compounds: Chemical Insights into their Protective Effects Against Oxidative Stress. *Curr Org Chem* **2017**, *21* (20), 2077-2095.
118. Favero, G.; Franceschetti, L.; Buffoli, B.; Moghadasian, M. H.; Reiter, R. J.; Rodella, L. F.; Rezzani, R., Melatonin: Protection against age-related cardiac pathology. *Ageing Res Rev* **2017**, *35*, 336-349.
119. Aranda, M. L.; Fleitas, M. F. G.; Dieguez, H.; Iaquinandí, A.; Sande, P. H.; Dorfman, D.; Rosenstein, R. E., Melatonin as a Therapeutic Resource for Inflammatory Visual Diseases. *Curr Neuropharmacol* **2017**, *15* (7), 951-962.

120. Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Cabrera, J.; D'Arpa, D.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Ramos, S., The oxidant/antioxidant network: Role of melatonin. *Biol Signal Recept* **1999**, *8* (1-2), 56-63.
121. Chen, D. M.; Zhang, T.; Lee, T. H., Cellular Mechanisms of Melatonin: Insight from Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules* **2020**, *10* (8).
122. He, L.; Du, J. J.; Zhou, J. J.; Chen, M. T.; Luo, L.; Li, B. Q.; Zhang, X. Z.; Ma, W. Z.; Ma, A. J.; Feng, N., Synthesis of Melatonin Derivatives and the Neuroprotective Effects on Parkinson's Disease Models of *Caenorhabditis elegans*. *Front Chem* **2022**, *10*.
123. Czett, D.; Boddi, K.; Nagy, V.; Takatsy, A.; Deli, J.; Tone, P.; Balogh, G. T.; Vincze, A.; Agocs, A., Synthesis, Pharmacokinetic Characterization and Antioxidant Capacity of Carotenoid Succinates and Their Melatonin Conjugates. *Molecules* **2022**, *27* (15).
124. Angi, R.; Kalóczkai, A. J.; Kovács, A.; Marton, A.; Bárdos, V.; Dormán, P.; Katona, G.; Agócs, A.; Csorba, A.; Nagy, Z. Z.; Vincze, A.; Balogh, G. T., Harnessing cyclodextrins for enhanced ocular delivery of carotenoid derivatives: From development to ex vivo characterization. *Carbohydr Polym Tech* **2025**, *9*.
125. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* **1996**, *239* (1), 70-76.
126. Deguchi, A., Curcumin Targets in Inflammation and Cancer. *Endocr Metab Immune* **2015**, *15* (2), 88-96.
127. Jalencas, X.; Mestres, J., On the origins of drug polypharmacology. *Medchemcomm* **2013**, *4* (1), 80-87.
128. Gerenu, G.; Liu, K.; Chojnacki, J. E.; Saathoff, J. M.; Martínez-Martín, P.; Perry, G.; Zhu, X. W.; Lee, H. G.; Zhang, S. J., Curcumin/Melatonin Hybrid 5-(4-Hydroxy-phenyl)-3-oxo-pentanoic Acid [2-(5-Methoxy-1-indol-3-yl)-ethyl]-amide Ameliorates AD-Like Pathology in the APP/PS1 Mouse Model. *Acs Chem Neurosci* **2015**, *6* (8), 1393-1399.
129. Santiago Jijón, D. C., Katalin Böddi, Gergely Gulyás-Fekete, Veronika Nagy, Anikó Takátsy, György T. Balogh, József Deli, Attila Agócs, Synthesis, antioxidant capacity and aggregation of carotenoid-curcumin conjugates and hybrids. *Plos One* **2025**, under review.
130. Dai, Y. H.; He, Y. Z.; Wang, Y.; Jiang, H. F.; Li, Z. F.; Chen, W. F., A Concise Total Synthesis of Cassumunin C. *Synthesis-Stuttgart* **2014**, *46* (22), 3041-3046.
131. Czett, D.; Nagy, V.; Kurtan, T.; Kiraly, S.B. ; Szabo, P.; Agocs, A.; Deli, J.; Boddi, K., Effect of aggregation behaviour on the antioxidant capacity of carotenoids. *J Mol Liq* **2025**, *421* (126870).

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Deli Józsefnek, hogy 20 éve lehetőséget adott, hogy a nagy múltú pécsi Karotinoidkémiai Kutatócsoporthoz csatlakozzam. Azóta sok mindent el- és megtanultam tőle a karotinoidokkal kapcsolatos speciális munkáról. Teljes szabadságot kaptunk a kutatómunkában, de mindig fordulhattunk hozzá és 40 éves tapasztalata sokszor kíségett minket.

Nagy Veronika ötletei, munkája és precizitása járult hozzá az évek során a legnagyobb mértékben ennek az értekezésnek a megszületéséhez.

Köszönöm továbbá a kutatócsoport jelenlegi (Böddi Katalin, Gulyás Gergely, Línzembold Ildikó, Andreidesz Kitti, Takátsy Anikó, Rigó Judit, Sajtiné Pintér Krisztina, Jámborné Herczegh Erika, Lukács Roland) és korábbi munkatársainak (Molnár Péter, Tóth Gyula, Matus Zoltán, Turcsi Erika, Mészáros Magdolna, Kriston-Czett Dalma, Götz Norbert, Götz Zsuzsanna, Nyers Éva, Bognár Sándorné) a sok segítséget, amit a napi munkám során biztosítottak.

A társszerzők és együttműködő partnerek szintén elengedhetetlenek voltak a tudományos sikerek elérésében.

Az anyagi háttér az elnyert számos OTKA pályázat és a Bolyai János Ösztöndíj biztosította.