

Doktori értekezés

Hanczkó Róbert
2006.

**AMINOSAVAK ÉS AMINOK SZÁRMAZÉKKÉSZÍTÉSE
O-FTÁLALDEHID-REAGENSEKKEL: ELTÉRŐ TIOL-
TARTALMÚ TERMÉKEK ÖSSZEHASONLÍTÓ ÉRTÉKELÉSE
HPLC ALKALMAZÁSÁVAL**

Doktori értekezés

Írta:
Hanczkó Róbert

Témavezető:
Perlné Dr. Molnár Ibolya egyetemi tanár, DSc
Eötvös Loránd Tudományegyetem,
Analitikai Kémiai Tanszék

Analitikai kémia program
Programvezető: Dr. Záray Gyula egyetemi tanár, DSc

Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémia Doktori Iskola
Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár, DSc

Budapest, 2006.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel és hálával tartozom Édesanyámnak, mert az ő támogatása és segítségével nem jutottam volna el ideig. Köszönöm Fehér Kriszta és Hábermann Ferenc baráti támogatását. Köszönöm még doktorandusztársaim: Kutlán Diána, Kőrös Ágnes és Jámbor Andrea segítségét.

Köszönöm az ELTE Analitikai Kémiai Tanszékének, Dr. Orbán Miklósnak és Dr. Záray Gyulának, a Tanszék volt és mostani vezetőjének, hogy lehetővé tette kísérleteim elvégzését.

Köszönettel tartozom Dr. Inzelt Györgynek és az ELTE Kémia Doktori Iskolájának a hároméves, állami ösztöndíjért. Köszönöm a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak a további egyéves ösztöndíjat.

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Perlné Dr. Molnár Ibolya, egyetemi tanárnak, kísérleteim irányításáért, bátorításáért és támogatásáért, s azért, hogy mind emberileg, mind szakmailag oly sokat tanulhattam tőle.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	7
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. Meghatározás származékképzés nélkül.....	9
2.2. Meghatározás származékképzéssel.....	9
2.2.1. Meghatározás feniltiokarbamoil-származékként.....	10
2.2.2. Meghatározás kloroformátként.....	10
2.2.3. Meghatározás danzil-, illetőleg dabzil-származékként.....	11
2.2.4. Meghatározás 6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamát-származékként.....	12
2.2.5. Meghatározás <i>o</i> -ftálaldehid-származékként, különböző SH-csoportú segédanyagok jelenlétében.....	13
3. Célkitűzés.....	15
4. Kísérleti rész.....	16
4.1. A felhasznált vegyszerek.....	16
4.2. Eszközök.....	16
4.2.1. HPLC-rendszer (a felsorolás szerinti sorrendben):.....	16
4.2.2. On-line HPLC-MS-rendszer:.....	16
4.2.3. Oszlopok:.....	16
4.2.4. pH-mérő:.....	17
4.3. Oldatok.....	17
4.3.1. Felhasznált eluensek.....	17
4.3.2. Borátpuffer-oldatok.....	17
4.3.3. Standard oldatok.....	18
4.3.3.1. AS- és A-oldatok.....	18
4.3.3.2. OPA-törzsoldat.....	18
4.3.3.3. FMOC-Cl-oldat.....	18
4.3.4. Reagensoldatok.....	18
4.4. Az elválasztások során alkalmazott körülmények.....	19
4.4.1. Az OPA/MCE-származékok vizsgálata.....	19
4.4.1.1. Az egy, illetőleg több OPA/MCE-származékot adó aminosavak vizsgálata.....	19
4.4.1.2. Az alifás monoaminok OPA/MCE-származékainak vizsgálata.....	20
4.4.1.3. A poliaminok OPA/MCE-származékainak vizsgálata.....	20
4.4.2. Az OPA/ET-származékok vizsgálata.....	20
4.4.2.1. Az egy OPA/ET-származékot adó aminosavak vizsgálata.....	20
4.4.2.2. Az egynél több OPA/ET-származékot adó aminosavak vizsgálata.....	21
4.4.2.3. Az alifás monoaminok OPA/ET-származékainak vizsgálata.....	21
4.4.2.4. A poliaminok OPA/ET-származékainak vizsgálata.....	21
4.4.2.5. Harminchét anyag egyidejű meghatározása.....	22
5. A kísérleti eredmények tárgyalása.....	24
5.1. Az OPA-reagensok szennyezései és eltarthatósága.....	24
5.1.1. Az OPA/MCE-reagens.....	24
5.1.1.1. A szennyezők mennyiségének függése a reagens összetételétől.....	25
5.1.1.2. A reagens optimális tárolási feltételei és élettartama, s ezek függése az SH-csoportú segédanyag milyenségétől.....	25
5.1.2. Az OPA/ET-reagens.....	25
5.2. Az aminosavak OPA-származékai.....	25
5.2.1. Az egynél több OPA-származékot adó aminosavak.....	26
5.2.1.1. Származékkészítések az OPA/MCE-reagenssel.....	26
5.2.1.1.1. Az 1/3 molarányú OPA/MCE-reagens.....	26
5.2.1.1.2. Az 1/50 molarányú OPA/MCE-reagens alkalmazása.....	26

5.2.1.2. Származékkészítések az 1/10 molarányú, eltérő metanoltartalmú {20 (V/V)% és 80 (V/V)%} OPA/ET-reagenssel	27
5.2.2. Az egyetlen OPA-származékot adó aminosavak.....	28
5.2.2.1. Reakció az OPA/MCE=1/3 és az 1/50 molarányú reagenssel.....	28
5.2.2.2. Reakció az OPA/ET-reagenssel.....	28
5.2.3. Összehasonlító vizsgálatok az OPA/MPA=OPA/NAC= OPA/MCE=OPA/ET= OPA/2-merkaptotétánszulfonsav=1/3 molarányú, 80 (V/V)% metanoltartalmú, 9,30 pH-értékű reagens alkalmazásával.....	29
5.3. Az aminosavak OPA-származékai	31
5.3.1. Az alifás monoaminok OPA-származékai.....	31
5.3.1.1. A C ₁ -C ₄ aminok reakciója az OPA/MCE-reagenssel.....	31
5.3.1.2. A C ₁ -C ₅ aminok reakciója az OPA/ET=1/10 molarányú, 80 (V/V)% metanoltartalmú reagenssel.....	32
5.3.1.3. Az <i>n</i> -C ₆ -C ₈ és a β -feniletilamin OPA/MPA, OPA/NAC-, OPA/MCE- és OPA/ET származékainak összehasonlító elemzése.....	32
5.3.1.3.1. Az <i>n</i> -C ₆ -C ₈ - és a β -feniletilamin reakciója az OPA/MPA=OPA/NAC=OPA/MCE= OPA/ET=1/3 molarányú (pH=9,3) reagenssel.....	33
5.3.1.3.2. Az <i>n</i> -C ₆ -C ₈ - és a β -feniletilamin reakciója az OPA/MPA=OPA/NAC=OPA/MCE= OPA/ET=1/50 molarányú reagenssel.....	34
5.3.1.3.2.1. Vizsgálatok az OPA/MPA=1/50 molarányú reagenssel, a pH függvényében	34
5.3.1.3.2.2. Vizsgálatok az OPA/NAC=OPA/MCE=OPA/ET=1/50 molarányú (pH=8,8 és 9,3) reagenssel	36
5.3.2. A biogén aminok OPA-származékai	37
5.3.2.1. A biogén aminok reakciója az OPA/MCE-reagenssel	37
5.3.2.2. A biogén aminok reakciója az OPA/ET=1/3 molarányú, pH=9,3 értékű, 20 (V/V)% és 80 (V/V)% metanoltartalmú reagenssel	37
5.4. Biogén aminok meghatározása aminosavak jelenlétében	39
5.4.1. Biogén aminok reakciója OPA-MPA- és OPA/ET reagenssel	39
5.4.2. Biogén aminok reakciója az OPA/ET/FMOC-reagenssel.....	39
5.4.3. A biogén aminok OPA/ET/FMOC-származékainak együttes elemzése az ornitinnel és a lizinnel	39
5.4.4. A putreszcinnel, a kadaverinnel, az 1,7-diaminoheptán, a spermidinnel, a sperminnel, az ornitinnel és a lizinnel OPA/ET/FMOC-reagenssel készített származékainak stabilitásvizsgálatai	40
5.4.5. Az ornitinnel, a lizinnel, a putreszcinnel, a kadaverinnel, az 1,7-diaminoheptán, a spermidinnel és a sperminnel OPA/ET/FMOC- származékai összetételének tömegspektrometriás azonosítása.....	41
5.4.5.1. A spermidinnel és a sperminnel OPA/ET/FMOC- származékainak abszorbanciája	41
5.4.5.2. Az ornitinnel, a lizinnel, a putreszcinnel, a kadaverinnel, az 1,7-diaminoheptán, a spermidinnel és a sperminnel OPA/ET/FMOC- származékai összetételének on-line HPLC-DAD-ESI-MS vizsgálata	42
5.4.5.2.1. A putreszcinnel, a kadaverinnel, az 1,7-diaminoheptán, a spermidinnel és a sperminnel OPA/ET/FMOC- származékai összetételének on-line HPLC-DAD-ESI-MS vizsgálata	42
5.4.5.2.2. Az ornitinnel és lizinnel OPA/ET/FMOC- származékai összetételének on-line HPLC-DAD-ESI-MS vizsgálata	42
5.4.5.3. Az α,ω -diaminokarbonsavak OPA/ET/FMOC-származékainak elemzése.....	43
5.4.5.4. Az ornitinnel és lizinnel izoindolt és FMOC-ot tartalmazó vegyes termékek szerkezetének meghatározása MS-MS vizsgálattal	45
6. A származékkészítési tanulmányok analitikai hasznosítása.....	46
6.1. Az ornitinnel, a lizinnel, a putreszcinnel, a kadaverinnel, az 1,7-diaminoheptán, a spermidinnel és a sperminnel egyidejű mennyiségi meghatározása, biológiai szövetekből.....	46
6.2. Aminosavak és aminok egyidejű meghatározása OPA/ET/FMOC-származékokként.....	46
7. Összefoglalás; az értekezésben foglalt új kutatási eredmények	49
8. Summary; the novel results of the thesis	50

9. Táblázatok jegyzéke	51
10. Ábrák jegyzéke	79
11. Irodalomjegyzék	107
12. Az értekezés anyagából készült közlemények, poszterek és szakmai előadások.....	118
12.1. Közlemények:	118
12.2. Konferencia poszterek és absztraktok	118
12.3. Szakmai előadások	119

Rövidítések jegyzéke

- A: amin, 8
AcN: acetonitril, 16
Agm: agmatin, 8
Ala: alanin, 18
AQC: 6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamát, 12
Arg: arginin, 18
AS: aminosav, 8
Asn: aszparagin, 18
Asp: aszparaginsav, 18
- BA: biogén amin, 8
BHMTA: bisz(hexametilén)triamin, 20
- Cad: kadaverin, 8
CLND: kemilumineszcenciás nitrogéndetektálás, 9
- DABA: 2,4-diaminobutánsav, 44
dabzil-Cl: 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzolszulfonil-klorid, 11
DAH: 1,7-diaminoheptán, 21
danzil-Cl: 5-(dimetilamino)naftalin-1-szulfonil-klorid, 11
DAPA: 1,3-diaminopropionsav, 44
DPIA: 2,6-diaminopimelinsav, 44
- EACA: ε -aminokapronsav, 19
ET: etántiol, 13
EtA: etilamin, 20
- FMOCCl: 9-fluorenilmetil kloroformát, 10
- GABA: γ -aminovajsav, 19
GC-MS: gázkromatográf-tömegspektrométer, 35
Gln: glutamin, 18
Glu: glutaminsav, 18
- Hisn: hisztamin, 8
HOEtA: etanolamin, 20
HPLC: nagyteljesítményű folyadékkromatográfia, 8
HPLC-ESI-MS: HPLC, elektropray-ionizációs tömegspektrométer/-metriás, 33
- iAmA: *i*-amilamin, 21
iBuA: *i*-butilamin, 20
Ile: izoleucin, 18
integrátoregység/pmol: ie/pmol, 26
iPrA: *i*-propilamin, 20
- Leu: leucin, 18
- Lys: lizin, 12
- MCE: 2-merkaptóetanol, 13
MeA: metilamin, 20
MeOH: metanol, 12
MESNA: 2-merkaptóetánszulfonsav, 29
MPA: 3-merkaptopropionsav, 13
MS: tömegspektrometriás detektálás, 9
- NAC: N-acetil-L-cisztein, 13
nAmA: *n*-amilamin, 21
nBuA: *n*-butilamin, 20
nHepA: *n*-heptilamin, 17
nHexA: *n*-hexilamin, 17
nOctA: *n*-oktilamin, 17
nPrA: *n*-propilamin, 20
- OPA: *o*-ftálaldehid, 13
Orn: ornitin, 12
- PA: poliamin, 20
Phe: fenilalanin, 18
PhEtA: β -feniletilamin, 17
PITC: fenilizotiocianát, 10
PTC: feniltiokarbamoil, 10
PTH: feniltiohidantoin, 10
Put: putreszcín, 8
- sBuA: *szek*-butilamin, 20
Ser: szerin, 12
Spd: spermidin, 20
Spm: spermin, 20
- tBuA: *terc*-butilamin, 20
THF: tetrahydrofuran, 16
Thr: treonin, 18
Trp: triptofán, 13
- Tyrn: tiramin, 20
- UV: ultraibolya/ultraibolya detektálás, 9
- Val: valin, 18
VIS: látható tartomány, 11
- λ_{\max} : abszorbancia-maximum, 32
- β -Ala: β -Alanin, 14

1. Bevezetés

A nitrogén fontos szerepet játszik az élő szervezetek felépítésében, az aminosavak (AS), fehérjék, hormonok, koenzimek, s egyúttal a földi élet építőköve is. Az AS-aknak és bizonyos aminoknak (A) döntő jelentőségük van az élettani folyamatokban is. A biogén aminok (BA) nemcsak neurotransmitterként, hanem hormonokként is életünk részei, amelyek befolyásolják és módosítják más hormonok kiválasztását. Rendellenes kiválasztásukról és/vagy metabolizmusukról feltételezik, hogy kapcsolatba hozhatók különböző betegségek kialakulásával. Széles körben vizsgálták a BA-ok szerepét az esszenciális hipertónia kialakulásában is [1]. A hisztamin (Hisn) a gyulladásos és allergiás folyamatokban játszik szerepet [2]. Különböző AS-ak dekarboxileződésekor keletkezik a putreszcin (Put), a kadaverin (Cad), az agmatin (Agm), hisztamin (Hisn).

Kutatócsoportunkban a szabad AS-ak és A-ok nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) elemzésére alkalmas származékképzés legkedvezőbb feltételeit részletesen és sokoldalúan vizsgáltuk.

2. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi áttekintésben azokat, a HPLC-s analízis során alkalmazott származékképzési módszereket mutatom be, melyeket napjainkban is igen széles körben alkalmaznak AS-ak, A-ok/BA-ok meghatározására [3]. A módszerek azonossága révén nem tárgyalom külön fejezetekben az A-okat, és az AS-akat, esetleg külön bekezdésben írom le az eltéréseket.

2.1. Meghatározás származékképzés nélkül

Mivel az AS-ak nem illékony vegyületek és sokuknak kicsi az ultraibolya (UV) tartománybeli elnyelésük, ezért a meghatározásuk az esetek jelentős részében származékaik formájában történik. A származékképzést elkerülendő, előnyös megoldás lehet a származékképzés nélküli meghatározás, minthogy a származékképzésből adódó hibák (a nem teljes reakció, melléktermékek keletkezése, koelúció a reagenssel) nem jelennek meg. Ugyanakkor a szabad AS-ak elválasztásából és detektálásából adódnak gondok. Az elmúlt évek detektorfejlesztéseinek eredményeként új lehetőségek nyíltak. A különböző detektálási technikák összehasonlítása lehetőséget nyújt az analitikusnak, hogy az elvárásainak legmegfelelőbbet válassza. Irodalmi adatokból kitűnik, hogy napjainkban a legérzékenyebb detektálási módok a származékképzés nélküli elválasztások után, a tömegspektrometriás (MS), az MS/MS és a kemiluminiscenciás nitrogéndetektálás (CLND) [4].

2.2. Meghatározás származékképzéssel

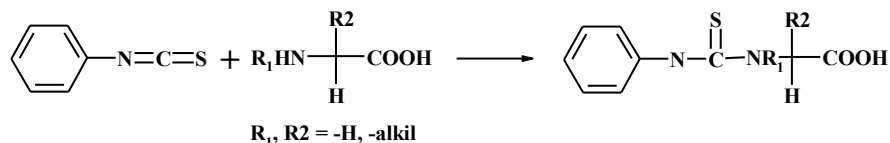
A HPLC-s módszerrel történő AS-elemzések körében az oszlop előtti származékképzés a legelterjedtebb. Népszerűségét a rendelkezésre álló származékképzőszerrel sokféleségével, a fordított fázisú oszlopok eredményezte hatékonyabb elválasztásokkal, és az általánosan használt, ugyanakkor (az adott elvárásnak) megfelelően érzékeny detektorok (UV, FI, MS, MS/MS, CLND) alkalmazásával magyarázhatjuk. Ezen technikák felhasználását az teszi lehetővé, hogy a származékképző-csoportok nagymértékben változtatják az egyes AS-ak retencióját, javítják az elválasztásukat, és a detektálásuk érzékenységét.

Az ideális származékképzőszerrel szembeni elvárások:

- a lejátszódó reakció gyors és kvantitatív legyen;
- a képződő származék stabil legyen;
- lehetőség szerint a primer és a szekunder aminocsoporttal is reagáljon;
- feleslege és az esetleges mellékreakciók a kromatográfiai elválasztást ne zavarják;
- az esetleg több funkciócsoportú AS-ak is egységes terméket (azaz egy kromatográfiai csúcsot) adjanak;

- megfelelő érzékenységű és szelektivitású származékot képezzen.

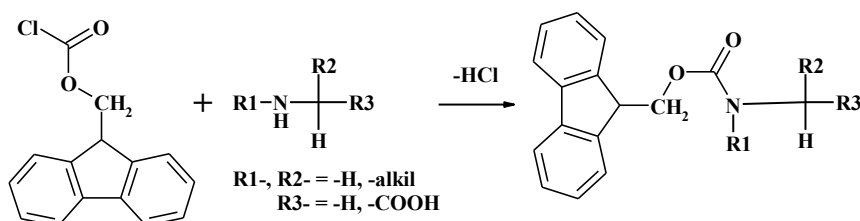
2.2.1. Meghatározás feniltiokarbamoil-származékként



1. ábra: Aminosavak feniltiokarbamoil-származékainak képződése [5]

Az AS-ak feniltiokarbamoil- (PTC) formában történő meghatározása igen elterjedt módszer, mivel a reagensként használt fenilizotiocianát (PITC) mind a szekunder, mind a primer aminocsoporttal szobahőmérsékleten, öt percen belül reagál. A képződött származékok stabilak – oldatban néhány óráig, szárazon, hűtőben tárolva korlátlan ideig eltarthatók. Az elúciójukhoz és a detektáláshoz elegendő egy mindössze két eluens szállítására alkalmas pumpa és egy UV-detektor. A PTC-származékok feniltiohidantoinná alakítás után (PTH) a fehérjék és peptidok szekvenálásánál alkalmazott eljárás. A PTC-eljárás hátránya, hogy a származékok csak UV-aktívak, valamint, hogy a reagensfelesleg nagyvákuumban történő eltávolítása szükséges [6].

2.2.2. Meghatározás kloroformátként



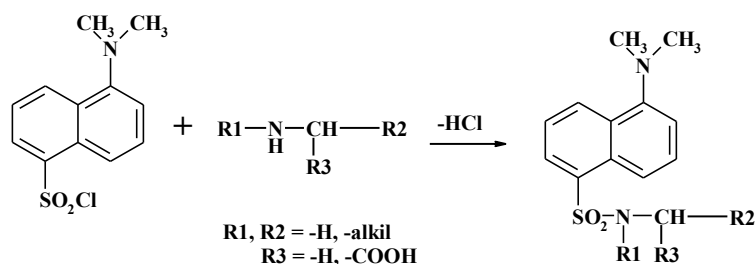
2. ábra: Aminocsoportú vegyületek reakciója 9-fluorenilmetil kloroformáttal [7]

Ez a reakció elterjedt, nemcsak az analitikában, hanem a peptidkémiaiban is, mivel a 9-fluorenilmetil kloroformát (FMOC-Cl), de a kloroformátok általában nemcsak fluoreszcens reagensként, hanem védőcsoportként is használatosak. Előnyük, hogy nemcsak primer, hanem szekunder aminocsoporttal is gyorsan reagálnak, szobahőmérsékleten, s a reagensfelesleget nem kell eltávolítani. Hátrányuk, hogy a reagens

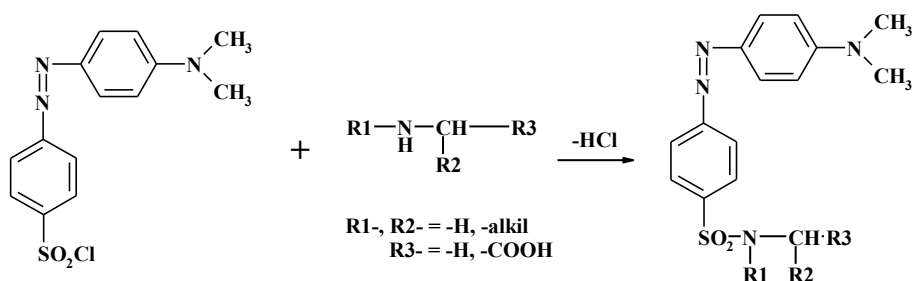
- önmagában is fluoreszkál,
- a lúgos pH-tartományban hidrolizál, valamint
- a reagens feleslege, s annak hidrolizált formája az AS-származékok elválasztását zavarja.

A kölcsönhatás szűk, pH=7,8–8,0 értékű oldatokban optimális, jöllehet, ilyen körülmények között a His és Tyr egynél több terméket szolgáltat [8].

2.2.3. Meghatározás danzil-, illetőleg dabzil-származékként



3. ábra: Aminocsoportú vegyületek reakciója 5-(dimetilamino)naftalin-1-szulfonil-kloriddal [9]

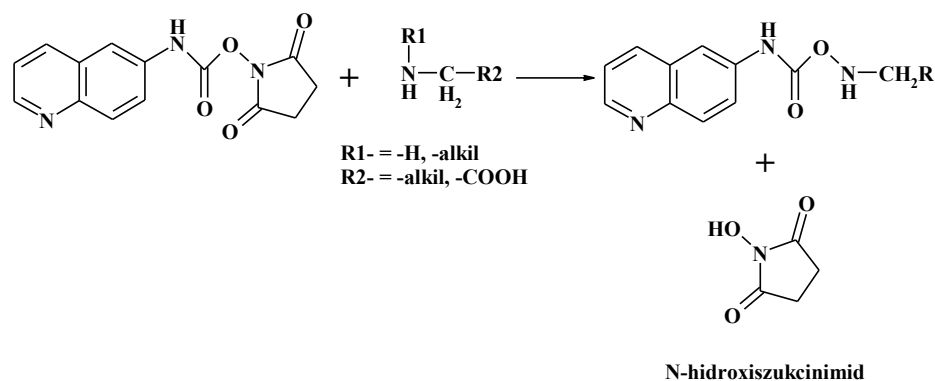


4. ábra: Aminocsoportú vegyületek reakciója 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzolszulfonil-kloriddal [10]

Az AS-ak és az A-k származékképzésére az 5-(dimetilamino)naftalin-1-szulfonil-kloridot (danzil-Cl) és a 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzolszulfonil-kloridot (dabzil-Cl) egyaránt alkalmazzák. Mindkét reagens primer és szekunder aminocsoportokkal is reagál.

Mindkét reagens esetében a származékokat szobahőnél magasabb hőmérsékleten, viszonylag hosszú ideig (danzil-Cl: 60 °C: 60 perc; 38 °C: 90–120 perc; dabzil-Cl: 70 °C: 15–30 perc) készítik. A danzil-Cl esetében UV és/vagy Fl, a dabzil-Cl-dal képzett származékok esetében UV és/vagy látható (VIS) detektálás alkalmazható. A danzil-Cl-dal a detektálás érzékenyebb [11].

2.2.4. Meghatározás 6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamát-származékként



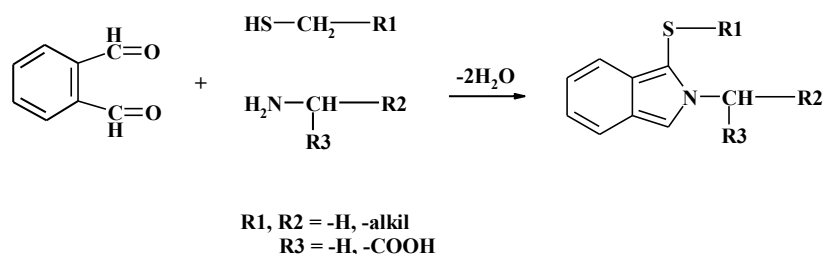
5. ábra: Aminocsoportú vegyületek reakciója 6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamáttal [12]

A 6-aminokinolil-N-hidroxiszukcinimidil-karbamát (AQC) mind a primer, mind a szekunder aminocsoporttal reagál. Az AQC egy reaktív, aktivált észter, a többi reagensnél később, AS-analízishez kifejlesztett, oszlop előtti származékképzőszer. Ezen reagens előnye még, hogy a kiindulási anyagéhoz képest az AQC-származék Fl emissziós maximuma, közelítőleg 100 nm-rel el van tolódva. Ezáltal egyszerűbbé válik a származékképzés, illetve nem szükséges elválasztani a mérendő anyagot és a reagenst. A származékképzés vizes oldatban, pH=8,0–10,5 között, igen rövid idő alatt lejártszódik. Számos puffer megvizsgáltak, de végül a nátrium-borát bizonyult a legalkalmasabbnak, mind kapacitás, mind a pufferből adódó háttér alacsony volta miatt. Az alsó pH-határ alatt a lizinnek (Lys) csak egyszeres származéka képződik, a lassan reagáló AS-akkal (pl. Asp, Glu, Val, Ala) a reakció nem teljes. pH=10,5 felett a reagens fokozott hidrolízise miatt a származékképzés nem kvantitatív. A reagens hidrolízisének következtében, a kvantitatív reakció biztosítása érdekében, pH=8–10-ról, s közelítőleg ötszörös reagensfeleslegről kell gondoskodni. Ugyanis, nem elegendő reagensfelesleg esetén nemcsak a Lys, de az ornitin (Orn) és a cisztin sem szolgáltat egységes terméket. Mellékreakciók csak korlátozott mértékben figyelhetők meg. Az alkoholok lassan reagálnak az AQC-val {ld. a reagenst metanolban (MeOH) oldják}. Az sem nyert bizonyítást, hogy a szerin (Ser) vagy a Tyr oldalláncával reagálna, s kétségtelen, hogy a reagens hamarabb elhidrolizál, semmint hogy a hidroxilcsoporttal reagálna.

A keletkező származékok is sokkal stabilabbak, mint a más reagensekkel képzetteké. Intenzív UV elnyelésük és Fl aktivitásuk következtében érzékeny mérést tesz lehetővé. Mivel a polárisabb AS-ak (Asp, Glu, Ser, Thr) akkor eluálódnak, mikor az eluens víztartalmának aránya magasabb, a Fl válaszjelük jelentősen lecsökken a víz kioltó hatása miatt. Belső szerkezetéből adódóan ugyancsak kioltódás – s alacsonyabb Fl válaszjel – figyelhető meg a triptofán

(Trp) esetében is, míg a diszubsztituált Lys és cisztin esetében a Fl válaszjel növekedése látható [13].

2.2.5. Meghatározás *o*-ftálaldehid-származékként, különböző SH-csoportú segédanyagok jelenlétében



6. ábra: Primer aminocsoportú vegyületek reakciója *o*-ftálaldehiddel [14]

A primer aminocsoportú vegyületek *o*-ftálaldehiddel (OPA), SH-csoportú segédanyag leggyakrabban 2-merkaptóetanol (MCE), 3-merkaptopropionsav (MPA), N-acetil-L-cisztein (NAC) vagy etántiol (ET) jelenlétében, lúgos közegben 1-alkiltio-2-alkilizoindolt (a továbbiakban: izoindol) képeznek. Ezen módszer előnye, hogy

- a reakció vizes közegben,
- gyorsan végbemegy,
- a reagens feleslegét nem kell eltávolítani,
- UV és Fl detektálás is alkalmazható.

Az OPA-val történő származékképzés a bevezetése (1971) [15] óta töretlen népszerűségnek örvend. Ezt igazolja az is, hogy az 1992–1998-ig terjedő időszakban az AS-ak HPLC-s meghatározásakor az esetek 31,2 %-ában OPA-t alkalmaztak [16]. Ezt támasztja alá az elmúlt 5 év közleményei alapján készített 1. táblázat és 7. ábra is, amelyek elkészítéséhez 278 olyan közleményt [17–294] találtam, melyben AS-akat és A-okat határoztak meg HPLC-vel, OPA-val képzett származék formájában. Ide kívánczik még az is, hogy közel 800 közlemény áttekintéséből, mindösszesen ennyi volt azok száma, melyekben egyértelmű volt a reagens összetétele. A 7. ábrán jól látható még, hogy az esetek több, mint 60 %-ában MCE-t alkalmaztak SH-csoportú segédanyagként.

Korábbi [16, 295–299], s folyamatos kutatásaink is [300–303], különös tekintettel azokra a primer aminocsoportú termékekre vonatkoznak, amelyek a várttól eltérő módon, egynél több származékot szolgáltatnak. Irodalmi [304–306] és saját tapasztalatok azt mutatták, hogy az OPA-reagens kéntartalmú segédanyagának milyensége jelentős mértékben meghatározza a keletkező termékek stabilitását.

Az alábbi kérdések merülnek még fel az irodalom áttekintésekor [306]:

- Milyen összefüggés lehet az OPA-AS-akról leírt, eltérő, egymásnak ellentmondó stabilitási értékek és az igen eltérő reagenskészítési szokások között?
- Az OPA/MPA(NAC, MCE, ET)-reagenseknek van-e FI-ás aktivitása, amit esetleg figyelembe kell venni az AS-ak/A-ok mennyiségének HPLC-s meghatározásakor, egyidejű FI és UV detektálás alkalmazásakor?
- Mennyi ideig szolgálta az OPA-reagens ugyanakkora válaszjeleket, vagyis meddig tartható el?
- Van-e, s mi az oka annak, hogy a Gly-, β -alanin- (β -Ala), GABA-, His-, Orn- és Lys-származékokat sokkal kevésbé stabilnak vélik a többi AS-hoz képest?
- Mekkora az elsődlegesen keletkezett izoindolok FI és UV válaszjelei, egymáshoz képest is, illetőleg függenek-e az OPA/AS molaránytól?
- Mi a szerkezete az elsődlegesen keletkezett izoindol továbbalakult termékeinek, s milyen mechanizmus szerint képződnek?

3. Célkitűzés

Kutatómunkám során a primer aminocsoport és az *o*-ftálaldehid közötti kölcsönhatást tanulmányoztam, 2-merkaptóetanolt, illetőleg etántiolt alkalmazva merkaptocsoportú segédanyagként. Nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás elválasztást, egyidejű fluoreszcens és ultraibolyás (bizonyos esetekben tömegspektrometriás) detektálást alkalmaztunk. Szigorúan azonos kísérleti körülmények között vizsgáltuk

- a reakció sztöchiometriai viszonyait
- a kölcsönhatás mechanizmusának megismerése, s
- az így szerzett ismeretek analitikai hasznosítása érdekében.

A szigorúan azonos körülmények alatt

- az *o*-ftálaldehid és az SH-csoportú anyag,
- az *o*-ftálaldehid és a primer aminocsoportú vegyület molarányainak,
- a származékképzés oldata pH-értékének, hőfokának és időtartamának tudatos tervezését értjük.
- A HPLC-s elválasztáshoz használt eluensek összetétele és az oszlop fajtája is – a lehetőségek szerint – azonos volt.

A kapott eredményeket összehasonlítottam az irodalomban eddig leírtakkal és kutatócsoportunk korábbi eredményeivel.

A spermidin és a spermin érzékenyebb meghatározása érdekében – az első lépésben *o*-ftálaldehiddel történő reakció után –, második lépésként 9-fluorenilmetil kloroformáttal való származékképzést vezettünk be.

Mindkét származékképzési reakció és a keletkezett származékok HPLC-s elválasztási körülményeinek optimalálása után, biológiai szövetek aminosav- és amintartalmát határoztuk meg. Olyan HPLC-s eljárást dolgoztunk ki, mely lehetővé teszi biológiai szövetek szabad (fehérjealkotó) aminosav- és amintartalmának (különös tekintettel a biogén aminokra: putreszcin, kadaverin, spermidin, spermin), összesen 37 vegyület meghatározását, kétlépcsős, oszlop előtti származékképzéssel, egyetlen felvételtől.

4. Kísérleti rész

4.1. A felhasznált vegyszerek

Az OPA, az MCE, az ET, az FMOC-Cl, az alifás mono- és diA-ok, valamint a BA-ok a Sigma (St. Louis, MO, USA), a Serva (Heidelberg, Németország) és a Reanal (Budapest) analitikai tisztaságú termékei voltak. A HPLC tisztaságú MeOH, az acetonitril (AcN) és a tetrahidrofurán (THF) a Sigma (St. Louis, MO, USA) termékei voltak.

4.2. Eszközök

4.2.1. HPLC-rendszer (a felsorolás szerinti sorrendben):

„Waters 717plus” termosztálható, automata mintaadagoló; „Waters 600” 4 eluens egyidejű kezelésére és héliummal való levegőmentesítésére alkalmas, termosztálható oszlopterű vezérlőegység; „Waters 996” fotodiódasoros UV-detektor (pásztaázási tartomány: 190–410 nm) „Waters 474” programozható FI-detektor. A rendszer Millennium 2010 programmal működik.

Az OPA-származékok detektálása egyidejűleg, sorba kapcsolt (1. DAD: 334 nm-en, 2. FI: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=337\text{ nm}/454\text{ nm}$) detektorokkal történt.

4.2.2. On-line HPLC-MS-rendszer:

ThermoFinnigan TSQ Quantum AH készülék (ThermoFinnigan, LC-MS Division, San Jose, CA, USA): „Surveyor” fotodiódasoros UV-detektor, „TSQ Quantum AH” (ElektroSpray-Ionizációs, pozitív módban használt) MS-detektor, „Surveyor” automata mintaadagoló, „Surveyor” 4 eluens egyidejű kezelésére képes, termosztálható oszlopterű vezérlőegységből áll. A rendszer Xcalibur 1.4 SRI programmal működik. Az MS-detektor tömegtartománya: 50–1600 tömegegység; a gázhőmérséklet: 200 °C (200 µl/perc áramlási sebességnél); 380 °C (1 ml/perc áramlási sebességnél) volt.

A detektálás a DAD esetében 334 nm-en történt.

Ezeket a méréseket a Növény- és Talajvédelmi Központi Szolgálat Kémia Osztályán végeztük, dr. Tóth Ferenc segítségével.

4.2.3. Oszlopok:

Az OPA/MCE-termékeket mindvégig BST Hypersil ODS 150 mm×4 mm, 5 µm-es oszlopon (O-1) választottuk el. Az előtétoszlop 20 mm×4 mm, 5 µm-es BST Hypersil ODS (E-1) volt. Az OPA/ET-termékek elválasztását az O-1 és E-1 oszlopokkal indítottuk, majd Thermo Hypersil ODS 200 mm×4,6 mm, 5 µm-es oszlopon (O-2) folytattuk. Az előtétoszlop

30 mm×4 mm, 5 µm-es BST Hypersil ODS oszlop (E-2) volt. {Megjegyzés: az *n*-hexilamin (nHexA), az *n*-heptilamin (nHepA), az *n*-oktilamin (nOctA) és a β-feniletilamin (PhEtA) OPA/MCE-származékainak elválasztása O-2 és E-1 oszlopokkal történt.}

A HPLC-MS mérésekhez minden esetben az O-1 és E-1 oszlopokat használtunk.

A harminchét anyag egyidejű elválasztásának kidolgozása során, mindvégig E-1 előtét-oszlopot használtunk. A főoszlop (O-3) Waters X-Bridge C18 (150 mm×4,6 mm, 3,5 µm-es) oszlop volt. Ez a főoszlop az 1–12-ig terjedő pH-tartományban alkalmazható. Alacsony pH-értékű eluensek esetében 80 °C-ig, magas pH-értékű eluensek esetében 45 °C-ig terjedő tartományban.

4.2.4. pH-mérő:

Az eluensek, reagensek (esetenként a minták) oldatainak pH-értékét „Radelkis OP-208/1” típusú, precíziós pH-mérővel mértük. „Radelkis OP-0808P” vagy „Radelkis OP-0823P” kombinált üvegelektrodót használtunk. A pH-mérőt, használat előtt pH=7,030 értékű „Radelkis K-71” jelű koncentrátumból készített hitelesítő oldattal kalibráltuk.

4.3. Oldatok

4.3.1. Felhasznált eluensek

- A-eluens: 0,10 mol/dm³ koncentrációjú nátrium-acetát-oldatot desztillált vízzel, kétszeresére hígítottam (0,05 mol/dm³ nátrium-acetát-oldat).
- B-eluens: 0,10 mol/dm³ koncentrációjú nátrium-acetát-oldatot, AcN-t és MeOH-t 46:44:10 térfogatarányban elegyítettem.

Az eluensek pH-ját 7,2±0,05-re állítottam tömény ecetsav-, vagy 30 g/100 cm³-es nátrium-hidroxid-oldattal. Az így készült eluenseket, felhasználás előtt (0,45 µm-es Whatman szűrőpapíron) szűrtem, majd ultrahangos rázatással, vákuum alatt levegőmentesítettük. A kromatográfiás elválasztások alatt az eluenseket héliumáramoltatással levegőmentesítettük.

A jobb elválasztás érdekében még MeOH-t és/vagy AcN-t is használtunk. (Megjegyzés: a különböző töménységű nátrium-hidroxid-oldatok minden esetben a karbonátmentes 30 g/100 cm³ koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldat hígításával készültek.)

4.3.2. Borátpuffer-oldatok

A borátpuffer-oldatok mindvégig (az adott helyen jelölt) 0,20 mol/dm³ vagy 0,80 mol/dm³ koncentrációjú bórsav- (mely tartalmazott még, vele azonos koncentrációban kálium-kloridot

is) és nátrium-hidroxid-oldat (és szükség esetén desztillált víz) azonos térfogatarányban történő elegyítésével készültek.

A pufferoldatok pH-értékét $9,3 \pm 0,05$ -re állítottam, $30 \text{ g}/100 \text{ cm}^3$ koncentrációjú nátrium-hidroxid-oldattal. Ha ettől eltérő pH-értékű borátpuffert használtam, azt az adott helyen jelölöm.

4.3.3. Standard oldatok

4.3.3.1. AS- és A-oldatok

A szabad AS-akból és A-okból $\sim 1\text{--}2 \cdot 10^{-2} \text{ mol}/\text{dm}^3$ koncentrációjú törzsoldatot készítettünk analitikai pontossággal, majd desztillált vízzel hígítottuk a felhasználás előtt. Az oldatokat úgy hígítottuk, hogy az injektált térfogatban ($10 \mu\text{l}$, ha ettől eltér, akkor azt ott jelzem) mindig $\sim 1000 \text{ pmol}$ AS, illetőleg A legyen (az ettől való eltérést az adott helyen jelzem). A vizsgálatok jelentős részében az egyes vegyületeket egyenként vizsgáltuk. Az egyetlen OPA-származékot adó AS-ak esetében viszont három olyan koncentrációjú törzsoldatot (ST1, ST2 és ST3) készítettünk, hogy az egyes AS-akból $200\text{--}200 \text{ pmol}$ legyen az injektált mennyiségben.

- ST1: aszparaginsav (Asp), Ser, arginin (Arg), Tyr, fenilalanin (Phe);
- ST2: glutaminsav (Glu), glutamin (Gln), valin (Val), leucin (Leu), alanin (Ala);
- ST3: aszparagin (Asn), treonin (Thr), Met, Trp, izoleucin (Ile).

4.3.3.2. OPA-törzsoldat

Az OPA-törzsoldat $0,25\text{--}0,75 \text{ g}$ analitikai pontossággal mért OPA MeOH-ban való oldásával, majd $50,0 \text{ cm}^3$ -re történő kiegészítésével készült.

A különböző koncentrációjú OPA-reagensek az OPA-törzsoldat analitikai pontosságú hígításával készültek.

4.3.3.3. FMOC-Cl-oldat

Az FMOC-Cl-oldat $5,00 \text{ cm}^3$ -ben, analitikai pontossággal mért és AcN-ben oldott $0,17 \text{ g}$ FMOC-ból készült.

4.3.4. Reagensoldatok

Az OPA/MCE-, illetőleg az OPA/ET-reagensoldatok, $10,00 \text{ cm}^3$ térfogatú mérőlombikba analitikai pontossággal mért $2,5 \text{ ml}$ OPA-törzsoldatból és

- OPA/MCE=1/3 molarány esetén $20 \mu\text{l}$,
- OPA/MCE=1/50 molarány esetén $340 \mu\text{l}$ MCE, vagy

- OPA/ET=1/10 mólarány esetén 38 µl ET hozzáadásával, és 0,2 mol/dm³ koncentrációjú, pH=9,3 értékű borátpufferrel jelre töltve készültek. Azt megelőzően a pH-értékét szükség szerint 9,3-ra állítottuk. Ha ettől eltérő pH-értékű reagensre volt szükségünk, akkor ahhoz megfelelő pH-értékű borátpuffert is készítettünk. Az így elkészített reagens MeOH-tartalma 25 (V/V)% volt.

Az OPA/ET-reagens esetében nagyrészt 80 (V/V)% volt a MeOH-tartalom. Az ilyen reagenst úgy készítettük, hogy 10,00 cm³ térfogatú mérőlombikba a megfelelő pH-értékű, 0,8 mol/dm³ koncentrációjú borátpufferből analitikai pontossággal 2,00 ml-t mértünk, hozzátettük a megfelelő mennyiségű OPA-törzsoldatot és ET-t, majd MeOH-val jelre töltöttük.

A reagensoldatokat és az AS-/A-oldatokat olyan arányban elegyítettük, hogy a reagáló térfogatban az OPA/(AS és/vagy A)=20/1 és az OPA/FMOC=1/0,4 legyen (az ettől való eltérést az adott helyen jelzem).

Az MCE és az ET fokozott illékonyására való tekintettel (melyről erős szaguk is árulkodik), lehetőleg jól húzó vegyifülke alatt készítsük el az OPA-reagenst, s használjunk gumikesztyűt is.

4.4. Az elválasztások során alkalmazott körülmények

4.4.1. Az OPA/MCE-származékok vizsgálata

Az elválasztások során mindvégig az O-1 és E-1 oszlopokat használtuk.

4.4.1.1. Az egy, illetőleg több OPA/MCE-származékot adó aminosavak vizsgálata

A vizsgált AS-ak a következők voltak:

- a) Egyetlen OPA-származékot adók: Asp, Glu, Asn, Ser, Ala, Gln, Thr, Arg, Tyr, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu.
- b) Egynél több OPA-származékot adók: Gly, β -Ala, His, γ -aminovajsav (GABA), Orn, Lys, ε -aminokapronsav (EACA).

2. táblázat: Az egy, illetőleg több OPA/MCE-származékot adó aminosavak mérésénél alkalmazott kromatográfiás körülmények

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	A-eluens, %	B-eluens, %
30	0	1,8	100	0
	10		0	100
	11			
	12		100	0
	17			

4.4.1.2. Az alifás monoaminok OPA/MCE-származékainak vizsgálata

Az etanolamin (HOEtA), a metilamin (MeA), az etilamin (EtA), a *n*-propilamin (nPrA), az *i*-propilamin (iPrA), a *n*-butilamin (nBuA), az *i*-butilamin (iBuA), a *szek*-butilamin (sBuA), a *terc*-butilamin (tBuA) esetében izokratikus elválasztás történt 100 % B-eluens alkalmazásával. Az elválasztás hőmérséklete 40 °C, az áramlási sebesség 1,8 ml/perc volt.

Az nHexA, az nHepA, az nOctA és a PhEtA esetében az O-2 és E-1 oszlopokat használtuk, 50 % B-eluens és 50 % AcN keverékét alkalmazva, 30 °C-on, az áramlási sebesség 1,2 ml/perc volt.

4.4.1.3. A poliaminok OPA/MCE-származékainak vizsgálata

A vizsgált poliaminok (PA) a következők voltak: Hisn, bisz(hexametilén)triamin (BHMTA), Agm, tiramin (Tyrn), Put, Cad, spermidin (Spd), spermin (Spm).

3. táblázat: Az OPA/MCE-poliaminok mérésénél alkalmazott kromatográfiás körülmények

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	A-eluens, %	B-eluens, %	AcN, %
30	0	1,8	100	0	0
	5		0	100	
	8			50	50
	15			100	0
	16				
	20				

4.4.2. Az OPA/ET-származékok vizsgálata

A vizsgálatok során, ha másképpen nem jelzem, az O-2 és E-2 oszlopokat használtuk.

4.4.2.1. Az egy OPA/ET-származékot adó aminosavak vizsgálata

A vizsgált AS-ak a következők voltak: Asp, Glu, Asn, Ser, Ala, Gln, Thr, Arg, Tyr, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu.

4. táblázat: Az egy OPA/ET-származékot adó aminosavak mérésénél alkalmazott körülmények

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	A-eluens, %	B-eluens, %	AcN, %
50	0	1,0	70	30	0
	1		50	50	
	6				0
	11				
	16				
	17		70	30	0
	25		70	30	0

4.4.2.2. Az egynél több OPA/ET-származékot adó aminosavak vizsgálata

A méréseket 50 °C-on, 1 ml/perc áramlási sebességgel végeztük.

- A His, Gly, β -Ala és GABA esetében 30 % A-eluens és 70 % B-eluens,
- az Orn és Lys esetében 70 % B-eluens és 30 % AcN keverékét alkalmaztuk, izokratikusan.

4.4.2.3. Az alifás monoaminok OPA/ET-származékainak vizsgálata

A vizsgált A-ok a következők voltak: HOEtA, MeA, EtA, nPrA, iPrA, nBuA, iBuA, *n*-amilamin (nAmA), *i*-amilamin (iAmA).

5. táblázat: Az etanol-, *n*- és *i*-C₁-C₅-aminok OPA/ET-származékainak mérésénél alkalmazott kromatográfiás körülmények

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	B-eluens, %	AcN, %
50	0	1,0	50	50
	5		30	70
	7			
	8		50	50
	16			

Az nHexA, az nHepA, az nOctA és a PhEtA esetében az O-1 és E-1 oszlopokat használtuk, 30 % B-eluens és 70 % AcN keverékét alkalmazva, 30 °C-on, az áramlási sebesség 1,2 ml/perc volt.

4.4.2.4. A poliaminok OPA/ET-származékainak vizsgálata

A vizsgált PA-ok a következők voltak: Agm, Hisn, Tyrn, Spd, Spm, Put, Cad, 1,7-diaminoheptán (DAH).

- a) A 20 (V/V)% MeOH-tartalmú reagenssel végzett vizsgálatok:

A mérések során az OPA/PA molarány 20/1 volt. Az E-1 és O-1 oszlopokat használtuk.

6. táblázat: A spermidin, a spermin, a putreszcin, a hisztamin, a kadaverin, az agmatin, a tiramin és az 1,7-diaminoheptán OPA/ET-származékai mérésénél alkalmazott kromatográfias körülmények

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	B-eluens, %	AcN, %
30	0	1,0	100	0
	5		50	50
	10			
	10,1		100	0
	18			

Az Spd, az Spm, a Put, a Cad, és a DAH OPA/ET-származékai mérése 30 °C-on, 30 % B-eluens és 70 % AcN eluensarány mellett történt, 1,0 ml/perc áramlási sebességgel.

b) A 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagenssel végzett vizsgálatok végzett vizsgálatok:

A mérések során az OPA/PA molarány 68/1 volt. Az E-2 és O-2 oszlopokat használtuk.

7. táblázat: A hisztamin, az agmatin és a tiramin, OPA/ET-származékai mérésénél alkalmazott kromatográfias körülmények

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	A-eluens, %	AcN, %
50	0	1,8	20	80
	10		15	85
	11		0	100
	12			
	13			
	21		20	80

4.4.2.5. Harminchét anyag egyidejű meghatározása

Az elválasztások során mindvégig az E-1 és O-3 oszlopokat használtuk.

Az elválasztott anyagok a következők voltak:

- AS-ak: Asp, Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, Ala, Tyr, Val, Met, Trp, Ile, Phe, Leu, Arg, Gly, His, GABA, Orn, Lys.
- Alifás A-k: MeA, EtA, nPrA, nBuA, nAmA, nHexA, nHepA, nOctA, DAH.
- Biogén A-k: Hisn, Agm, Tyrn, PhEtA, Put, Cad, Spd, Spm.

Az alkalmazott (A- és B-) eluensek vagy pH=7,2 vagy pH=9,2 értékűek voltak. (Az adott helyen jelölve.)

8. táblázat: Az ún. „hosszú gradiens” elúciós programja

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	MeOH, %	A-eluens, %	AcN, %	B-eluens, %
30/50	0,0	1,0	0	60	0	40
	0,5		0	60	0	40
	0,6		0	48	0	52
	4,0		0	48	0	52
	4,1		0	50	12	38
	16,0		0	50	12	38
	16,1		0	35	15	50
	19,0		0	35	15	50
	19,1		0	60	40	0
	29,0		0	35	65	0
	29,1		15	0	40	45
	35,0		15	0	40	45
	65,0		2	0	98	0
	69,0		2	0	98	0
	69,1		0	60	0	40
79,0	0	60	0	40		

9. táblázat: Az ún. „rövid gradiens” elúciós programja

Hőmérséklet, °C	Idő, perc	Áramlási sebesség, ml/perc	MeOH, %	AcN, %	B-eluens, %
30/50	0,00	1,0	0	55	45
	5,90		15	40	45
	29,00		4	86	10
	33,00		4	86	10
	33,10		0	55	45
	43,00		0	55	45

5. A kísérleti eredmények tárgyalása

5.1. Az OPA-reagensek szennyezései és eltarthatósága

5.1.1. Az OPA/MCE-reagens

Az irodalmi adatok szerint az SH-csoportú segédanyagot tartalmazó OPA-reagensek fluoreszkáló összetevőket nem tartalmaznak. Néhány hivatkozás [307–316] – az úttörő közleményt [15] is beleértve –, s a mi tapasztalataink [16,295,297–299,301,302,317–319] szerint is, sajnos ez nem így van.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatait azt mutatták, hogy az OPA/MPA- és az OPA/NAC-reagensek esetében [295,319], UV és FI detektáláskor egyaránt, szennyező összetevőkkel kell számolni. Célszerű, hogy az AS-ak és A-k eredményeinek tárgyalása előtt megvizsgáljuk az OPA/MCE- és OPA/ET-reagensek szennyezéseit és eltarthatóságát (10.–13. táblázat).

Az OPA/MCE=1/3 molarányú reagenssel, 90 perc és 27 nap közötti időtartamban, UV és FI detektálású vizsgálatok eredményei teljes összhangban vannak az OPA/MPA=OPA/NAC=1/3 molarányú reagens elemzésekor kapottakkal. A reagensből adódó szennyező csúcsok mennyisége és minősége a reagens korától és koncentrációjától függ. Ezért igen fontos tudni, hogy az azonos elkészítési és tárolási feltételek mellett, ugyanazon reagens esetében is, a szennyezések mennyisége és minősége változik (10. táblázat: reagens1 és reagens2). A korábbi tapasztalatokhoz [295] hasonlóan ebben az esetben is, az észlelt szennyezések nagysága, mennyiségük növekedésének, vagy csökkenésének mértéke és tendenciája is változhat a reagens tárolási idejétől függően. Ezért a szennyezők figyelembevétele, és AS- vagy A-csúccsal történő koelúció esetén, azok levonása elengedhetetlenül szükséges. Ez különösen akkor fontos, ha a mérendő anyag nyomnyi mennyiségben, s hozzá képest a reagens szennyező összetevője nagy feleslegben van jelen.

Mivel a reagensből eredő vak csúcsok mennyisége és minősége is változik, ezért műveleti üres (vak) felvételek készítése javasolt, naponta legalább kétszer.

Az OPA/MCE-reagensből adódó szennyező csúcsok száma és nagysága változik. 90 perc és 27 nap közötti időszakban, UV detektálás esetén összesen 33 pmol és 783 pmol között, illetőleg FI detektálás esetén 63 pmol és 473 pmol között változik (10. táblázat: *dőlt betűvel* szedett értékek). Egyértelmű, hogy előre nem tudhatjuk, melyik A vagy AS fog valamelyik reagensből adódó csúccsal koelúálni, mert ez függ a HPLC-rendszerrel, az alkalmazott oszloptól és a gradienstől is. Tehát a levonandó, szennyezőcsúcsokból eredő értékek nagysága függ a mérési feltételektől és a kromatográfiai rendszertől is.

5.1.1.1. A szennyezők mennyiségének függése a reagens összetételétől

Az OPA/MCE=1/50 mólarányú reagens ugyanazokat a szennyezéseket tartalmazza, mint az OPA/MCE=1/3 mólarányú. Az egyetlen különbség, hogy az előbbi kisebb, átlagban feleakkora számú szennyezést tartalmaz. Ez nem különösebben meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy az OPA reakciókészsége nagymértékben lecsökken az igen nagy feleslegben lévő SH-csoportú segédanyag jelenléte miatt [299].

5.1.1.2. A reagens optimális tárolási feltételei és élettartama, s ezek függése az SH-csoportú segédanyag milyenségétől

Az OPA/MCE-reagens hatóerejét, származékképző-képességét egy ismert összetételű Gly-oldat mérésével ellenőriztük (11. táblázat), csakúgy, mint az OPA/MPA- és OPA/NAC-reagens esetében [16,295,297–299,301,302,317–319].

Az így kapott eredmények azt mutatják, hogy a reagensek élettartama igen eltérő lehet. Míg a reagens1 esetében csak 8 napig, a reagens2 esetében 21 napig maximális válaszjelet mértünk. A mérés reprodukálhatóságát három különböző reagens alkalmazásával ellenőriztük, kis mérési hibával (1,5 RSD%). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az OPA/MCE-reagens 8 napig használható.

5.1.2. Az OPA/ET-reagens

Az OPA/ET=1/10 mólarányú, pH=9,30 értékű, 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagens tulajdonságait vizsgáltuk. Műveleti üres felvételeket készítettünk, különböző ideig (1 óra–16 nap időtartamig) tárolt reagensekkel. Hatóértékének ellenőrzéséhez Ala-t használtunk Gly helyett.

Elmondható, hogy az eredmények (12. és 13. táblázatok) teljes összhangban vannak az OPA/MPA-, az OPA/NAC és az OPA/MCE-reagensek vizsgálatánál tapasztaltakkal:

- a detektált szennyezések száma, mennyisége és minősége napról-napra, reagensről-reagensre változhat.
- A reagens hatóerejének biztonsága érdekében célszerű azt másnaponként, frissen készíteni.

5.2. Az aminosavak OPA-származékai

Kutatócsoportunk korábbi, sztöchiometriai és tömegspektrometriás tapasztalata alapján bebizonyosodott [299], hogy az aminocsoportú vegyületek alapszerkezete meghatározó az OPA-reagenssel keletkező termékek tekintetében: az $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ molekularészletet tartalma-

zók egynél több, az $\text{NH}_2\text{-CH=}$ alapszerkezetűek egyetlen terméket adnak. Ezért az AS-akkal kapcsolatos eredményeket a fentiek alapján csoportosítottuk.

5.2.1. Az egynél több OPA-származékot adó aminosavak

5.2.1.1. Származékkészítések az OPA/MCE-reagenssel

5.2.1.1.1. Az 1/3 molarányú OPA/MCE- reagens

A 14. táblázat alapján, az OPA/MCE=1/3 molarányokra vonatkozó adatok együttes elemzésekor az alábbi megállapítások tehetők:

Az integrátoregység/pmolban (ie/pmol) kifejezett válaszjelek alapján, a 7 perc után mért értékeket 100 %-nak véve kitűnik (14. táblázat), hogy

- (i) valamennyi vizsgált esetben az elsődlegesen keletkező származékok, a fluoreszcenciás (FI) intenzitások és az UV abszorbancia-értékek alapján egyaránt, további termékekké alakulnak.
- (ii) A Gly, a β -Ala és a GABA válaszjelei, valamennyi termékük összegét tekintve, a válaszjeleik szerint, rendre 45 %-ra és 45 %-ra, 42 %-ra és 42 %-ra, valamint 38 %-ra és 38 %-ra csökkentek.
- (iii) A hat, illetőleg öt csúcsban megjelenő Orn és Lys válaszjelei 69 % és 68 %, valamint 60 % és 61 % voltak.
- (iv) A várakozástól eltérően nagy stabilitásúnak bizonyult az alapállapotban $\text{NH}_2\text{-CH=}$ csoportú His, melynek válaszjele 75 perc után is 91 % és 91 % maradt. A His második csúcsa egy molekulán belüli átrendeződés eredménye. Az $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ reaktív forma kialakulásával, következésképp a két OPA-molekulát tartalmazó termék keletkezésével kapcsolatos [302].
- (v) Az EACA bizonyult a legbomlékonyabbnak: a 7 perc utáni elúciókban már nem volt mérhető.

5.2.1.1.2. Az 1/50 molarányú OPA/MCE-reagens alkalmazása

A vizsgálatokat a 1,5 perc reakcióidő utáni válaszjelek meghatározására is kiterjesztettük azzal a céllal, hogy a rövid idejű kölcsönhatások, cím szerinti reagens alkalmazásakor, esetleges jótékony hatását értékelhessük [304,305].

- (i) Az 1,5 perc alatt – a nagy koncentrációban jelenlévő SH-csoportú vegyületnek az OPA-primer amin reakció sebességét csökkentő hatása eredményeként – a 7 perchez viszonyítottához képest is, kisebb válaszjeleket mértünk.
- (ii) Az OPA-AS-ak esetében, sajnálatos módon, az elsődlegesen keletkező izoindol továbbalakulását sem jelentős mértékben visszaszorítani, sem a keletkező termékek

stabilitását növelni nem tudtuk. A His és az EACA termékeinek válaszjelei kivételnek bizonyultak, ám a továbbalakulás ezen esetekben sem volt elkerülhető (14. táblázat).

- (iii) Az Orn esetében a származékok száma hatról négyre csökkent.
- (iv) A Lys öt helyett hét származékot szolgáltatott, s a válaszjelek összege alapján mért stabilitások sem az Orn, sem a Lys esetében nem változtak.

5.2.1.2. Származékkészítések az 1/10 mólarányú, eltérő metanoltartalmú {20 (V/V)% és 80 (V/V)%} OPA/ET-reagenssel

Származékkészítéseinket 20 (V/V)% és 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagensekkel végeztük, abból a célból, hogy a különböző alkohol-koncentrációjú reagensekkel nyert termékek stabilitására gyakorolt hatását értékeljük [319].

Az ie/pmol-ban kifejezett (a Fl és az UV) válaszjelek alapján (15. táblázat, 8. ábra) az alábbi megállapítások tehetők:

- (i) valamennyi vizsgált esetben a keletkező termékek nagy stabilitásúak.
- (ii) A 80 (V/V)% alkoholtartalmú reagenssel kapott válaszjelek, az analitikailag szóba jöhető (1–23 perc) reakcióidők után 1–11 %-kal, a hosszabb idők (47–360 perc) elteltével mért értékek alapján 1–63 %-kal nagyobbak.
- (iii) Az elsődlegesen keletkező termékek stabilitása tekintetében, az általunk vizsgált valamennyi, eltérő tioltartalmú reagenssel kapott eseteket összehasonlítva az OPA/ET-termékeké a legnagyobb. Például, a 7 perc reakcióidő után a 20 (V/V)% MeOH-tartalmú reagenssel kapott Gly-származékokat tekintve látható, hogy a főtermékek aránya az OPA/MPA, az OPA/NAC [297], az OPA/MCE (14. táblázat) és az OPA/ET (15. táblázat) sorban, a 90 %, a 92 %, a 97 % és a 99 % arányában nő.
- (iv) A válaszjelek időben mért értékei a reagens alkohol-koncentrációjától nem függenek, s azt mutatják, hogy a Gly, a β -Ala és a GABA 1 perc, az Orn és a Lys 3–5 perc reakcióidők elteltével maximális válaszjelet adnak.
- (v) A His, a korábbi tapasztalatokkal összhangban [297,300,302], kezdettől fogva két terméket ad. E termékek együttes mennyisége az OPA/ET származék esetében, 43 perc után a legnagyobb. Az 1 perc és 43 perc után mért válaszjelek viszonyszáma, a reagens alkohol-koncentrációjától függetlenül, azonos (15. táblázat: $6,25/4,59=1,36$; $6,00/4,44=1,35$).
- (vi) Az egynél több OPA-származékot adó termékek válaszjeléről az SH csoportú segédanyag függvényében, azaz az OPA/MPA-, az OPA/MCE- és az OPA/ET-reagensekkel kapott válaszjelekről a 9. ábra tájékoztat. Az optimális kísérleti feltéte-

lek között készült származékok válaszjelei az OPA/ET-termékek esetében a legnagyobbak. Az OPA/ET származékok legnagyobb válaszjeleihez viszonyított (7 perc után mért értékek), az OPA/MPA- és az OPA/MCE-származékok válaszjelei, rendre 14–71 %-kal, és 27–74 %-kal kisebbek.

5.2.2. Az egyetlen OPA-származékot adó aminosavak

Amint az várható volt, az $\text{NH}_2\text{-CH=}$ molekularészletet tartalmazó AS-ak egyetlen OPA-származékot képeznek.

5.2.2.1. Reakció az OPA/MCE=1/3 és az 1/50 molarányú reagenssel

A 16. táblázat és a 10. ábra együttes elemzése alapján az alábbi megállapítás tehető:

- (i) Az OPA/MCE=1/3 reagenssel kapott válaszjelek az 1,5 perc és 7 perc reakcióidők után, analitikai szempontból, kivétel nélkül, a kísérleti hibák határain belül, stabilnak tekinthetők, s elfogadhatóak: a válaszjelértékek csökkenése kismértékű, a keletkezett elsődleges termékek stabilak: a válaszjel-csökkenés 109 perc után is ≤ 9 %.
- (ii) Általános tapasztalat, hogy az OPA/MCE=1/50 molarányú reagenssel a reakcióidő hosszabb, s a hosszabb reakcióidők után mért maximális válaszjelek értéke nem éri el az OPA/MCE=1/3 reagenssel nyert értékeket.

5.2.2.2. Reakció az OPA/ET-reagenssel

Cím szerinti származékkészítések során, az 5.2.1.2. fejezetben részletezett tapasztalatok alapján 80 (V/V)% metanoltartalmú reagenst, s az optimális reakciókörülmények felderítése érdekében eltérő reagensfelesleget használtunk. Az OPA/aminosav molarányok 120/1, 67/1 és 15/1 voltak.

A 17. táblázat és a 11. ábra áttekintésekor látható, hogy maximális válaszjelet az OPA/AS=67/1 molarány esetén kaptunk:

- 1 perc után a Met, a Trp, az Ile, a Ser, az Arg, a Tyr, az Ala, a Val, a Phe és a Leu,
- 3 perc után a Gln,
- 7 perc után a Glu, az Asn, a Thr és
- 10 perc után az Asp esetében.

Az OPA/MPA(NAC)-reagenssel végzett vizsgálatok [295] alapján úgy tűnt, hogy a keletkezett származékok válaszjelenek nagysága független az OPA/AS molaránytól. Az ET esetében ez árnyaltabbnak bizonyult, amennyiben az OPA/AS=67/1 aránynál kisebb molarányt alkalmazunk, akkor az a maximális válaszjel eléréséhez szükséges reakcióidő növekedésével (Asp,

Thr, Met, Trp, Ile) és a válaszjelértékének kismértékű csökkenésével jár (Gln, Thr, Met, Trp, Ile). A százhússzoros felesleget alkalmazva az Asp és az Ile esetében lassul a reakció (válaszjelük 50 perc és 10 perc után éri el a maximális értéket, szemben a 10 és 1 perccel), s a Gln, Thr, Met, Trp, Ile esetében kismértékben csökken a válaszjel értéke. Mindezekből kitűnik, hogy az egyetlen OPA-származékot szolgáltató AS-ak mérésekor az OPA/AS mólarány elsősorban a reakcióidő, másodsorban a válaszjel optimális, azonos szinten tartása érdekében célszerű.

5.2.3. Összehasonlító vizsgálatok az OPA/MPA=OPA/NAC= OPA/MCE=OPA/ET=OPA/2-merkaptotéanszulfonsav=1/3 mól arányú, 80 (V/V)% metanoltartalmú, 9,30 pH-értékű reagensek alkalmazásával

Az OPA/MPA-, az OPA/NAC- és az OPA/MCE-reagensekkel végzett vizsgálatok során a MeOH-tartalom mindvégig 20 (V/V)% volt. Minthogy az AS-ak OPA/ET-reagenssel adott válaszjelei a magasabb alkoholtartalmú reagenssel bizonyultak optimálisnak, ezért eme összehasonlító vizsgálatokat 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagensekkel végeztük. Az összehasonlításhoz választottunk egy egyetlen (Ala) és egy egynél több OPA-származékot adó AS-t (Lys).

A 2-merkaptotéanszulfonsavat (MESNA) azért vontuk be a vizsgálatba, mert egy irodalmi adat [320] szerint – a MCE alkalmazásakor mértékhez képest – ötször nagyobb válaszjelet adott.

A 18. táblázat eredményeiből, a 7 perc után mért FI válaszjeleket összehasonlítva látható, hogy

- (i) Az Ala és a Lys, az OPA/ET-reagenssel ad maximális válaszjelet (zárójelben, rendre $\mu\text{g}/\text{pmol}$ értékekben kifejezve):
 - a) Ala: OPA/ET (5,29) > OPA/MCE (4,60) > OPA/MPA (4,35) > OPA/NAC (3,56) > OPA/MESNA (2,77);
 - b) Lys: OPA/ET (5,98) > OPA/MCE (2,58) > OPA/MPA (1,81) > OPA/NAC (1,52) > OPA/MESNA (1,29).
- (ii) A magasabb, 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagenssel, 7 perc után (9. és 10. ábrák, 18. táblázat)

--az OPA/MCE-reagenssel az Ala esetében 1,09-szer ($4,60/4,21=1,09$), a Lys esetében 1,79-szer ($2,58/1,44=1,79$)

--az OPA/MPA-reagenssel az Ala esetében 1,19-szer kisebb ($5,19/4,35=1,19$), a Lys esetében 1,10-szer ($1,81/1,64=1,10$) nagyobb válaszjeleket mértünk.

(iii) Az OPA/MCE származékok időbeni stabilitása jelentősen megnőtt (14. és 18. táblázatok): az Ala és a Lys esetében is csak 220 perc után csökken annyira, mint a 20 (V/V)% metanoltartalmú reagenssel mérve 109 perc, illetőleg 75 perc után. {Ala, 80 (V/V)%: $3,31 (220 \text{ perc})/4,60 (7 \text{ perc})=0,72$ és 20 (V/V)%: $3,05 (109 \text{ perc})/4,21 (7 \text{ perc})=0,72$; Lys, 80 (V/V)%: $1,53 (220 \text{ perc})/2,58 (7 \text{ perc})=0,59$ és 20 (V/V)%: $0,87 (75 \text{ perc})/1,44 (7 \text{ perc})=0,60$ }

(iv) Az OPA/MESNA-reagenst alkalmazva kapjuk mindkét AS esetében a legkisebb válaszjeleket (Ala: 2,77; Lys: 1,29), melyek 140 percig nem változnak.

Az OPA/MCE-AS-származékok stabilitását a megfelelő OPA/MPA- [300] és OPA/ET-származékokéhoz viszonyítva (16. és 17. táblázat), utóbbi kettő termékeinek stabilitásbeli előnye egyértelmű. Különös tekintettel arra tényre, hogy az OPA/MPA- és az OPA/ET-termékek leghosszabb reakcióideje 6 óra volt, az OPA/MCE-származékok leghosszabb reakcióidejéhez (109 perc) viszonyítva.

5.3. Az aminok OPA-származékai

5.3.1. Az alifás monoaminok OPA-származékai

5.3.1.1. A C₁-C₄ aminok reakciója az OPA/MCE-reagenssel

A 19. táblázat, valamint a 12. ábra együttes elemzése alapján az alábbi megállapítások tehetők:

- (i) Az alifás, primer, C₁-C₄ monoaminok, az iBuA és a HOEtA, valamennyi tartalmazza az NH₂-CH₂- molekulaegységet. Következésképp, az elsődlegesen keletkező izoindol-származékaik, egy további OPA-molekulával való reakciója [299] – a megfelelő OPA/NAC- és OPA/MPA-származékokkal analógia alapján [16,295-299] –, várható volt.
- (ii) A szélsőségesen eltolt mólarányú, az OPA/tiol=1/50 összetételű reagens alkalmazása, az OPA-származékok összetételére vonatkozó sztöchiometriai, s az ezekkel szoros összhangban nyert tömegspektrometriás eredmények analitikai hasznosítása volt. Feltételeztük, hogy az elsődlegesen keletkező klasszikus izoindolnak egy további OPA-molekula felvételével járó átalakulása, az „aktuális/reaktív” OPA-koncentráció csökkentésével számottevő mértékben lassítható. Az alifás aminok OPA/MPA- és az OPA/NAC-származékai esetében e feltételezés analitikai szempontból hasznosítható volt [299].
- (iii) A származékok stabilitása az alifás lánc hosszával nő.
- (iv) Az sBuA és a tBuA eredeti molekuláiban, rendre az NH₂-CH=, illetőleg az NH₂-C≡ molekulaegységek alapján, mindkét esetben egyetlen OPA-származékot vártunk, mégis egynél több terméket mértünk. Ezek szerkezetének megismerése, analitikai szempontból másodlagos jelentőségű.
- (v) Az iBuA, sBuA és tBuA sorban a reakciókészség, térbeli okok miatt, számottevően csökken.
- (vi) Az OPA/MCE=1/50 mólarányú reagensnek az OPA/MCE=1/3 arányúhoz viszonyított előnye mind a válaszjelek nagysága, mind a reakciótermékek megnövekedett stabilitása tekintetében a 19. táblázat, s a 12. ábra alapján értékelhető.
- (vii) Az OPA/MCE=1/50 reagenssel 7 perc után mért válaszjelek, a MeA-sBuA sorban, az OPA/MCE=1/3 reagenssel nyerthez viszonyítva rendre: 6,8-szor (MeA), 2,2-szer (EtA), 3-szor (nPrA), 2,7-szer (iPrA), 3,9-szer (nBuA), 3,7-szer (iBuA) és 4-szer (sBuA) nagyobbak voltak.
- (viii) Amennyiben a stabilitás mértékét a 47perc és 87 perc után mért válaszjelek alapján értékeljük, úgy kitűnik, hogy az OPA/MCE=1/50 reagens alkalmazása esetén 37-

szer és 140-szer (MeA), 3,2-szer és 4,7-szer (EtA), 2,4-szer és 1,6-szor (nPrA), 1,7-szer és azonos (iPrA), 2-szer és 1,7-szer (nBuA), 3,4-szer és 3-szor (iBuA), valamint, 2,7-szer és azonos (sBuA) stabilitást mértünk.

- (ix) Az OPA/MCE=1/50 reagens alkalmazásával az elsődlegesen keletkező izoindol továbbalakulását nem tudtuk teljes mértékben visszaszorítani. Jóllehet az EtA esetében maradt a két termék, az iPrA-nál egy helyett kettő származékot kaptunk: mégis, a MeA és a tBuA esetében kettőről egyre, az nPrA, az nBuA, az iBuA és az sBuA eseteiben háromról kettőre csökkent a keletkező termékek száma.

5.3.1.2. A C₁-C₅ aminok reakciója az OPA/ET=1/10 molarányú, 80 (V/V)% metanoltartalmú reagenssel

A korábbi, az AS-akkal kapcsolatos vizsgálatokból kitűnt, hogy mind a stabilitás, mind a válaszjelek szempontjából, a cím szerinti reagens alkalmazása előnyös.

- (i) A korábbi, az OPA/MCE=1/50 molarányú reagenssel nyert válaszjeleket (19.táblázat) az OPA/ET=1/10 reagenssel mértékhez viszonyítva (20. táblázat, 13. ábra) kitűnt, hogy a legkisebb stabilitásúnak tartott MeA OPA/ET-származéka is 3 óráig azonos és magas válaszjelet szolgáltat (vö.: [298] és 19. táblázat). Amint az várható volt (20. táblázat), az elsődleges izoindol-származék (HOEtA1, MeA2, EtA2, nPrA2, iPrA1, nBuA2, iBuA2, nAmA2, iAmA2; λ_{\max} =334 nm) – bár csak igen kis mértékben – továbbalakul. S két OPA-molekulát tartalmazó termék (MeA1, EtA1, nPrA1, nBuA1, iBuA1, nAmA1, iAmA1; λ_{\max} =339 nm) keletkezik és megjelenik a dítioszármazék (HOEtA2, MeA3, EtA3, nPrA3, nBuA3, iBuA3, nAmA3, iAmA3; λ_{\max} =343 nm) is.
- (ii) Az összes vizsgált A esetében, már 1 perc után maximális válaszjelet mértünk; az iPrA kivételével, melynél az aminocsoport térbeli gátoltsága miatt ez 7 perc.

A 13. ábrán jól látszik, hogy valamennyi A esetében az OPA/ET-reagens alkalmazása előnyösebb, mint az OPA/MPA(NAC)-, illetőleg az OPA/MCE-reagensé.

5.3.1.3. Az n-C₆–C₈ és a β -feniletilamin OPA/MPA, OPA/NAC-, OPA/MCE- és OPA/ET származékainak összehasonlító elemzése

Vizsgálatainkat az OPA/MPA=OPA/NAC=1/3 és 1/50 molarányú, pH=9,3 értékű reagenssekkel indítottuk.

Az nHexA, az nHepA és az nOctA, OPA/MPA=OPA/NAC=1/3 molarányú reagenssekkel a klasszikus izoindol-származék (a 21.–23. táblázatokban 1-es számmal jelölt, λ_{\max} =334nm)

és annak átalakult – még egy OPA-molekulát tartalmazó – (21.–23. táblázatokban 2-es számmal jelölt) terméke keletkezik [16,295–299,317,318]. A két OPA-molekulát tartalmazó termék ($\lambda_{\max}=338\text{nm}$) az elsődleges izoindol-származék előtt jelenik meg. Ez az egynél több OPA-származékot tartalmazó AS-akhoz viszonyított nem várt tapasztalat [16,295–299,307,308]: az aminosavak két OPA-molekulát tartalmazó másodlagos terméke a klasszikus izoindol után eluálódik.

Az OPA/MPA=OPA/NAC=1/50 molarányú reagenseket azért alkalmaztuk, hogy az elsődleges izoindol még egy OPA-molekulát tartalmazó terméké alakulását megakadályozzuk, vagy annak mértékét csökkentjük [298]. Ehelyett egy új (a 21.–23. táblázatokban 0-val jelölt, $\lambda_{\max}=343\text{ nm}$) származék jelent meg, melynek retenciós ideje jelentősen kisebb, mint az elsődleges izoindolé, vagy a két OPA-molekulát tartalmazó termékeké.

Ezen tapasztalatok alapján, alapos összehasonlító vizsgálatot végeztünk a négy leggyakrabban alkalmazott (OPA/MPA-, OPA/NAC-, OPA/ET-, OPA/MCE-) reagenssel.

5.3.1.3.1. Az *n*-C₆–C₈- és a β -feniletamin reakciója az OPA/MPA=OPA/NAC=OPA/MCE=OPA/ET=1/3 molarányú (pH=9,3) reagenssekkel

A reagens összetételének és a reakcióidő függvényében végzett vizsgálatok eredményei a 21. táblázatban láthatóak.

- (i) Az OPA/MPA(NAC)-amin-származékokat tekintve {a 21. táblázat első két, függőleges oszlopában és a 14. ábra (A–D) első soraiban (az UV-kromatogramokon)} látható, hogy – az NH₂–CH₂– molekularészletet tartalmazó AS-aknál tapasztaltakkal [16,295–297,299] összhangban – az elsődleges termék (nHexA1, nHepA1, nOctA1, PhEtA1) továbbalakul (nHexA2, nHepA2, nOctA2, PhEtA2). Ezek a termékek korábban eluálódnak, valószínű, hogy erősebben poláris voltak miatt {14. ábra (A–C), retenciós rendek: nHexA2, nHexA1; nHepA2, nHepA1; nOctA2, nOctA1}. A PhEtA2 – a korábbi tapasztalatokkal összhangban [16, 295–297, 299, 319] – , a PhEtA1-et követően eluálódik {14. ábra (D), retenciós rend: PhEtA1, PhEtA2}.

Az elsődleges (1-es számmal jelölt) és a továbbalakult (2-es számmal jelölt) termék szerkezetét HPLC-ESI-MS felvételekkel igazoltuk {14. ábra (A–D), második és harmadik sora}. Minden amin esetében látható, az elsődleges termék protonált molekulaionja (MH⁺) {14. ábra (A–D) harmadik sor, HexA, HepA, OctA, PhEtA; m/z értékek rendre: 306,2; 320,2; 334,3; 326,2}. Továbbá, látható a továbbalakult – még egy OPA-molekulát tartalmazó – termék protonált molekulaionja (MH⁺+OPA) {14. ábra (A–D) második sor, m/z értékek rendre:

440,3; 454,3; 468,4; 460,2}, annak dehidratált ($MH^+ + OPA - H_2O$) és/vagy kationos formája ($MNa^+ + OPA$). Az elsődlegesen keletkező izoindol-származék, még egy OPA-molekulát tartalmazó terméké alakulásának mechanizmusát kutatócsoportunk már korábban leírta [299].

- (ii) A vizsgált A-k OPA/NAC-származékairól elmondható (21. táblázat második függőleges oszlopa) – újfent bizonyítva a korábbiakat [295-299,308] –, hogy válaszjeleik kisebbek és elsődleges termékeik stabilabbak, mint az OPA/MPA-származékoké.
- (iii) Azért, hogy az összehasonlítás megalapozott legyen, a nHexA–nOctA és PhEtA OPA/MCE- és OPA/ET-származékait (21. táblázat harmadik és negyedik függőleges oszlopa) is szigorúan azonos körülmények között vizsgáltuk.

Az így kapott eredmények alapján elmondható, hogy

- (i) az OPA/MCE-származékok bizonyultak a legkevésbé stabilnak. Az elsődleges termékek bomlása már 7 perc után megmutatkozik. Az 1,5 perc és a 7 perc után, ie/pmol-ban mért válaszjeleket tekintve, leginkább a nHexA (4,84; 4,58) és a PhEtA (5,19; 4,33) esetében.
- (ii) Az OPA/ET-származékok stabilitása ugyanolyan, mint a megfelelő OPA/MPA-, vagy OPA/NAC-származékoké. Kiegészítve azzal, hogy a képződő melléktermékek mennyisége elhanyagolható. Az nHexA és nHepA esetében átalakulást nem mérünk. Az nOctA1 és PhEtA1 átalakulása nOctA2-vé és PhEtA2-vé is kismértékű.

5.3.1.3.2. Az *n*-C₆–C₈- és a β -feniletilamin reakciója az

OPA/MPA=OPA/NAC=OPA/MCE=OPA/ET=1/50 molarányú reagenssokkal

5.3.1.3.2.1. Vizsgálatok az OPA/MPA=1/50 molarányú reagenssel, a pH függvényében

Korábban is tapasztaltuk már, hogy az OPA/RSH molarány növelése az alifás C₁–C₄ A-k esetében jótékony hatású {[298]és 19 táblázat}, ezért először az OPA/MPA=1/50 molarányú (pH=9,3) reagenssel végeztünk vizsgálatot (22. táblázat 2. oszlopa).

- (i) Amint az látható, a még egy molekula OPA-t tartalmazó (a 22. táblázatban 2-es számmal jelölt) melléktermék mennyisége erősen csökkent, az OPA/MPA=1/3 molarányú reagenssel mértekhez képest. Válaszjel-százalékban kifejezve, a 7 perc után mérteket összehasonlítva, a nHexA esetében 0,0 % vs. 15,8 %, a nHepA és nOctA esetében 0,1 % vs. 10,5 % és 10,9 %. Jelentős mennyiségben keletkezett egy új (a 22. és 23. táblázatokban 0-val jelölt) termék, mely képződésének mértéke függ

a reagens/reakcióközeg pH-értékétől (Megjegyzés: minthogy a reagens és a mérendő minta térfogataránya 1/10 volt, ezért a reakcióközeg pH-értékét a nagy pufferkapacitású reagens pH-értéke szabta meg).

- (ii) A reakcióközeg pH-értékének hatását tekintve (vö. a 22. táblázatban, az átalakult termékek arányait, pH=8,80; 9,30; 9,75; 10,25;) látható, hogy minél nagyobb az oldat pH-értéke, annál kisebb a melléktermékek keletkezésének mértéke. Az analitikai szempontból jelentős 7 perc reakcióidő után, pH=10,25-ös reakcióközegben, a mellékreakciók teljesen visszaszoríthatóak (nHexA2, nHepA2, nOctA2), vagy csökkenthető a mértékük (nHexA0: 1,1 %; nHepA0: 2,9 %; nOctA0: 0,8 %).

Érdekesnek tűnt a Gly-t és az Ala reakciója az OPA/MPA=1/50 molarányú reagenst alkalmazva. Ennek elméleti jelentősége van, mivel az OPA/RSH=1/50 molarányú reagens használata az AS-ak esetében nem előnyös. Az Ala0 és a Gly0 megjelenésére alapozva, feltételezhetjük, hogy ez a termék megjelenhet a többi (egyetlen, illetőleg egynél több OPA-származékot adó) AS esetében is. A 10,25-ös pH-értékű reakcióközegben végzett származék-készítés, a melléktermékek képződésének visszaszorítása szempontjából a legelőnyösebb.

- (iii) A származékok spektrális jellemzőit tekintve (15. ábra) elmondható, hogy
- az elsődlegesen keletkező termék a klasszikus izoindol, melynek elnyelési maximuma 333,9 nm (15. ábra, HexA1, HepA1, OctA1; a 21.–23. táblázatokban 1-es számmal jelölve).
 - A klasszikus izoindol továbbá alakul, s még egy OPA-molekula beépülésével – korábban [298,299], az AS-ak és aminok esetében is (az OPA/MPA=OPA/NAC=1/3 molarányú reagenst alkalmazva) – azonosított termék keletkezik, melynek elnyelési maximuma 338,9 nm (15. ábra, HexA2, HepA2, OctA2; a 21.–23. táblázatokban 2-es számmal jelölve).
 - Most először azonosítottunk egy, az OPA/RSH=1/50 molarányú reagensek alkalmazásakor, a reakcióközeg pH-értékétől függő mennyiségben keletkező terméket. Elnyelési maximuma 343,5 nm (15. ábra, HexA0, HepA0, OctA0; a 21.–23. táblázatban 0-val jelölve). A HPLC-vel most először azonosított termékről feltételeztük, hogy az ditioszármazék.

Ez a feltevés az alábbiakra alapozható:

- Egyetlen olyan közlemény van [322], amelyben az nPrA OPA/di-*terc*-butiltiol-származékát azonosítják, s annak elnyelési maximumát 344 nm-nek adják meg.
- Az ilyen típusú vegyületek keletkezése – a mi gyakorlatunk során – egyértelműen az OPA-reagensben levő SH-csoportú segédanyag jelentős feleslegének tudható be.

- 3) A C₃–C₈ aminok OPA/ET-reagenssel képzett ditioszármazékait GC-MS-sel azonosították [323].
- 4) A C₆–C₈ aminok OPA/MPA=1/50 molarányú (pH=8,8) reagenssel képzett származékainak összetételét HPLC-ESI-MS mérésekkel igazoltuk {16. ábra (A–C)}.

A 16. ábra (A–C) első sorában a 334 nm-en detektált UV kromatogramok láthatóak. A második sorában a még egy MPA-molekulát tartalmazó (HexA0, HepA0, OctA0) melléktermék, a harmadikban pedig az elsődlegesen keletkező izoindol (HexA1, HepA1, OctA1) protonált molekulaionja látható.

Az eredmények mindhárom esetben egyértelműen bizonyítják a két tiolmolekulát tartalmazó (MH⁺+MPA; HexA0, HepA0 és OctA0-ként jelölt) ditioszármazék meglétét. Keletkezésének reakciója a 17. ábrán látható.

A ditioszármazékkal együtt {16. ábra (A–C) második sora} azonosítható volt a belőle egy MPA-molekula vesztésével keletkező töredékion. {16. ábra (A-C), HexA0: M⁺+MPA–2H=m/z=410,1 és M⁺=305,2; HepA0: M⁺+MPA–2H=m/z=424,2 és M⁺=319,2; OctA0: M⁺+MPA–2H=m/z=438,2 és M⁺=333,2}.

A ditioszármazékok mellett, újfent azonosítottuk az elsődlegesen keletkező izoindol-származékokat is {16. ábra (A-C), HexA1: MH⁺=m/z=306,2; HepA1: M⁺=m/z=320,2; OctA1: MH⁺=m/z=334,2}.

5.3.1.3.2.2. Vizsgálatok az OPA/NAC=OPA/MCE=OPA/ET=1/50 molarányú (pH=8,8 és 9,3) reagensekkel

Az OPA/MPA=1/50 molarányú reagenssel tapasztaltak alapján érdekesnek ígérkezett a cím szerinti reagensekkel képzett származékok elemzése, szigorúan azonos feltételek között.

A származékképzés pH-értékeit (pH=8,8 és 9,3) a 22. táblázat eredményei alapján választottuk, abból a célból, hogy a reagens összetételének, a termékek minőségére és mennyiségére gyakorolt hatását értékeljük (23. táblázat).

- (i) A ditioszármazékok válaszjeleit összehasonlítva (HexA0, HepA0 és OctA0 a 22. és 23. táblázatban) látható, hogy az MPA-t NAC-ra, majd MCE-re cserélve, értékeik csökkennek. Ugyanez tapasztalható ha a pH-t 8,80-ról 9,30-ra növeljük. Az ET esetében a rövid reakcióidők után a ditioszármazék nem detektálható.

Az *n*-C₆–C₈ aminok és a PhEtA OPA/RSH=1/50 molarányú reagensekkel képzett származékainak válaszjeleit általánosan értékelve (22. és 23. táblázatok), egyértelmű, hogy

- (ii) a lecsökkent szabad OPA-koncentráció jótékony hatása [298] kizárólag az OPA/MPA-reagens (pH=10,25) esetében tapasztalható.

- (iii) A kevésbé stabil OPA/MCE-származékokat tekintve elmondható, hogy a pH=8,80 értékű reagens csökkent reakciókészsége folytán, csökkent a stabilitásuk és a válaszjelük értéke is.
- (iv) Az *n*-C₆–C₈ aminok és a PhEtA OPA-származékai közül, mind a termékek száma, mind stabilitása tekintetében az OPA/ET=1/3 (pH=9,3) reagenssel nyert válaszjelek bizonyultak a legígéretesebbnek (21.–23. táblázatok).

Mindezek alapján, az *n*-C₆–C₈ és a PhEtA eltérő mennyiségeinek mérési reprodukálhatóságát az OPA/ET=1/3 mólarányú (pH=9,3) reagenssel mértük: az injektált 8–1800 pmol tartományban, RSD≤4,7 % (24. táblázat).

5.3.2. A biogén aminok OPA-származékai

5.3.2.1. A biogén aminok reakciója az OPA/MCE-reagenssel

A BA-k OPA/MCE-származékai a várttól számottevően eltérő sajátosságúaknak bizonyultak (25. táblázat, 18. ábra)

- (i) Az AS-akhoz és az alifás monoA-khoz képest maximális válaszjel-értékeket, – a kísérleti körülményeink adta lehetséges legrövidebb, – 1,5 perc reakcióidők után mértünk (a Put, a Cad és a BHMTA OPA/MCE=1/3 arányú reagenssel, illetőleg a Put, a Cad és az Spd OPA/MCE=1/50 arányú reagenssel képzett származékok kivételével).
- (ii) Egyazon BA 1,5 perc reakcióidő után mért válaszjelei, a különböző mólarányú reagensekkel képzett származékok esetén, számottevően nem különböznek (a Put, a Cad és Spd FI válaszjelei kivételével).
- (iii) A különböző mólarányú reagensekkel képzett származékok stabilitása, azaz a megfelelő válaszjelek időbeni csökkenése, a Put és a Cad esetében nem függ a reagens összetételétől, az összes többi biogén amin esetében igen.
- (iv) A Hisn, az Agm, a Tyrn, az Spm és a Cad esetében kettő, a Put és a Spd esetében három, a BHMTA esetében pedig öt termék keletkezett, az OPA/MCE=1/3, s az OPA/MCE=1/50 reagensekkel egyaránt. Összhangban a korábbi tapasztalatokkal, minthogy valamennyi vegyületben megtalálható a NH₂–CH₂– molekularészlet, amely feltétele az elsődlegesen keletkező izoindol továbbalakulásának [298,299].

5.3.2.2. A biogén aminok reakciója az OPA/ET=1/3 mólarányú, pH=9,3 értékű, 20 (V/V)% és 80 (V/V)% metanoltartalmú reagensekkel

A Put, a Cad, a Hisn, az Agm, a Tyrn és a DAH eredményeit tekintve elmondható, hogy a reagens MeOH-tartalmát 20 (V/V)%-ról (26.táblázat) 80 (V/V)%-ra (27. táblázat) növelve,

- (i) a termékek száma (pl. a Put és a Cad esetében négyről kettőre) csökkent; egyetlen kivétel a Tyrn (kettő helyett három termék keletkezik).
- (ii) A legelőnyösebb különbség, hogy az elemzés szempontjából lényeges 1,5–3 perc reakcióidők után, a klasszikus izoindol mennyisége $\geq 99,5\%$
- (iii) Minden vizsgált BA és a DAH esetében a mérések adta legrövidebb (1,5 perces) reakcióidő után, a mérés hibahatárán belül, maximális válaszjel mérhető.
- (iv) Az μmol -ban kifejezett válaszjeleket tekintve az Agm-é nem változott, a Hisn-é és a Tyrn-é kisebb, a Put, a Cad és a DAH {80 (V/V)%: 9,83 és 0,79; 20 (V/V)%: 5,59 és 0,41} esetében magasabb értékeket mértünk.
- (v) A válaszjel-arányok időbeni változását összehasonlítva látható, hogy a magasabb MeOH-tartalmú reagens alkalmazása az elsődleges termékek stabilitását növeli. {Pl. a Tyrn esetében a leghosszabb reakcióidő (6 h) után is kevesebb, mint 7,5 %-ot változott, szemben a több, mint 37 %-kal, amit az alacsonyabb MeOH-tartalmú reagens alkalmazásakor mértünk (110 perc után).}

Az eddigi eredményeket {[298], 25.–27. táblázatok, 19. ábra} összehasonlítva látható, hogy az Agm kivételével, a Put a Cad, a DAH, a Hisn és Tyrn esetében az OPA/ET-reagens alkalmazása előnyösebb, mint az OPA/MPA(NAC)- illetve az OPA/MCE-reagensé.

5.4. Biogén aminok meghatározása aminosavak jelenlétében

A Put, a Cad, a Spd és a Spm OPA/MPA-származékokkénti, az Spd- és az Spm-származékok megóvása érdekében, 10 °C hőfokon kivitelezendő elválasztása, gyakorlati szempontból alárendelt jelentőségű [324].

5.4.1. Biogén aminok reakciója OPA-MPA- és OPA/ET reagen- sekkel

A BA-k OPA/MPA- és OPA/ET-reagensekkel nyert válaszjelei arra hívták fel a figyelmet, hogy e származékok az OPA/ET reagenssel mérhetőek előnyösebben. Ez igaz, mind a válaszjelek nagysága, mind a termékek stabilitása és reprodukálhatósága tekintetében (20. ábra és 28. táblázat). Egyidejűleg, e vizsgálatok eredményei alapján az is bebizonyosodott, hogy amennyiben a Spm válaszjelét a többi biogén amin szintjére kívánjuk emelni úgy, a szekunder aminocsoportjai származékká alakítása elkerülhetetlen. (20. ábra és 28. táblázat: az Spm válaszjele kevesebb, mint egytizede a többi biogén aminéhoz képest).

5.4.2. Biogén aminok reakciója az OPA/ET/FMOC-reagenssel

Elővizsgálataink, amelyeket az OPA/MPA/FMOC- és az OPA/MCE/FMOC-reagensekkel végeztünk, sem az elválasztás, sem a válaszjelek tekintetében nem voltak biztatóak (21. ábra). A korábban részletezett eredmények alapján, a legkedvezőbb megoldást, az OPA/ET/FMOC-származékok elemzésétől várhattunk. Ezért, a kétlépcsős származékkészítést a továbbiakban, első lépésben az OPA/ET-, második lépésben az FMOC-reagensekkel, ~20% metanoltartalmú reakcióelegyben modelleztük (22. ábra és 29. táblázat). A BA-k OPA/ET/FMOC-származékait szimmetrikus csúcsokként elemezhetjük (22. ábra), melyek széles koncentrációtartományban kitűnően reprodukálható válaszjeleket adtak: $RSD \leq 3,9\%$ (29. táblázat).

5.4.3. A biogén aminok OPA/ET/FMOC-származékainak együt- tes elemzése az ornitinnel és a lizinnel

A BA-k, az Orn, és a Lys meghatározása – a többi szabadállapotú, fehérjealkotó aminosav jelenlétében – biológiai szövetekben, egyidejű elemzésük igényével indult. Az Orn, a Lys, és dekarboxilezett termékeik (Put és Cad) együttes elemzése, átalakulásuk nyomon követése céljából volt kívánatos.

- (i) A BA-k (Put, Cad, DAH, Spd, Spm), az Orn és a Lys OPA/ET/FMOC-származékokkénti elemzésekor kitűnt, hogy az Orn és az Lys, nagyszámú, nem várt

szerkezetű termék keletkezése közben reagál. A klasszikus, izoindolra jellemző, 334 nm-en maximumot adó termékek mellett a FMOC-származékokra jellemző, 262 nm-en maximumot adó terméke(ek) is megjelennek. E nem kívánt termékek keletkezését elkerülendő további modellvizsgálatok váltak szükségessé.

- (ii) Az OPA/ET-reagens mólarányát (1/1)–(1/50)-ig változtatva bebizonyosodott, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/ET-származékok (23. ábra: Orn1 és Lys1) különféle származékokká (23. ábra: Orn2–5 és Lys2–5) alakulnak. Ezen melléktermékek képződése, bár az OPA/ET mólaránnyal szabályozható, teljesen nem szorítható vissza. Minél nagyobb az ET mennyisége az OPA-éhoz képest, annál kisebb mértékben keletkeznek a melléktermékek. Az OPA/ET=1/50 mólarányú reagens alkalmazásakor a legkisebb az átalakulás mértéke. Ugyanakkor, ezen lelassult reakció során is képződnek melléktermékek (23. ábra: Orn2–5 és Lys2–5). A kétlépcsős származékképzés további optimalizálását a reakcióelegy MeOH-tartalmának változtatásával folytattuk.
- (iii) Ezen módosítás két szempontból is meghatározónak bizonyult: a reakcióelegy alkoholtartalmának növelésével kisebb számú és mennyiségű melléktermék keletkezett (24. ábra). Valamint a reagens MeOH-tartalmának 38 (V/V)%-ról 80 (V/V)%-ra növelése azzal az előnnyel is járt, hogy a reakcióelegy az FMOC-oldat hozzáadása után is áttetsző maradt.

Mindezek alapján az AS-ak és az (alifás, illetőleg biogén) A-k további vizsgálatát az OPA/ET=1/10 mólarányú, 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagenssel folytattuk.

5.4.4. A putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin, a spermin, az ornitin és a lizin OPA/ET/FMOC-reagenssel képzett származékainak stabilitásvizsgálatai

Az 5.4.1.–5.4.3. fejezetekben leírt eredmények alapján, a cím szerinti termékek stabilitásvizsgálatát 80 (V/V)% metanoltartalmú reagenssel végeztük, a reakcióidő, valamint a kétlépcsős származékképzés pH-értékének függvényében.

- (i) Első lépésként a Hisn, az Agm, a Tyrn, a Put, a Cad és a DAH OPA/ET-származékainak egyenkénti vizsgálatát, 80 (V/V)% MeOH-tartalmú reagenssel végeztük. Annak érdekében, hogy az esetleges, igen kis mennyiségben keletkező melléktermékeket is nyomon tudjuk követni (27. táblázat). Az eredményekből látható,

hogy az 1,5 perc és 3 perc reakcióidők alatt az elsődleges termékeknek kevesebb, mint egy válaszciklus százaléka alakul át.

- (ii) A következő lépés, a második származékképzési lépcső optimális feltételeinek (a reagens FMOC-tartalmának és pH-értékének) vizsgálata.
- (iii) Az OPA/ET/FMOC-mólarányt változtatva az (1/10/0,06)–(1/10/0,6) tartományban {80 (V/V)% MeOH-tartalmú, pH=9,30 értékű reagenssel} végeztünk vizsgálatokat. Annak érdekében, hogy a Spm esetében maximális válaszjelet kapjunk, az OPA/FMOC mólaránynak legalább 1/0,3-nak kell lennie (25. ábra).
- (iv) A Put-t, a Cad-ot, a Spd-t és a Spm-t egyidejűleg vizsgáltuk pH=8,6; 9,2; 9,6 és 10,6 értékű reagensekkel. Bebizonyosodott, hogy az OPA-val történő reakció (s az elsődleges termék keletkezése) gyors és kvantitatív a vizsgált pH-tartományban (8,6–10,6). Ugyanez az FMOC esetében csak a pH=9,2–9,6 tartományban mondható el (26. ábra). Ezek alapján a reakció optimális pH-értékének 9,3–9,4-et választottuk.
- (v) A Spd és Spm OPA/ET/FMOC-származékai stabilitását vizsgáltuk az egyes származékképzési lépések (OPA+FMOC) időtartamának függvényében, 1+1 perc és 3+1 perc reakcióidők után. Az OPA/ET-reagenssel 1 perc és 3 perc után különbség nem tapasztalható. Ezért, az OPA/ET/FMOC-származékokat 1+1; 1+3; 1+7; 1+16; 1+32; 1+64 percnél vizsgáltuk (30. táblázat, 26. ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy a származékok stabilitása, analitikai szempontból, kiváló. A kezdetben keletkező termékek továbbalakulása nem több, mint egy válaszciklus százaléka.

5.4.5. Az ornitin, a lizin, a putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin OPA/ET/FMOC- származékai összetételének tömegspektrometriás azonosítása

5.4.5.1. A spermidin és a spermin OPA/ET/FMOC- származékának abszorbanciája

Az Spd és az Spm OPA/ET/FMOC-származékainak vizsgálatakor, a 190–400 nm tartományban e termékek két maximumértéket mutatnak: 334 nm-nél és 262 nm-nél. A különböző metanoltartalmú {38–80 (V/V)%} reagensek alkalmazásakor kapott abszorbancia-értékeket áttekintve látható, hogy azok egymással és az FMOC-csoportok számával összhangban vannak (31. táblázat). Az OPA/ET/FMOC-Spd-származékának 262 nm-en (az FMOC-cal történő jelölés karakterisztikus maximumán) mért abszorbanciája kétszer, az OPA/ET/FMOC-Spm-származéké háromszor akkora, mint a 334 nm-en (az elsődleges izoindol-származék jellemző

maximumán) mért értéke. Ez azt jelenti, hogy a két izoindolegység moláris abszorbanciája közelítőleg akkora, mint egy FMOC-egységé.

5.4.5.2. Az ornitin, a lizin, a putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin OPA/ET/FMOC- származékai összetételének on-line HPLC-DAD-ESI-MS vizsgálata

A BA-kat és a DAH-t közös oldatból, az Orn-t és Lys-t külön-külön oldatból elemeztük (27. ábra A–F; 28. ábra Orn: A–F, Lys: A–F).

5.4.5.2.1. A putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin OPA/ET/FMOC- származékai összetételének on-line HPLC-DAD-ESI-MS vizsgálata

A BA-k és a DAH esetében a mérések, a származékok általunk feltételezett szerkezetét igazolták (27. ábra A–F). A 27. ábra első (A) sorában a BA-k és a DAH 334 nm-en felvett kromatogramja, a többi (B–F) sorban, a képződött termékek tömegspektruma látható az elúciók sorrendjében.

A protonált, illetőleg a káliummal képződött molekulaionjaik a következők:

- 27. ábra B sora: Put: $MH^+ = 409,3 = [Put]([OPA] - [ET])_2$; $MK^+ = 447,2$
- 27. ábra C sora: Cad: $MH^+ = 423,3 = [Cad]([OPA] - [ET])_2$; $MK^+ = 461,2$
- 27. ábra D sora: DAH: $MH^+ = 451,3 = [DAH]([OPA] - [ET])_2$; $MK^+ = 489,3$
- 27. ábra E sora: Spd: $MH^+ = 688,3 = [Spd][FMOC]([OPA] - [ET])_2$; $MK^+ = 726,3$
- 27. ábra F sora: Spm: $MH^+ = 967,5 = [Spm][FMOC]_2([OPA] - [ET])_2$; $MK^+ = 1005,5$

5.4.5.2.2. Az ornitin és lizin OPA/ET/FMOC- származékai összetételének on-line HPLC-DAD-ESI-MS vizsgálata

Az Orn és Lys, OPA/ET/FMOC-származékainak elemzése azt mutatta, hogy termékeik analóg reakció során képződnek (28. ábra A–G, jelölve, hogy Orn vagy Lys). Az egymásnak megfelelő származékok m/z -értékei mindösszesen $\{m/z(-CH_2)-\} 14$ tömegegységgel különböznek. (Megjegyzés: A HPLC-MS- és HPLC-DAD-FI-felvételek eltérő oszlopokon és készülékekkel készültek. A HPLC-MS-felvételeknél azonos pH-értékű, de tízszer hígabb ammónium-acetát eluent alkalmaztunk, szemben a szokásos A-eluenssel. Ezen különbségek miatt a 28. ábrán, illetőleg a 23. és 24. ábrákon látható származékok aránya eltérő, ám az elúciós sorrendjük azonos.)

Értékelve az UV kromatogramokat (28. ábra A,C) és a megfelelő tömegspektrumokat (28. ábra B,D–G):

- a 28. ábra „A” részein az elsődleges izoindol-származék (OPA-ET-Orn és OPA-ET-Lys) UV kromatogramja, a „B” részeken a megfelelő protonált, illetőleg nátriumkationos molekulaionjai látható. Orn1: $MH^+ = 453,2 = [Orn]([OPA]-[ET])_2$; $MNa^+ = 475,2$; $[MH-COO]^+ = 409,3$; Lys1: $MH^+ = 467,3 = [Lys]([OPA]-[ET])_2$; $MNa^+ = 489,3$; $[MH-COO]^+ = 423,3$;

A továbbalakult Orn- és Lys-termékek a 28. ábra „C” részein az UV-kromatogramok (Orn2–5 és Lys2–5), a „D”–„G” részeken a termékek tömegspektruma látható.

Mielőtt további részletekbe mennénk, meg kell jegyeznünk, hogy a az Orn2–5 és Lys2–5 termékek, mind „vegyes” termékek, vagyis részben izoindol-, részben FMOC-származékok:

- 28. ábra „G” részei: ezek a termékek a legegyszerűbb szerkezetű „vegyes” származékok:
Orn5: $MH^+ = 497,2 = [OPA][ET][FMOC][Orn]-H_2O$; $MK^+ = 535,2$;
Lys5: $MH^+ = 511,2 = [OPA][ET][FMOC][Lys]-H_2O$; $MK^+ = 549,2$;
- 28. ábra „F” részei: az Orn4 és Lys4 termékek, egyik aminocsoportja a klasszikus izoindol, ami (az NH_2-CH_2- szerkezetre jellemzően) még egy molekula OPA-t tartalmaz, a másik aminocsoportjuk FMOC-származék:
Orn4: $MH^+ = 631,2 = ([OPA][ET])[OPA][FMOC][Orn]-H_2O$; $MK^+ = 669,2$;
Lys4: $MH^+ = 645,3 = ([OPA][ET])[OPA][FMOC][Lys]-H_2O$; $MK^+ = 683,2$;
- 28. ábra „E” részei: az Orn3 és Lys3 termékek szerkezete nem azonosított, feltehetőleg az Orn4 és Lys4 termékek fragmentumai, minthogy a maximális intenzitású ionjaik közösek:
Orn3: $MH^+ = 467,3$; $MK^+ = 505,2$;
Lys3: $MH^+ = 481,3$; $MK^+ = 519,2$;
- 28. ábra „D” részei: az Orn2 és Lys2 termékek tömege az Orn5-ből és a Lys5-ből egy COOH-részlet vesztésével keletkezik:
Orn2: $MH^+ = 452,2 = [OPA][ET][FMOC][Orn]-[COOH]$; $MK^+ = 490,2$;
Lys2: $MH^+ = 466,3 = [OPA][ET][FMOC][Lys]-[COOH]$; $MK^+ = 504,2$;

5.4.5.3. Az α,ω -diaminokarbonsavak OPA/ET/FMOC-származékainak elemzése

Mivel az Orn és a Lys OPA/ET-származékai az FMOC-cal is reagálnak, megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy más SH-csoportú segédanyag alkalmazásakor, illetőleg egyéb

α,ω -diaminokarbonsav esetében is várható-e vegyes termékek keletkezése. Valamennyi eddig vizsgált fehérjealkotó AS-sel egyenként elvégeztük a kétlépcsős származékképzést, nemcsak az OPA/ET-, hanem az OPA/MPA-, illetve OPA/MCE-reagenssel is. Minden vizsgált esetben, az Orn és a Lys OPA/ET-származékainak kivételével, FMOC-tartalmú termék képződését nem tapasztaltuk. Ezek alapján feltételeztük, hogy ebben a nem várt reakcióban a két aminocsoportot tartalmazó AS-eknek, és az OPA-reagens semleges végcsoportú tioljának (vagyis az ET-nak) van szerepe.

Ezt a feltételezést igazolandó, egyenként vizsgáltuk az 1,3-diaminopropionsav (DAPA), a 2,4-diaminobutánsav (DABA) és a 2,6-diaminopimelinsav (DPIA) viselkedését a kétlépcsős – első lépésben OPA/ET-vel, második lépésben az FMOC-cal végzett) származékképzés után.

Mind a HPLC-FI-DAD, mind a HPLC-DAD-ESI-MS mérések eredményei azt mutatták, hogy mindhárom AS esetében a klasszikus, kettős izoindol-származékon kívül egyéb „vegyes” származék is képződik. A DAPA és a DABA esetében több, a DPIA esetében (29. ábra A–F) három „vegyes” származék keletkezett. Mivel a DPIA-ban két karboxilcsoport található, ezért jellemző retenciós tulajdonságú származékokat detektáltunk (29. ábra A,C). A klasszikus, kettős izoindol-származék (Dpia1) a reagenscsúcs előtt eluálódott (29. ábra „A” része). Rendre ezt követte a 29. ábra „C” részén látható, egyszerű „vegyes” származék (Dpia2), a még egy molekula OPA-t tartalmazó izoindol (Dpia3) és az egyszerű „vegyes”-származék dekarboxileződésével keletkező (Dpia4) termék. A Dpia1–4 származékok tömegspektrumain (29. ábra: B, D–F) a protonált és a káliumkationos molekulaionok láthatóak:

- a 29. ábra „B” része: a Dpia1 tömegspektruma: $MH^+ = 511,2 = [Dpia]([OPA][ET])_2$.
- A 29. ábra „D” része: a Dpia2 tömegspektruma az egyszerű „vegyes” termék dehidratált formája: $MH^+ = 554,2 = [OPA][ET][FMOC][Dpia] - H_2O$; $MK^+ = 592,1$.
- A 29. ábra „E” része: a Dpia3 a továbbalakult (azaz még egy OPA-molekulát tartalmazó) izoindol, $m/z = 76 = [CH_2-S-CH_2-CH_3]^+$ veszteséssel:
 $MH^+ = m/z = 645 - 76 = 569,2 = ([OPA][ET])_2[OPA][Dpia] - [CH_2-S-CH_2-CH_3]^+$;
 $MK^+ = 607,2$.
- 29. ábra „F” része: a Dpia4 az egyszerű „vegyes” termék továbbalakult (azaz még egy OPA-molekulát tartalmazó) és dekarboxileződött formája:
 $MH^+ = 599,2 = ([OPA][ET])[OPA][FMOC][Dpia] - [COOH+COO]$; $MK^+ = 637,1$.

5.4.5.4. Az ornitin és lizin izoindolt és FMOC-ot tartalmazó vegyes termékek szerkezetének meghatározása MS-MS vizsgálattal

Két lehetőség áll fenn: az FMOC vagy az α - {másodrendű (2-es számú) szénatomhoz kapcsolódó}, vagy az (elsőrendű szénatomhoz kapcsolódó) δ / ε -aminocsoporttal reagál.

- (i) A korábbi, N- α -acetyl-L-lizinnel és N- ε -acetyl-L-lizinnel kapott eredmények alapján [297] bizonyítást nyert [299], hogy a szabad ε -aminocsoport esetében (ahol az aminocsoport elsőrendű szénatomhoz kapcsolódik) a kezdetben képződő izoindol továbbalakul. Az így képződött melléktermékbe még egy OPA-molekula épül be.
- (ii) A „vegyes” származékok között a továbbalakult, vagyis a még egy molekula OPA-t tartalmazó mellékterméket (Orn4 és Lys4) is detektáltuk, melynek szerkezete: $[(OPA)[ET]][OPA][FMOC][Orn]/[Lys]$.

Mindezek alapján feltehető, hogy az FMOC az α -aminocsoporttal reagál.

Ezt a feltételezést igazolandó, az Orn egyszerű „vegyes”-termékével {Orn5: $m/z=497,2=[OPA][ET][FMOC][Orn]$ } MS-MS méréseket végeztünk. Feltételeztük, hogy a szelektív töredékionjai alapján, az FMOC-cal reagáló aminocsoportot egyértelműen azonosítani tudjuk. Az előzetes számításokból jól látszott, hogy az Orn5 erre a célra alkalmasabb, mint a Lys5, mivel a fragmentáció során egymástól jobban eltérő tömegeket szolgáltathat. Az elméletileg számolt tömegeket, feltételezve, hogy a hasadás vagy a $=CH-CH_2-$, vagy valamely két metilénecsoporthoz történik, a 32. táblázatban írtuk le.

Az MS-MS fragmentációt, az alkalmazott feszültség függvényében elemezve (30. ábra) látható, hogy

- (i) a fragmentáció a C1 és C2 atomok között történik, valamint, hogy
- (ii) az FMOC az α -aminocsoporttal reagál. A fragmentációs feszültséget változtatva 10 eV-ről (30. ábra: „A”), 20 eV-ra (30. ábra: „B”), 30 eV-ra (30. ábra: „C”) végül 40 eV-ra (30. ábra: „D”) az egyszerű „vegyes”-termék molekulaionjának (Orn5: $m/z=497,0-497,3$) intenzitása csökken. Ezzel egyidejűleg növekszik az $m/z=230$ protonált fragmentumé (32. táblázat). Ez a tapasztalat szoros összhangban van azzal a ténnyel is, hogy a vegyes melléktermékek között azonosítottunk olyat is, melyben a klasszikus izoindol mellett még egy molekula OPA-t is tartalmaz (Orn4, Lys4). Ebből az következik, hogy az izoindol a δ / ε -szénatomon alakul ki (a korábbi eredmények [299] alapján egyértelmű, hogy a még egy OPA-molekula beépülésének feltétele az NH_2-CH_2- molekularészlet megléte).

6. A származékkészítési tanulmányok analitikai hasznosítása

A kétlépcsős származékkészítésben, az 5.4.1–5.4.4. fejezetben részletezett alapkutatási tapasztalatok alapján, optimális kísérleti feltételek között, az Orn, a Lys, a Put, a Cad, a DAH (mint belső standard), a Spd és a Spm reprodukálhatósági vizsgálatát, a biológiai szövetekben, várhatóan széles koncentrációtartományban mérendő összetevők figyelembevételével készítettük (33. táblázat).

Amint az látható, a koncentrációarányos válaszjelek tartománya számottevően különbözik, összhangban a származék elúciós helyével. Látható, hogy ez a tartomány az Orn és Lys esetében – amelyek a szabad AS-ak egy csúcstömege (31. ábra: „Minden más aminosav”) után közvetlenül érkeznek –, a legkisebb (110–440 pmol/injektált mennyiség), míg az Spd és az Spm esetén a legnagyobb (3,43–440 pmol/injektált mennyiség). A mérések reprodukálhatósága a lineáris tartományok válaszjelei alapján $RSD \leq 4,8\%$.

6.1. Az ornitin, a lizin, a putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin egyidejű mennyiségi meghatározása, biológiai szövetekből

A biológiai szövetet perklórsavval fehérjementesített, majd kálium-hidroxiddal semlegesített mintákban, kálium-perklorát és kálium-hidroxid feleslegének jelenlétében végeztük a származékkészítést. Néhány szövetminta összetételét, s az azonos minták eltérő mennyiségeiből készült párhuzamos felvételek reprodukálhatóságát a 34. táblázat mutatja. Biológiai szövetminták elemzésről lévén szó, az $RSD \leq 23\%$ értékét elfogadhatónak tartjuk. A 31. ábrán egy biológiai mintából készített oldat, s az összetételének számításához szolgáló modelloldatról készült kromatogram látható.

6.2. Aminosavak és aminok egyidejű meghatározása OPA/ET/FMOC-származékokként

Összesen 37 darab AS és A (megnevezésük a 32. ábrán) OPA/ET(FMOC)-származékokkénti elválasztását és meghatározását modelleztem.

Az alkalmas elválasztási módszer kialakítása, hosszantartó, 5-6 összetevő lépésenkénti, gradiens-optimálása révén oldódott meg (32. ábra fekete kromatogram).

Sajnálatos módon, a fáradtságos és sokat ígérő, kész gradiens birtokában, amikor is valamennyi összetevő egyidejű elválasztása megvalósult, bebizonyosodott, hogy a stabilitási vizs-

gálatoknál mért válaszjelértékekhez képest jelentősen kisebbeket mérünk. A 37 aminosav- és aminoszármazék együttes elúciója során nyert válaszjelértékek az nAmA-val kezdődően látványos válaszjelcsökkenést mutattak.

Korábbi, irodalmi és saját tapasztalatok alapján feltételeztük [298], hogy a válaszjelcsökkenések oka a származékok pH=7,2 értékű oldatban, hosszú ideig, 50 °C hőfokon, bekövetkező bomlása (32. ábra). A válaszjelcsökkenést elkerülendő, s annak tényleges okát kiderítendő, a kromatográfiás elúció paramétereit egyenként változtattuk:

- (i) az optimált gradiens (a továbbiakban „hosszú gradiens”) felhasználásával az elúciót, erre alkalmas kolonnán (O-3), pH=9,2 értékű eluensekkel készítettük (32. ábra piros kromatogram).
- (ii) Az elválasztást a hosszú gradienssel, 50 °C helyett 30 °C hőfokon is vezettük, s végül,
- (iii) az aminosav-származékok teljes elválasztásáról lemondva, az aminoszármazékok elválasztását egy jelentősen rövidebb elúcióval (a továbbiakban „rövid gradiens”) készítettük.

Az (i) –(iii) pontban nyert válaszjelértékek együttes elemzésekor (33. ábra) kitűnik, hogy a válaszjelcsökkenések oka elsődlegesen a hosszú ideig tartó elúció. Valamennyi vizsgált esetben a rövid gradienssel nyert származékok válaszjelei, a mérések hibahatárát figyelembe véve, azonosak voltak. A hosszú gradienssel mért válaszjelekben mutatkozó jelentős különbségek oka az, hogy az elválasztás magasabb hőfokának és az eluensek kisebb pH értékének hatása fokozottabban érvényesül.

A 33. ábrán vegyületenként feltüntetett válaszjelcsökkenéseket, az adott származék legkisebb és legnagyobb mért válaszjele hányadosaként értékelve kitűnik, hogy

- (i) a diA-k jelentősen bomlékonyabbak, mint a monoA-k.
- (ii) A válaszjelcsökkenés mértéke a retenciós idő növekedésével nő.

A retenciók növekvő rendjében, a válaszjelhányadosok, a MA-k esetében 2,4 (nAmA: 3,74/1,53=2,4); 3,2 (nHexA: 4,45/1,41=3,2); 3,4 (nHepA: 4,05/1,19=3,4) és 4,3 (nOctA: 3,57/0,84=4,3), míg a diA-k/BA-k esetében, rendre 8,2 (Put: 3,53/0,43=8,2); 9,7 (Cad: 5,90/0,61=9,7); 7,4 (DAH: 5,99/0,81=7,4); 11,6 (Spd: 4,88/0,40=11,6) és 14,0 (Spm: 3,91/0,28=14,0) voltak.

Az (i) és (ii) pontok értelmében felmerül a kérdés, van-e válaszjelcsökkenés, s ha igen, milyen mértékű az aminosav-származékok elúciója során, az Asp–Lys tartományában (32. ábra), amely egy rövid gradiensként tekinthető. Mivel a pH=9,2 értékű eluenssel az AS-ak értékelésre alkalmatlan formában eluálódnak, ezért csak választott, jól értékelhető származékok válaszjelviszonyait elemezhetjük (35. táblázat: aszparagin, glutamin, metionin).

Az Asn, a Gln és a Met válaszelváltozásait értékelve, látható, hogy a különbségek jelentősen kisebbek, mint az A-k esetében tapasztaltak. A 30 °C és az 50 °C-on mért hányadosok értékei nagyobbak, mint azonos hőfokon, eltérő pH-értékű elúciók során nyert válaszelek. A legnagyobb és legkisebb válaszelek hányadosai 1,4 (Asn: 3,08/2,28); 1,8 (Gln: 4,45/2,41) és 1,1 (Met: 3,37/2,98) között változnak.

Mindezek alapján egyértelmű, hogy az AS-ak és az A-k együttes, egy felvételtől történő elemzése nem célravezető. Ezért a mennyiségek értékelése külön-külön elválasztásuk után előnyös.

7. Összefoglalás; az értekezésben foglalt új kutatási eredmények

1. Aminosavak, alifás mono- és diaminok *o*-ftálaldehid (OPA)/2-merkaptotanol (MCE)- és OPA/etántiol (ET)-származékainak stabilitását és analitikai hasznosíthatóságát értékeltem. A termékek fluoreszcenciás intenzitásának és UV abszorbanciájának egyidejű nyomon követésével. Szigorúan azonos kísérleti {nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (HPLC)} körülmények között,

–a reagens összetételének függvényében,

–a reagens OPA/tiol mólarányát, a kölcsönhatás hőfokát és idejét változtatva, mennyiségi adatokkal jellemzett, sztöchiometriai elemzések alapján vizsgáltam.

2. Bizonyítottam, hogy az ezidő szerint leggyakrabban elemzett OPA/MCE-származékok, valamennyi aminosav és amin esetében, a megfelelő OPA/ET-származékokhoz viszonyítva, jelentősen kisebb stabilitásúak.

–Az OPA/ET-származékok elemzési feltételeit, részletes irodalmi adatok hiányában, a reagens OPA/tiol mólaránya, a kölcsönhatás hőfoka, ideje, a reagens, illetőleg a reakcióelegy pH-értéke és metanol-koncentrációja függvényében optimalám. Az optimalmált reakciófeltételek között, az aminosavak és aminok meghatározási reprodukálhatóságát széles koncentrációtartományban (3,43–440 pmol/injektált összetevő), a mérések relatív standard deviáció értékével jellemeztem (átlagértékben az $RSD \leq 4,8\%$).

3. A *n*-hexil-, a *n*-heptil, a *n*-oktil és a β -feniletilamin viselkedését, irodalmi adatok hiányában, négy eltérő tioltartalmú {MCE, ET, 3-merkaptopropionsav (MPA), N-acetil-L-cisztein (NAC)} OPA-származékaik alapján, részletes összehasonlító tanulmányban, elemeztem.

–Megállapítottam, hogy HPLC elválasztásuk és mennyiségi értékelésük az OPA/ET=1/10 mólarányú reagenssel nyert származékaik formájában a legelőnyösebb.

–E tanulmány eredményeként került sor először, a két tioltartalmú OPA-származékaik HPLC elválasztását követő minőségi-mennyiségi azonosítására: UV abszorbancia-maximum értékeik és tömegspektrometriával (MS) mért molekulaionjaik alapján.

4. A biogén aminok (hisztamin, agmatin, tiramin, putreszin, kadaverin), közöttük a (szekunder aminocsoportú) spermidin és spermin OPA-származékainak részletes elemzése alapján bebizonyosodott, hogy a spermidin, de különösen a spermin – a többi OPA-származékkal azonos nagyságú válaszjelek alapján történő – mérése, csak úgy lehetséges, ha a szekunder aminocsoportjaikat is származékká alakítjuk.

–E felismerés eredményeként, elsőként írtam le a spermidin és spermin két lépcsőben vezetett származékképzését (1. OPA/ET, 2. 9-fluorenilmetil-kloroformát, FMOC), s egyidejűleg

–az OPA/ET/FMOC termékek összetételét tömegspektrometrián azonosítottam.

5. A biogén aminok elemzésére kialakított eljárást egérszövetek biogén amintartalmának meghatározására hasznosítottam. Nagyszámú egérszövet eltérő mennyiségeinek reprodukálható, s a lemért minta mennyiségével koncentrációarányos elemzése a módszer gyakorlati hasznosíthatóságát fémjelzi.

6. Az 5. pontban részletezett vizsgálatok kiterjesztéseként került sor az ornitin és lizin, – mint a putreszin és kadaverin prekursor vegyületeinek, – a biogén aminokkal való együttes elemzésére. Az analitikai módszer újszerűségén túlmenően, az ornitin és lizin OPA/ET/FMOC-reagenssel kölcsönhatása új kutatási eredményekhez vezetett. Bizonyítottam, az ornitin és lizin az OPA/ET/FMOC-reagenssel vegyes ligandumú származékot ad. E tapasztalat, tömegspektrometriás vizsgálatokkal kiegészítve, jelzés volt az ornitin/lizin, δ -/ ϵ - és α -aminocsoportjainak az izoindolképzésbeni eltérő reakciókészségére.

7. A valamennyi fehérjealkotó-aminosav, alifás mono- és diaminok, mindösszesen 37 vegyület, OPA/ET/FMOC-származékokként, egy oldatból, egyetlen felvételtől elemzését tanulmányoztam. A 37 összetevő egyidejű minőségi-mennyiségi értékelésére alkalmas, 60 perces elválasztást dolgoztam ki.

–Bizonyítottam, hogy a 37 származék, elsősorban a hosszabb retenciós idővel eluálódó aminok, az elúció hőfokától, s az eluens pH értékétől függő mértékben bomlanak. Mindezek alapján, az aminosav- és amin-származékok külön-külön oldatokból történő elemzését részesítettem előnyben.

8. Doktori értekezésem összesített eredményeként értékelem, hogy sokoldalúan bizonyítottam

–a legközkedveltebb HPLC elválasztásra előkészítő 'OPA-származékkészítés' optimális reakció feltételeit, valamint remélem, hogy

–korábbi, munkacsoportunk kutatási eredményeivel összhangban, azokat kiegészítve hozzájárulhattam annak a tapasztalatnak az elfogadtatásához, mely szerint az OPA/MCE-származékokkénti elemzések jelentik a legkedvezőtlenebb megoldást.

8. Summary; the novel results of the thesis

1. Stability and the possibility of analytical application of the derivatives of amino acids, aliphatic mono- and diamines, formed with the *o*-phthalaldehyde (OPA)/2-mercaptoethanol (MCE) and OPA/ethanethiol (ET) reagents were examined. Products were detected by fluorescence and photodiode array detection, simultaneously. Applying strictly the same experimental {high performance liquid chromatographic (HPLC)} conditions, as the function of

–the reagents' composition,

–varying the molar ratio of OPA to thiol, the temperature and the duration of the reaction, was examined and characterized by quantitative data, based on stoichiometric investigations.

2. It has been proven that the stability of the derivatives, formed with – until recently – most often applied OPA/MCE reagent is considerably lower than those obtained with the OPA/ET reagent.

–The experimental conditions of the OPA/ET derivatives were optimised, lacking detailed literature data, as the function of the molar ratio of OPA to the thiol, the temperature of the elution, the pH value and methanol content of the reagent/reaction medium. Under the optimised conditions, quantitation reproducibility of amino acids and amines was measured in a wide range of concentration (3.43–440 pmol/compound injected) and characterised by the relative standard deviation percentages (RSD≤4.8 %, in average).

3. The behaviour and characteristics of the derivatives of *n*-hexyl-, *n*-heptyl-, *n*-octyl- and β -phenylethylamines, formed with OPA reagents of various thiol-content {MCE, ET, 3-mercaptopropionic acid (MPA), N-acetyl-L-cysteine (NAC)}, lacking literature data, were described.

–It has been proven that the most advantageous HPLC separation and quantitation of these derivatives is achieved with the OPA/ET=1/10 reagent.

–Based on UV absorbency maxima values and mass spectrometric (MS) molecular ions, the by-product, containing two molecules of thiol, was identified qualitatively and quantitatively the first time by HPLC as a result of this study.

4. Detailed investigation of the OPA-derivatives of biogenic amines (histamine, agmatine, tyramine, putrescine, and cadaverine) amongst them the spermidine and spermine (containing secondary amino groups also) was carried out. It was proven that in the case of spermidine and particularly in the case of spermine, their measurement, with response values similar to those obtained with other amino acids/amines, is only made possible by derivatizing their secondary amino groups as well.

–Based on this recognition, the two-step (1st: OPA/ET; 2nd: 9-fluorenylmethyl chloroformate) derivatization of spermidine and spermine was described here the first time.

–Simultaneously, the OPA/ET/FMOC products were identified by HPLC-MS as well.

5. The procedure, elaborated for the analysis of biogenic amines, was utilised to determine the content of different biogenic amines of biological tissues. Large number of reproducibly analysed biological tissues of various quantities and the proportionality of the results to the weighed tissues do confirm the practical advantage of this method.

6. Extending the analysis described above, the quantitation of ornithine and lysine, simultaneously with the biogenic amines, was elaborated. Beyond the method's novelty, unexpected reaction of ornithine and lysine with the OPA/ET/FMOC reagent was experienced. It has been proven, that the reaction of ornithine and lysine with the OPA/ET/FMOC reagent yields derivatives of mixed ligands. This experience, verified by MS data, demonstrates a difference in the reactivity of the δ -/ ϵ - and α -amino group of ornithine/lysine.

7. The simultaneous analysis of all the proteinogenic amino acids, aliphatic mono- and diamines, 37 compounds in total was studied. The qualitative and quantitative analysis, within 60 minutes, of all the 37 compounds was developed.

–It was proven that the 37 derivatives, mainly those eluting with a longer retention time, do decompose to an extent depending on the elution's temperature and on the pH of the eluents. Therefore the analysis of amino acids and amines is, more advantageous, to be preferred from separate elutions.

8. As a net result of this thesis, it is shown that

–the optimal conditions for the 'OPA-derivatization', being the most popular preparation for HPLC separations, were confirmed multi-facetedly.

–Thus in accord with and completing the earlier results of our research group, and hopefully contributing to the acceptance of the fact that the application of OPA/MCE-derivatization is the least advantageous solution.

9. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: OPA-származékként készült nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztások: a 2000–2005 időszakban megjelent, választott közlemények alapján, az OPA-reagens SH-csoportú segédanyagai, valamint a közlemény tárgyköre szerinti csoportosításban

Tudományterület→ Reagens↓	Orvosi/Biológiai	Gyógyszerészet/ Analitika/Alap kutatás	Élelmiszer-/Takarmányipar	Mezőgazdaság/ Környezettudomány
OPA^a/MCE^b	[21,23,28-31,33-35,38,41-43,45,50,51,56,57,60-64,66,67,70,74,75,78-80,82,87,91,93,95-97,99,102,105,110,111,113,115,119,121,123,125,127,130-133,137,138,141,143,145,149,151,152,154,155,157-159,161,164,166,169,176-179,182-185,190] ^d ; [18,21,26,39,44,47-49,60,68,92,100,102,107,112,114,117,118,122,129,135,136,138,140,142,144,147,148,150,156,167,170-172,174,175,187-189]ECD ^e ; [65,173]MS ^f	[22,36,40,53,55,69,72,77,81,83,85,88,98,101,104,106,109,124,126,139,146,162,168] ^d ; [126,181,191,]ECD	[17,19,20,24,25,27,52,58,59,73,84,86,90,94,116,120,134,153,160,163,165] ^d ; [58]MS	[37,46,71,76,89,103,108,128,180,186] ^d ; [32]ECD
OPA/ királis ciszteinek	[200,203,206,210,214,215,217,219,221,223-226,229-231] ^d	[197,198,201,204,222,224,227,228] ^d	[193,208,209,232,233] ^d	[192,194-196,199,202,205,207,211-213,216,218,220] ^d ; [199]MS
OPA/MPA^c	[236-240,243,244,247-249,252-254,256,258,259] ^d	[241,243,245-247,249] ^d	[234,235,242,250,251,255] ^d	[257] ^d
OPA/szulfít	[260-263,265-273]ECD	[264]ECD	-	-
csak OPA	[274-276,278-284] ^d	-	[285] ^d	[277] ^d
OPA/egyéb tiol	[287,292,293] ^d ; [286,288,289]ECD	[290] ^d	-	[291,294] ^d

Jelölések: OPA^a=*o*-ftálaldehid; MCE^b=2-merkaptotanol; MPA^c=3-merkaptopropionsav; ^d=ultraibolya és/vagy fluoreszcens detektálás; ECD^e=elektrokémiai detektálás; MS^f=tömegspektrometriás (és ultraibolya) detektálás;

10. táblázat: Az OPA/MCE=1/3 molarányú reagens szennyezéseinek változása a reagens tárolási idejének függvényében

Szennyezések			Integrátoregység**/szennyező csúcs [§]										
Csúcs száma↓	Ret. idő ^g , perc	λ_{\max}^h , nm	Reagens1				Reagens2						
			90 perc	230 perc	270 perc	370 perc	7 nap	11 nap	27 nap	90 perc	4 nap	21 nap	23 nap
1UV***	3,26	216,253	2,7	4,6	4,4	5,9	3,1	49,0	55,5	3,5	12,7	44,1	2,0
2UV***	5,24	229,339	0,7	0,7	1,3	0,6	17,7	3,7	12,7	-	-	-	-
3UV***	6,13	215,248	0,3	-	-	-	-	4,1	6,0	-	-	4,2	-
4	Fl	7,58	38,0	26,0	85,0	151,0	56,9	119,1	26,5	93,9	-	-	-
	UV	253,334	1,5	2,1	2,0	4,1	1,3	4,1	0,5	1,9	0,9	-	-
5	Fl	8,21	89,0	-	-	-	2,3	89,2	-	75,0	16,5	95,0	106,0
	UV	220,263	1,7	2,3	1,1	1,4	-	2,4	10,6	1,8	1,4	-	3,3
6	Fl	9,29	-	-	-	-	-	-	-	-	28,7	94,0	82,0
	UV	267,339	3,2	2,3	1,1	1,4	0,3	40,0	20,9	4,8	11,0	14,3	-
7UV***	13,26	220,272	7,2	-	-	-	4,7	2,7	4,5	50,9	49,6	172,0	151,0
UV összesen			17,3	12,0	9,9	13,4	27,2	107	111	62,9	75,6	235	156
			(58)	(40)	(33)	(45)	(91)	(357)	(370)	(210)	(252)	(783)	(520)
Fl összesen			127	26,0	85,0	151	59,2	208	26,5	169	45,2	189	188
			(30)	(20)	(20)	(25)	(14)	(50)	(6,3)	(40)	(11)	(473)	(45)

Jelölések, mint az 1. táblázatnál, valamint: Ret. idő^g=retenciós idő; λ_{\max}^h =elnyelési maximum; **=a reagens szennyezőértékei, ~4,2 és ~0,3 integrátoregység/(pmol AS-származék)-kal számoltuk (Fl és UV detektálást alkalmazva): ezen értékeket a 16. táblázat alapján számoltuk ki, a 1,5 perc reakcióidő után (15 AS), OPA/MCE=1/3 reagens alkalmazásával mért ie/pmól-ok alapján; §=négy injektálás alapján számolva; A zárójelben lévő szedett értékek a szennyezések összességét jelölik, pmolban kifejezve; kimutathatósági határ <<0,3 integrátoregység; ***=ezen értékeknek nincs Fl intenzitásuk.

11. táblázat: Az OPA/MCE-glicin-származékok reprodukálhatósága, különböző ideig, hűtőszekrényben (~4 °C-on) tárolt OPA/MCE=1/3 molarányú reagens (reagens1–3) alkalmazásával

Származékok↓	Fluoreszcenciás Integrátoregység/1900pmol glicin									átlag	RSD%
	Reagens1			Reagens2				Reagens3			
	1 nap	8 nap	21 nap	1 nap	4 nap	21 nap	23 nap	1 nap			
Glicin1	8166	8039	764	7993	8143	7750	7603	7870			
Glicin2	100	97	22	118	90	177	116	178			
Glicin3	156	113	21	145	151	171	163	164			
összesen	8422	8249	788	8254	8384	8104	7882	8152	8260	1,5	

Megjegyzés: a *dőlt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe. [OPA]/[glicin]=20/1; $l=1,9 \cdot 10^{-9}$ mol/10 μ l.

12. táblázat: Az OPA/ET=1/10 molarányú reagens szennyezéseinek változása a reagens tárolási idejének függvényében

Szennyezések			Integrátoregység ^{**} /szennyező csúcs [§]								
Szennyező↓	Ret. idő, perc	λ_{\max}^h , nm	Reagens1				Reagens2				
			1 h	2 nap	13 nap	16 nap	1 h	1 nap	2 nap	4 nap	
1	UV***	2,88	244; 296	5,4	14,8	76,5	112,9	5,4	22,4	31,8	34,0
2	UV***	3,35	215; 296; 253	3,0	4,9	30,0	50,7	9,2	28,9	31,7	25,4
3	UV	4,16	220; 291;375	-	10,5	18,9	16,3	1,2	10,5	13,8	14,5
	Fl			2,3	3,8	5,1	7,0	4,1	4,2	5,0	4,3
4	UV	11,05	215; 286	13,5	10,9	5,9	3,8	0,3	1,1	2,5	6,3
	Fl			9,3	22,8	32,4	41,3	-	-	-	-
5	UV	12,63	230; 334	3,3	1,2	1,1	3,9	9,6	8,5	6,8	7,9
	Fl			12,5	15,1	26,6	42,0	24,9	27,3	27,3	32,8
6	UV	14,05	230; 320	-	-	-	-	8,8	5,6	7,0	4,1
	Fl			-	-	-	-	36,8	40,0	32,5	33,5
7	UV	15,55	230; 334	-	-	-	-	2,0	1,7	2,2	1,1
	Fl			5,8	9,4	14,2	20,5	15,4	13,7	14,3	14,3
8	UV	17,39	248	-	-	-	-	9,0	10,1	8,0	11,9
	Fl			26,8	28,6	25,1	26,3	4,1	3,3	3,5	9,1
9	UV	18,22	220; 267; 310	-	-	-	-	10,0	21,3	19,1	15,3
	Fl			-	-	-	-	92,8	164,6	170,0	182,5
10	UV	19,38	244; 277; 329	-	-	-	-	18,5	18,2	18,2	17,5
	Fl			93,1	43,4	26,2	22,5	18,4	12,7	21,6	22,5
11	UV	20,21	225; 334	20,3	12,2	8,2	37,5	48,6	50,9	44,5	32,1
	Fl			270,2	195,4	86,8	546,5	513,0	483,8	440,0	325,3
UV összesen				45,5	54,5	140,6	225,1	122,6	179,2	185,6	170,1
				(138)	(165)	(426)	(682)	(372)	(543)	(562)	(515)
Fl összesen				420	318,5	216,4	706,1	709,5	749,6	714,2	624,3
				(83)	(63)	(43)	(140)	(140)	(148)	(141)	(124)

Jelölések mint, az 1.-11. táblázatoknál, valamint: ***=a reagens szennyezőértékei, ~5,0 és ~0,3 integrátoregység/(pmol AS-származék)-kal számoltuk (Fl és UV detektálást alkalmazva); ezen átlagértékeket a 17. táblázat alapján számoltuk ki, a 1 perc reakcióidő után, a 15 AS esetében az OPA/aminosav=70/1 molarányú, OPA/ET=1/10 reagens alkalmazásával mért ie/pmol-ok alapján; §=négy injektálás alapján számolva; a zárójelben lévő értékek a szennyezések pmolban kifejezett összességét jelölik; kimutathatósági határ <<0,3 integrátoregység; ***=ezen értékeknek nincs Fl intenzitásuk;

13. táblázat: Az OPA/ET-alanin-származékok reprodukálhatósága, különböző ideig, hűtőszekrényben (~4 °C-on) tárolt OPA/ET=1/10 molarányú {80 (V/V)% metanoltartalmú; pH=9,30} reagens (reagens1–2) alkalmazásával

Amino-sav↓	Detektálás↓	Fluoreszcenciás Integrátoregység/~1000 pmol alanin									
		Reagens1				Reagens2				átlag	RSD%
		1 h	1 nap	2 nap	4 nap	1 h	1 nap	4 nap	5 nap		
Alanin	Fl	5327	5450	5508	5273	5177	5145	4830	3910	5299	2,6
	UV	387	380	391	367	364	350	341	283	374	3,9

Jelölések, mint az 1.–12. táblázatoknál. Megjegyzés: a *dólt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe. Megjegyzés: [OPA]/[alanin]=70/1; 1=~1·10⁻⁹mol/10µl.

14. táblázat: Az egynél több OPA/MCE-származékot adó aminosavak stabilitása a reakcióidő és a reagensösszetétel függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Mólarány→ Detektálás→ Reakcióidő, perc→ Aminosav↓	Ret. idő ^g , perc ↓	λ_{\max}^h , nm ↓	Válaszjel ⁱ , %													
			OPA/MCE=1/3						OPA/MCE=1/50							
			FI			UV			FI				UV			
			7	41	75	7	41	75	1,5	7	41	75	1,5	7	41	75
Glicin1	8,24	334	97,0	95,3	93,5	98,3	97,0	93,7	98,3	98,3	97,4	97,1	98,1	98,1	97,2	96,5
Glicin2	8,81	343*	1,2	3,0	4,9	0,4	2,1	4,5	0,4	0,5	1,3	2,0	0,4	0,4	1,2	2,2
Glicin3	9,53	339	1,8	1,7	1,6	1,3	0,9	1,8	1,3	1,2	1,3	0,9	1,5	1,5	1,6	1,3
ie/pmol^l			4,46	2,92	2,00	0,29	0,19	0,13	4,15	4,78	2,62	1,00	0,27	0,31	0,16	0,06
β -Alanin1	8,75	334	98,5	98,6	98,7	98,8	96,9	93,1	98,8	98,9	98,9	98,8	98,4	98,2	98,2	98,5
β -Alanin2	10,02	334	1,5	1,4	1,3	1,2	3,1	6,9	1,2	1,1	1,1	1,2	1,6	1,8	1,8	1,5
ie/pmol			4,81	2,95	2,02	0,31	0,19	0,13	3,83	4,81	2,61	0,92	0,24	0,31	0,16	0,06
Hisztidin1	7,77	334	57,0	57,3	59,0	69,6	70,9	71,3	64,0	63,5	63,6	64,7	74,4	74,2	na ^j	74,5
Hisztidin2	8,25	353*	43,0	42,7	41,0	30,4	29,1	28,7	36,0	36,5	36,4	35,3	25,6	25,8	na	25,5
ie/pmol			1,88	1,71	1,71	0,11	0,10	0,10	1,15	1,88	2,48	2,13	0,07	0,11	na	0,12
GABA1 ^m	9,15	334	100	94,3	92,9	99,6	98,2	96,3	98,9	98,2	96,7	96,1	98,4	98,4	97,3	94,8
GABA2	9,42	343*	0	5,7	7,1	0,4	1,8	3,7	0,0	0,7	2,2	3,0	0,0	0,0	1,1	3,2
GABA3	10,40	334	nk ^k	nk	nk	nk	nk	nk	1,1	1,1	1,1	0,9	1,6	1,6	1,6	2,0
ie/pmol			4,06	2,34	1,56	0,26	0,15	0,10	3,40	4,06	2,47	1,02	0,21	0,26	0,15	0,07
Ornitin1	10,30	339	2,2	2,3	3,7	0,7	2,8	4,2	0,4	0,3	0,5	0,8	0,2	0,2	1,0	1,7
Ornitin2	10,92	334	38,0	12,3	15,8	12,0	19,2	24,9	2,4	5,2	19,1	32,0	7,8	13,5	36,3	51,8
Ornitin3	11,35	339	28,0	12,5	22,7	6,4	22,8	35,8	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
Ornitin4	12,00	358*	8,0	2,9	3,6	0,4	1,2	1,2	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
Ornitin5	12,40	334	52,1	67,2	51,6	78,3	51,8	32,6	84,2	87,3	77,3	63,5	79,6	79,1	59,0	43,1
Ornitin6	13,20	334	14,2	2,8	2,6	2,2	2,2	1,3	13,0	7,3	3,1	3,7	12,5	7,2	3,7	3,4
ie/pmol			1,09	0,82	0,75	0,44	0,33	0,30	1,06	1,09	0,75	0,53	0,43	0,44	0,38	0,30
Lizin1	10,85	334	1,7	14,2	17,0	1,9	6,0	5,8	0,5	0,4	1,8	3,5	0,3	0,3	1,5	2,3
Lizin2	11,00	334*	2,8	15,5	19,7	9,1	23,8	26,1	0,8	1,6	9,5	19,8	5,7	11,0	37,1	55,8
Lizin3	11,30	334	1,2	0,8	0,6	5,2	1,7	0,5	1,0	0,7	2,8	3,0	4,6	5,3	8,8	9,0
Lizin4	11,55	339	5,1	34,0	49,4	18,2	57,9	64,2	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
Lizin5	12,79	334	89,2	35,4	13,3	65,6	10,6	3,3	84,1	88,2	80,0	66,2	77,0	75,5	47,3	27,4
Lizin6	13,22	334	nk	nk	nk	nk	nk	nk	1,1	0,8	2,3	5,2	0,9	0,6	1,5	2,3
Lizin7	13,59	334	nk	nk	nk	nk	nk	nk	9,2	6,0	2,4	1,6	8,2	5,2	2,3	1,9
Lizin8	13,76	334	nk	nk	nk	nk	nk	nk	3,4	2,3	1,3	0,8	3,3	2,1	1,5	1,3
ie/pmol			1,44	0,96	0,87	0,33	0,22	0,20	1,37	1,44	0,82	0,43	0,30	0,33	0,27	0,20
EACA1 ⁿ	10,37	334	98,6	0,0	0,0	96,4	0,0	0,0	99,1	99,1	99,1	99,4	98,4	98,3	98,5	98,0
EACA2	11,65	334*	1,4	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,9	0,9	0,9	0,6	1,6	1,7	1,5	2,0
ie/pmol			2,90	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	2,42	2,90	1,9	0,63	0,17	0,19	0,12	0,05

Jelölések, mint az 1.–13. táblázatoknál, valamint Válaszjelⁱ=válaszjel a területösszeg százalékában kifejezve; na^j=nincs adat; nk^k=nem keletkezik; ie/pmol^l=integrátoregység/pmol; GABA^m= γ -aminovajsav; EACAⁿ= ϵ -aminokapronsav; *=és/vagy 339 nm;

Megjegyzés: [OPA]/[MCE]/[AS]=20/60/1; 1=1·10⁻⁹ mol/10 μ l. Az elválasztás 30 C-on, E-1 és O-1 oszlopokon történt. Gradiens: 1,8 ml/min; 0 min: 100 % A-eluens; 10–11 min: 100 % B-eluens; 12–17 min: 100 % A-eluens.

15. táblázat: Az egynél több OPA/ET-származékot adó aminosavak stabilitása a reakcióidő és az OPA/ET=1/10 reagens (pH=9,3) metanoltartalmának függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Aminosav↓	Ret. időg, perc ↓	λ_{\max}^h , nm ↓	Válaszjel ⁱ , %													
			FI													
Reakcióidő, perc →			1,5		3		7		23		43		220		360	
Metanol (V/V)% →			80	20	80	20	80	20	80	20	80	20	80	20	80	20
Hisztidin1	3,25	353	40,80	35,00	42,20	35,20	43,10	33,80	41,40	33,40	41,20	34,10	44,70	32,20	40,40	32,80
Hisztidin2	3,72	339	59,20	65,00	57,80	64,80	56,90	66,20	58,60	66,60	58,80	65,90	55,30	67,80	59,60	67,20
ie/pmoll			4,59	4,44	4,78	4,95	5,29	5,87	6,07	5,91	6,25	6,00	5,88	5,91	6,31	5,68
Glicin1	4,28	334	99,60	98,60	99,60	98,40	99,60	97,20	99,60	95,40	99,50	93,20	99,10	81,60	99,00	69,60
Glicin 2	5,63	339	nk ^k	1,10	nk	1,30	nk	2,40	nk	3,70	nk	5,20	nk	10,20	nk	15,90
Glicin 3	8,28	343	0,40	0,20	0,40	0,30	0,40	0,40	0,40	0,90	0,50	1,60	0,90	8,20	1,00	14,50
ie/pmoll			6,30	5,90	6,25	5,97	6,27	6,00	6,26	5,92	6,30	5,90	6,16	4,71	6,18	3,87
β -Alanin1	5,57	334	99,50	98,10	99,60	96,90	99,50	95,80	99,50	94,30	99,30	88,70	98,30	77,60	97,00	69,40
β -Alanin2	9,02	339	0,10	1,80	0,10	3,00	0,10	4,00	0,20	5,20	0,30	10,20	1,20	17,50	2,50	21,90
β -Alanin3	14,15	343	0,40	0,10	0,30	0,10	0,30	0,20	0,30	0,50	0,40	1,20	0,50	4,90	0,50	8,80
ie/pmoll			6,39	6,09	6,48	6,16	6,57	6,15	6,43	6,11	6,53	5,72	6,69	4,61	6,69	3,20
GABA1 ^m	7,23	334	100	98,50	99,90	97,40	100	96,00	99,90	94,90	99,80	88,40	99,00	76,30	98,50	90,30
GABA2	10,87	339	nk	1,50	0,10	2,60	nk	4,00	0,10	5,10	0,20	11,60	1,00	23,70	1,60	9,70
ie/pmoll			6,25	6,11	6,25	6,11	6,30	6,18	6,23	6,10	6,28	5,87	6,35	4,36	6,53	3,25
Ornitin1	4,23	334	99,90	99,90	100	99,80	99,90	99,70	99,80	99,60	99,70	99,10	99,50	96,60	99,30	91,20
Ornitin2	6,07	339	nk	nk	nk	0,10	nk	0,20	nk	0,30	nk	0,80	nk	3,30	nk	8,70
Ornitin3	7,42	343	0,10	0,10	0,0	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,30	0,10	0,50	0,10	0,80	0,10
ie/pmoll			3,15	2,84	3,34	3,18	3,41	3,26	3,53	3,33	3,55	3,20	3,57	2,41	3,61	1,87
Lizin1	4,65	334	99,90	99,60	9,80	99,70	99,90	99,40	99,80	98,80	99,80	97,30	99,20	90,50	98,50	86,00
Lizin2	6,97	339	nk	0,37	nk	0,27	nk	0,58	nk	1,17	nk	2,18	0,20	7,87	0,40	11,50
Lizin3	8,25	343	0,10	0,03	0,20	0,03	0,10	0,02	0,20	0,03	0,20	0,52	0,60	1,63	1,1	2,50
ie/pmoll			5,07	5,02	5,39	5,13	5,62	5,29	5,61	5,28	5,66	4,84	5,67	3,00	5,75	2,12
			UV													
Hisztidin1			32,60	29,80	33,20	28,00	37,00	26,40	33,10	27,60	32,40	27,30	37,30	26,90	32,60	26,70
Hisztidin2			67,40	70,20	66,80	72,00	63,00	73,60	66,90	72,40	67,60	72,70	62,70	73,10	67,40	73,30
ie/pmoll			0,17	0,16	0,18	0,16	0,20	0,20	0,22	0,21	0,23	0,21	0,23	0,20	0,22	0,19
Glicin1			9,70	99,50	99,60	99,30	99,50	98,60	99,50	97,40	99,40	95,20	99,10	83,50	98,80	71,90
Glicin2			nk	0,30	nk	0,40	nk	1,00	nk	2,00	nk	2,70	nk	5,70	nk	9,10
Glicin3			0,30	0,20	0,40	0,30	0,50	0,40	0,50	0,60	0,60	2,10	0,90	10,80	1,20	19,00
ie/pmoll			0,39	0,37	0,39	0,37	0,39	0,38	0,39	0,37	0,39	0,36	0,38	0,29	0,38	0,23
β -Alanin1			99,50	98,30	99,60	97,50	9,40	96,70	99,60	95,30	99,40	na ^j	98,40	79,10	97,50	69,60
β -Alanin2			nk	1,70	0,10	2,50	0,20	3,40	0,10	4,30	0,20	na	0,90	14,80	1,90	19,00
β -Alanin3			0,50	nk	0,30	nk	0,40	nk	0,30	0,40	0,40	na	0,70	6,10	0,60	11,40
ie/pmoll			0,39	0,38	0,40	0,37	0,40	0,37	0,39	0,37	0,40	na	0,39	0,27	0,39	0,18
GABA1			100	99,10	99,90	98,20	100	97,20	99,90	96,20	99,90	91,30	99,50	81,70	98,90	92,80
GABA2			0,0	0,90	0,10	1,80	0,0	2,80	0,10	3,80	0,10	8,70	0,50	18,30	1,10	7,20
ie/pmoll			0,39	0,37	0,39	0,37	0,39	0,37	0,39	0,37	0,39	0,35	0,39	0,25	0,39	0,20
Ornitin1			100	99,90	100	99,80	99,90	99,70	99,90	99,60	99,90	98,80	9,60	96,40	99,40	92,50
Ornitin2			nk	0,05	nk	0,15	nk	0,20	nk	0,30	nk	0,70	nk	2,40	nk	6,45
Ornitin3			0,0	0,05	0,00	0,05	0,10	0,05	0,10	0,10	0,10	0,50	0,40	1,20	0,60	1,05
ie/pmoll			0,66	0,61	0,70	0,66	0,71	0,68	0,73	0,69	0,74	0,67	0,75	0,49	0,75	0,37
Lizin1			99,90	na	99,80	99,50	9,90	98,70	99,80	97,30	98,00	na	99,30	83,30	98,60	72,10
Lizin2			nk	na	nk	0,34	nk	0,75	nk	1,20	nk	na	0,10	6,40	0,20	9,20
Lizin3			0,10	na	0,20	0,16	0,10	0,55	0,20	1,50	0,20	na	0,60	10,30	1,20	18,70
ie/pmoll			0,50	na	0,53	na	0,55	0,53	0,54	0,53	0,56	na	0,56	0,35	0,56	0,25

Jelölések, mint az 1.–14. táblázatoknál.

Megjegyzés: [OPA]/[ET]/[aminosav]=70/700/1; 1=1·10⁻⁹ mol/10 μ l. Az elválasztás körülményei: E-2 és O-2 oszlopokon, 50 °C, 1 ml/min. Hisztidin, glicin, β -alanin és GABA: 30 %A-eluens+70 %B-eluens. Ornitin, lizin: 70 %B-eluens+30 %acetonitril.

16. táblázat: Az egy OPA/MCE-származékot adó aminosavak stabilitása a reakcióidő és a reagensösszetétel függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Aminosav ↓	Ret. idő ^g , perc ↓	λ_{\max}^h , nm ↓	pmol/10 μ l ↓	Integrátoregység/pmol															
				OPA/MCE=1/3								OPA/MCE=1/50							
				FI				UV				FI				UV			
				1,5	7	58	109	1,5	7	58	109	1,5	7	58	109	1,5	7	58	109
Aszparaginsav	5,56	334	400,3	3,25	3,35	3,24	3,24	0,25	0,26	0,25	0,25	0,83	1,82	2,55	2,15	0,063	0,138	0,198	0,166
Glutaminsav	6,37	334	396,1	3,63	3,60	3,52	3,42	0,28	0,27	0,27	0,26	1,37	2,61	2,85	2,29	0,101	0,200	0,220	0,175
Aszparagin	7,42	334	339,1	4,13	4,35	4,24	4,21	0,33	0,33	0,34	0,34	1,39	3,11	3,69	3,02	0,111	0,242	0,289	0,236
Szerin	7,58	334	394,7	4,19	4,20	4,01	3,85	0,31	0,31	0,30	0,28	2,66	3,65	2,22	1,35	0,193	0,263	0,159	0,097
Glutamin	7,85	334	427,0	4,68	4,62	4,62	4,51	0,34	0,34	0,34	0,33	2,17	3,86	3,65	2,98	0,154	0,283	0,270	0,218
Treonin	8,35	339	378,2	3,97	3,95	3,88	3,77	0,28	0,30	0,30	0,29	1,57	2,99	3,05	2,41	0,109	0,215	0,218	0,166
Arginin	8,53	334	388,8	4,47	4,34	4,28	4,16	0,33	0,33	0,32	0,31	2,76	1,04	3,28	2,54	0,216	0,310	0,259	0,201
Alanin [#]	8,82	334	1682,0	na ^j	4,21	3,05	na	0,29	0,24	0,21	na	2,65	4,21	3,94	2,67	na	na	0,23	0,18
Tirozin	9,06	334	377,7	4,25	4,25	4,22	4,22	0,30	0,29	0,29	0,28	1,83	3,34	3,67	3,25	0,099	0,214	0,234	0,2055
Valin	10,13	339	408,5	4,53	4,56	4,49	4,49	0,30	0,31	0,31	0,31	1,25	2,71	3,91	3,43	0,090	0,186	0,269	0,234
Metionin	10,23	334	392,5	4,34	4,30	4,18	4,18	0,31	0,31	0,30	0,30	2,49	3,85	3,37	2,68	0,184	0,282	0,246	0,192
Triptofán	10,60	339	370,8	3,41	3,45	3,35	3,35	0,23	0,24	0,23	0,23	1,75	2,78	2,72	2,26	0,125	0,202	0,194	0,161
Fenilalanin	10,83	339	398,1	3,91	3,91	3,94	3,94	0,28	0,28	0,28	0,28	1,66	3,00	3,27	2,91	0,128	0,224	0,244	0,217
Izoleucin	10,90	339	362,2	4,71	4,83	4,67	4,67	0,30	0,31	0,30	0,30	1,51	3,21	3,96	3,42	0,103	0,213	0,261	0,230
Leucin	11,03	339	410,4	4,16	4,09	3,91	3,91	0,30	0,30	0,28	0,28	1,99	3,41	3,10	2,47	0,141	0,243	0,216	0,171

Jelölések, mint az 1.–15. táblázatoknál, valamint [#]=a reakcióidők rendre: 1,5 perc, 7 perc, 41 perc, 75 perc;

Megjegyzés: [OPA]/[aminosav]=20/60/1, illetőleg 20/1000/1; 1=4·10⁻⁹mol/10 μ l. Az elválasztás körülményeit lásd a 14. táblázatnál.

17. táblázat: Az egy OPA/ET-származékot adó aminosavak stabilitása a reakcióidő és a reaktánsok molarányának függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján, az OPA/ET=1/10 {80 (V/V)% metanoltartalmú, pH=9,3} reagenst alkalmazva

Aminosav ↓	Ret. időg, perc ↓	Integrátoregység/pmol																	
		FI									UV								
Reakcióidő, perc →		1,5	3	7	10	26	50	360	átlag	RSD %	1,5	3	7	10	26	50	360	átlag	RSD %
[OPA]/[aminosav]=120/1; 1=2·10 ⁻¹⁰ mol/10 µl																			
Aszparaginsav	4,48	3,04	3,41	3,88	3,94	4,33	4,43	4,53	4,43	2,26	0,22	0,29	0,32	0,34	0,35	0,38	0,34	0,35	5,4
Glutaminsav	5,67	3,76	4,08	4,46	4,50	4,71	4,75	4,91	4,67	3,99	0,31	0,33	0,36	0,37	0,38	0,40	0,40	0,38	4,68
Aszparagin	10,03	3,70	4,04	4,32	4,37	4,51	4,46	4,72	4,48	3,47	0,26	0,29	0,31	0,31	0,32	0,31	0,32	0,31	1,74
Glutamin	11,00	5,10	5,21	5,27	5,32	5,33	5,37	5,57	5,345	2,31	0,37	0,38	0,39	0,39	0,39	0,37	0,36	0,38	3,21
Treonin	13,9	4,11	4,53	4,91	4,96	5,07	5,10	5,11	5,03	1,78	0,27	0,30	0,33	0,34	0,34	0,35	0,34	0,34	2,08
Metionin	16,85	5,33	5,48	5,36	5,45	5,34	5,68	5,42	5,44	2,23	0,35	0,36	0,37	0,37	0,35	0,37	0,37	0,36	2,62
Triptofán	17,02	5,60	5,86	5,98	6,01	6,02	5,89	6,46	5,89	2,67	0,33	0,35	0,34	0,35	0,35	0,35	0,38	0,345	2,42
Izoleucin	17,43	5,39	5,86	6,01	6,10	6,18	6,33	6,63	6,25	3,88	0,34	0,36	0,38	0,37	0,39	0,38	0,41	0,39	3,93
[OPA]/[aminosav]=67/1; 1=2·10 ⁻¹⁰ mol/10 µl																			
Aszparaginsav	4,00	3,35	3,57	3,95	4,12	4,45	4,64	4,69	4,48	5,8	0,27	0,31	0,33	0,36	0,38	0,39	0,41	0,38	5,4
Glutaminsav	4,93	4,10	4,30	4,65	4,70	4,93	4,97	5,07	4,86	3,72	0,36	0,36	0,37	0,39	0,40	0,39	0,41	0,39	3,78
Aszparagin	9,57	3,90	4,25	4,54	4,64	4,70	4,67	4,89	4,69	2,73	0,28	0,33	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	0,34	1,28
Glutamin	10,35	5,70	5,82	5,90	5,70	5,80	5,83	6,04	5,85	1,95	0,36	0,38	0,38	0,40	0,37	0,38	0,38	0,38	2,57
Szerin	11,19	4,56	4,58	4,56	na ¹	4,54	4,53	3,72	4,55	0,42	0,33	0,33	0,32	na	0,32	0,32	0,26	0,32	1,69
Treonin	12,17	4,46	4,89	5,29	5,25	5,51	5,50	5,67	5,44	3,18	0,31	0,33	0,35	0,36	0,38	0,38	0,38	0,37	3,82
Arginin	13,67	5,02	5,09	5,08	na	5,06	5,07	4,89	5,06	0,53	0,33	0,34	0,34	na	0,33	0,34	0,33	0,33	1,63
Tirozin	14,90	5,20	5,22	5,28	na	5,23	5,21	5,30	5,24	0,77	0,32	0,33	0,33	na	0,33	0,32	0,32	0,32	1,68
Alanin	15,08	5,05	5,11	5,31	na	5,34	5,30	4,78	5,22	2,53	0,34	0,35	0,37	na	0,37	0,37	0,33	0,35	4,95
Metionin	16,63	6,42	6,62	6,92	6,87	6,63	6,69	6,62	6,68	2,52	0,40	0,40	0,42	0,41	0,41	0,40	0,42	0,40	2,20
Valin	16,80	5,62	5,72	5,87	na	5,88	5,85	5,63	5,76	2,09	0,33	0,34	0,34	na	0,35	0,34	0,34	0,34	1,86
Triptofán	16,83	5,26	5,37	5,51	5,49	5,22	5,45	5,67	5,42	2,85	0,33	0,30	0,33	0,31	0,32	0,31	0,33	0,31	3,81
Izoleucin	17,23	6,30	6,36	6,80	6,79	6,69	6,93	6,86	6,67	3,71	0,34	0,34	0,37	0,37	0,37	0,37	0,39	0,37	2,39
Fenilalanin	17,39	5,35	5,33	5,40	na	5,48	5,49	5,44	5,41	1,22	0,33	0,34	0,35	na	0,35	0,34	0,33	0,34	2,63
Leucin	17,57	5,51	5,59	5,75	na	5,77	5,74	5,57	5,65	1,96	0,36	0,37	0,36	na	0,36	0,36	0,34	0,36	2,74
[OPA]/[aminosav]=15/1; 1=2·10 ⁻¹⁰ mol/10 µl																			
Aszparaginsav	4,00	2,37	2,72	3,35	3,46	4,08	4,54	4,54	4,54	-	0,20	0,25	0,29	0,31	0,35	0,41	0,38	0,39	5,4
Glutaminsav	4,93	3,11	3,52	4,11	4,23	4,75	4,99	4,92	4,88	2,52	0,25	0,29	0,34	0,35	0,38	0,41	0,39	0,39	3,88
Aszparagin	9,57	2,98	3,62	4,28	4,38	4,66	4,78	4,78	4,74	1,46	0,23	0,27	0,32	0,33	0,35	0,36	0,35	0,35	1,63
Glutamin	10,35	4,76	5,65	5,73	5,92	5,69	5,80	5,74	5,75	1,65	0,33	0,38	0,39	0,41	0,39	0,40	0,40	0,39	2,65
Treonin	12,17	3,34	4,21	4,72	5,00	5,24	5,40	5,25	5,29	1,69	0,24	0,30	0,33	0,36	0,38	0,39	0,38	0,38	1,50
Metionin	16,90	5,77	6,09	6,51	6,38	6,47	6,58	6,32	6,45	1,60	0,34	0,39	0,41	0,40	0,40	0,41	0,39	0,40	2,23
Triptofán	17,10	4,56	4,93	5,12	5,15	5,21	5,13	5,41	5,15	3,00	0,26	0,28	0,30	0,30	0,29	0,30	0,30	0,29	1,50
Izoleucin	17,50	4,87	5,47	6,05	6,27	6,57	6,59	6,74	6,54	3,00	0,27	0,31	0,34	0,35	0,35	0,36	0,37	0,35	2,67

Jelölések, mint az 1.–16. táblázatoknál, valamint a *dölt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe.

Megjegyzés: Mérési körülmények: O-2 és E-2 oszlopok, 50 °C, 1ml/perc. 0perc: 70 % A-eluens + 30 % B-eluens; 1–6 perc: 50 % A-eluens+50 % B-eluens; 11–16 perc: 70 % B-eluens+30% ACN; 17–25 perc: 70 % A-eluens+30 % B-eluens

18. táblázat: Az alanin és lizin OPA/MPA-, OPA/N-acetil-L-cisztein (NAC)-, OPA/MCE-, OPA/ET- és OPA/ 2-merkaptotéanszulfonsav- (MESNA) származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján {OPA/RSH=1/3, 80 (V/V) % metanoltartalom, pH=9,3}

Aminosav↓ Detektálás→	Ret. idő ^g , perc↓	λ_{\max}^h , nm↓	Válaszjel ⁱ , %					
			FI			UV		
OPA/MPA								
Reakcióidő, perc→			7	47	307	7	47	307
Alanin	10,82	334	100	100	100	100	100	100
ie/pmól^l			4,35	4,33	4,08	0,36	0,36	0,34
Lizin1	10,95	343	2,93	3,27	13,28	0,10	1,21	5,72
Lizin2	11,43	334	88,46	84,61	54,50	93,35	89,88	76,34
Lizin3	11,55	339	8,61	12,11	32,22	6,55	8,91	17,94
ie/pmól			1,81	1,82	2,17	0,72	0,73	0,71
OPA/NAC								
Reakcióidő, perc→			7	47	267	7	47	267
Alanin	10,77	334	100	100	100	100	100	100
ie/pmól			3,66	3,66	3,67	0,39	0,39	0,41
Lizin1	11,22	334	97,15	95,09	87,30	99,78	99,21	95,83
Lizin2	11,33	339	2,85	4,91	12,70	0,22	0,79	4,17
ie/pmól			1,52	1,54	1,55	0,77	0,75	0,75
OPA/MCE								
Reakcióidő, perc→			7	47	220	7	47	220
Alanin	11,53	334	100	100	100	100	100	100
ie/pmól			4,60	4,32	3,31	0,34	0,32	0,24
Lizin1	12,20	339	0,69	1,37	3,99	5,42	9,88	20,37
Lizin2	12,30	334	0,81	0,94	3,42	5,08	5,71	14,50
Lizin3	12,63	339	0,16	0,48	1,70	0,09	0,17	0,65
Lizin4	12,80	334	94,44	93,53	87,16	87,00	81,57	60,37
Lizin5	13,02	343	3,90	3,69	3,74	2,41	2,68	4,11
ie/pmól			2,58	2,35	1,53	0,63	0,60	0,48
OPA/ET								
Reakcióidő, perc→			7	47	180	7	47	180
Alanin	12,12	334	100	100	100	100	100	100
ie/pmól			5,29	5,27	5,28	0,35	0,36	0,35
Lizin1	14,28	334	100	100	100	100	100	100
ie/pmól			5,98	5,94	5,72	0,69	0,70	0,69
OPA/MESNA								
Reakcióidő, perc→			7	47	140	7	47	140
Alanin	10,88	334	100	100	100	100	100	na ^j
ie/pmól			2,77	2,72	2,71	0,39	0,40	na
Lizin1	11,43	334	100	100	100	100	100	na
ie/pmól			1,29	1,29	1,30	0,78	0,79	na

Jelölések, mint az 1.–17. táblázatoknál.

Megjegyzés: E-2 és O-2 oszlopok, [OPA]/[amin]=40/1, 1=1·10⁻⁹ mol/10 μ l, 50 °C, 1 ml/perc. Gradiens: 0 perc: 100 % A-eluens ; 10–11 perc: 100 % AcN; 12–20 perc: 100 % A-eluens.

19. táblázat: Az alifás monoaminok OPA/MCE-származékainak stabilitása a reakcióidő és a reagensösszetétel függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Mólarány→ Detektálás→ Reakcióidő, perc→ Amin↓	Ret. idő ^g , perc↓	λ_{\max}^h , nm↓	Válaszjel ⁱ , %													
			OPA/MCE=1/3						OPA/MCE=1/50							
			FI			UV			FI				UV			
			7	47	87	7	47	87	1,5	7	47	87	1,5	7	47	87
Metilamin1	2,05	334	99,4	100	100	98,5	96,3	90,0	100	100	100	100	100	100	100	100
Metilamin2	4,31	334	0,6	nk ^k	nk	1,5	3,7	10,0	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
ie/pmoll			0,62	0,03	0,0024	0,13	0,0054	0,00066	5,00	4,20	1,10	0,35	0,30	0,25	0,07	0,02
Etilamin1	2,58	334	99,4	99,3	100	98,0	98,6	97,4	99,1	99,5	99,9	100	99,3	99,3	100	100
Etilamin2	3,49	334	nk	nk	nk	nk	nk	nk	0,9	0,5	0,1	0,0	0,7	0,7	0,0	0,0
Etilamin3	6,15	334	0,6	0,7	0,0	2,0	1,4	2,6	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
ie/pmoll			1,80	0,46	0,13	0,25	0,10	0,03	4,65	4,05	1,47	0,61	0,27	0,24	0,08	0,03
Etanolamin1	1,60	334	99,4	99,1	98,7	98,9	98,4	97,1	na ^j	na	na	na	na	na	na	na
Etanolamin2	2,19	334	0,6	0,9	1,3	1,1	1,6	2,9	na	na	na	na	na	na	na	na
ie/pmoll			1,38	0,64	0,30	0,32	0,16	0,06	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>n</i> -Propilamin1	3,48	334	0,1	1,3	2,9	0,1	1,3	3,0	99,4	99,3	99,3	99,4	98,9	98,7	99,0	99,4
<i>n</i> -Propilamin2	4,88	334	13,7	21,3	30,8	13,6	21,6	30,1	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
<i>n</i> -Propilamin3	5,74	334	86,2	77,4	66,3	86,3	77,1	66,9	0,6	0,7	0,7	0,6	1,1	1,3	1,0	0,6
ie/pmoll			2,01	1,03	0,61	0,39	0,20	0,12	6,81	5,95	2,43	1,03	0,39	0,34	0,14	0,06
<i>i</i> -Propilamin1	3,31	334	100	100	100	100	100	100	99,5	99,4	99,4	99,6	98,6	98,6	98,7	98,4
<i>i</i> -Propilamin2	5,38	334	nk	nk	nk	nk	nk	nk	0,5	0,6	0,6	0,4	1,4	1,4	1,3	1,6
ie/pmoll			1,98	1,59	1,30	0,39	0,32	0,26	4,45	5,44	2,71	1,31	0,26	0,32	0,16	0,08
<i>n</i> -Butilamin1	5,05	334	7,6	12,8	20,9	8,1	13,4	21,1	99,6	na	99,9	99,9	99,1	na	100	100
<i>n</i> -Butilamin2	5,62	343	0,2	1,5	3,1	0,1	1,2	3,9	nk	na	nk	nk	nk	na	nk	nk
<i>n</i> -Butilamin3	8,68	334*	92,2	85,7	76,0	91,8	85,4	75,0	0,4	na	0,1	0,1	0,9	na	0,0	0,0
ie/pmoll			1,42	0,67	0,35	0,28	0,13	0,07	5,51	na	1,38	0,59	0,32	na	0,08	0,03
<i>i</i> -Butilamin1	3,36	334	0,8	1,3	1,9	0,9	1,3	2,2	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
<i>i</i> -Butilamin2	4,48	334	nk	nk	nk	nk	nk	nk	3,6	11,1	14,3	17,1	3,8	11,7	14,1	17,8
<i>i</i> -Butilamin3	4,85	334	98,6	98,2	98,0	98,2	97,5	96,6	96,4	88,9	85,7	82,9	96,2	88,3	85,9	82,2
<i>i</i> -Butilamin4	8,32	334	0,6	0,5	0,1	0,9	1,2	1,2	nk	na	nk	nk	nk	nk	nk	nk
ie/pmoll			1,66	0,91	0,54	0,32	0,18	0,10	6,30	6,13	3,12	1,62	0,37	0,35	0,17	0,09
<i>s</i> -Butilamin1	3,36	334	1,2	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	na
<i>s</i> -Butilamin2	4,41	334	98,5	98,3	98,3	97,7	97,6	97,8	99,4	100	99,3	nk	99,0	100	98,7	na
<i>s</i> -Butilamin3	7,66	330 [@]	0,3	0,4	0,3	0,9	1,0	0,8	0,6	0,0	0,7	nk	1,0	0,0	1,3	na
ie/pmoll			1,86	1,65	1,50	0,37	0,32	0,29	7,33	7,49	4,48	nk	0,41	0,42	0,25	na
<i>t</i> -Butilamin1	3,47	334	9,7	5,3	5,9	1,3	0,5	0,6	na	nk	nk	nk	na	nk	nk	nk
<i>t</i> -Butilamin2	4,10	339	90,3	94,7	94,1	98,7	99,5	99,4	na	100	100	100	na	100	100	100
ie/pmoll			0,11	0,17	0,16	0,16	0,25	0,22	na	0,045	0,091	0,085	na	0,025	0,046	0,041

Jelölések, mint az 1.–18. táblázatoknál, valamint [@]–és/vagy 334 nm;

Megjegyzés: [OPA]/[MCE]/[amin]=20/60/1; 1=1·10⁻⁹ mol/10 µl.

20. táblázat: Az alifás monoaminok OPA/ET=1/10 molarányú {80 (V/V)% metanoltartalmú, pH=9,30} reagenssel képzett származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (Fl) detektálások alapján

Aminosav↓	Ret. idő ^g , perc ↓	λ_{\max}^h , nm	Válaszjel ⁱ , %							
			Fl				UV			
Reakcióidő, perc →			1,5	2	180	360	1,5	2	180	360
Etanolamin1	3,74	334	99,55	99,58	99,62	99,23	99,68	99,65	99,67	99,27
Etanolamin2	4,89	343	0,45	0,42	0,38	0,77	0,32	0,35	0,33	0,73
integrátoregység/pmol			6,03	6,06	6,16	5,81	0,40	0,39	0,41	0,41
Metilamin1	4,06	339	nk ^k	0,40	4,49	6,04	nk	0,13	3,94	6,05
Metilamin2	5,24	334	99,84	99,50	94,75	92,54	99,82	99,85	95,35	92,69
Metilamin3	8,96	343	0,16	0,10	0,76	1,43	0,18	0,02	0,72	1,26
integrátoregység/pmol			6,39	6,42	6,64	5,63	0,42	0,42	0,42	0,42
Etilamin1	4,89	339	nk	0,01	0,90	1,98	nk	nk	0,69	1,70
Etilamin2	6,04	334	99,88	99,95	98,76	97,52	99,97	99,91	99,20	98,01
Etilamin3	10,44	343	0,12	0,04	0,34	0,50	0,03	0,09	0,11	0,29
integrátoregység/pmol			5,39	5,43	5,46	5,23	0,34	0,35	0,35	0,35
<i>n</i> -Propilamin1	5,18	339	0,06	0,05	0,89	2,19	nk	nk	0,51	1,50
<i>n</i> -Propilamin2	7,22	334	99,89	99,90	98,86	97,30	100	99,99	99,30	98,16
<i>n</i> -Propilamin3	11,98	343	0,05	0,05	0,25	0,51	nk	0,01	0,19	0,34
integrátoregység/pmol			6,85	6,93	6,96	6,80	0,44	0,44	0,44	0,44
<i>i</i> -Propilamin1 [§]	7,03	334	100	100	100	100	100	100	100	100
integrátoregység/pmol			4,64	5,59	6,47	5,85	0,34	0,37	0,42	0,43
<i>n</i> -Butilamin1	6,05	339	0,04	0,05	0,59	1,12	nk	nk	0,47	0,89
<i>n</i> -Butilamin2	8,72	334	99,95	99,90	99,20	98,44	99,91	99,93	99,38	98,77
<i>n</i> -Butilamin3	13,78	343	0,01	0,05	0,21	0,44	0,09	0,07	0,15	0,34
integrátoregység/pmol			6,14	6,24	6,21	5,62	0,40	0,40	0,40	0,40
<i>i</i> -Butilamin1	6,06	339	nk	0,01	0,51	1,63	nk	nk	0,43	1,18
<i>i</i> -Butilamin2	8,46	334	99,98	99,97	99,3	98,01	99,96	99,98	99,44	98,48
<i>i</i> -Butilamin3	13,04	343	0,02	0,02	0,18	0,35	0,04	0,02	0,13	0,34
integrátoregység/pmol			6,11	6,16	5,67	5,25	0,40	0,40	0,40	0,41
<i>n</i> -Amilamin1	6,49	339	nk	nk	0,38	1,35	nk	nk	0,19	0,94
<i>n</i> -Amilamin2	10,02	334	100	100	99,52	98,47	100	100	99,74	98,82
<i>n</i> -Amilamin3	15,03	343	nk	nk	0,10	0,18	nk	nk	0,07	0,25
integrátoregység/pmol			6,12	5,98	5,62	5,62	0,40	0,40	0,40	0,40
<i>i</i> -Amilamin1	7,29	339	nk	nk	0,75	2,53	nk	nk	0,53	1,92
<i>i</i> -Amilamin2	10,06	334	100	100	99,11	97,47	100	100	99,42	98,08
<i>i</i> -Amilamin3	15,74	343	nk	nk	0,13	nk	nk	nk	0,05	nk
integrátoregység/pmol			5,95	5,82	5,35	5,04	0,41	0,40	0,42	0,42

Jelölések, mint az 1.–19. táblázatoknál, valamint [§]=a válaszjelek 7 perc után érik el a maximumot; Fl: 6.30 és UV: 0.41 ie/pmol.

Megjegyzés: [OPA]/[amin]=70/1; 1=1·10⁻⁹ mol/10 µl; Mérési körülmények: O-2 és E-2 oszlopok, 50 °C, 1 ml/perc, gradiens: 0 perc: 50 % B-eluens+50 % AcN; 5–7 perc: 30 % B-eluens + 70 % ACN; 8–16 perc: 50 % B-eluens+50 % AcN;

21. táblázat: A *n*-hexil-, *n*-heptil-, *n*-oktil- és β -feniletilamin OPA/MPA=OPA/NAC=OPA/MCE=OPA/ET=1/3 mólarányú (pH=9,30) reagensekkel képzett származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultrabolya (UV) és fluoreszcens (Fl) detektálások alapján

Amin↓	λ_{\max}^h , nm↓	OPA/MPA						OPA/NAC						OPA/MCE						OPA/ET				
		Ret. idő ^g , perc↓	Fl válaszijel ⁱ , %					Ret. idő, perc	Fl válaszijel, %					Ret. idő, perc	Fl válaszijel, %					Ret. idő, perc	Fl válaszijel, %			
			1,5	7	60	180	360		1,5	7	180	360	1,5		7	30	60	180	1,5		7	30	60	3
<i>n</i> -Hexilamin 1	334	6,18	99,4	84,2	64,4	51,6	39,4	3,66	100	98,2	84,5	78,1	4,70	99,5	99,3	99,1	98,7	98,1	3,55	100	100	100	100	100
<i>n</i> -Hexilamin 2	339	5,70	0,6	15,8	35,6	48,4	60,6	3,51	0,0	1,8	15,5	21,9	5,90	0,5	0,7	0,9	1,3	1,9		nk ^k	nk	nk	nk	nk
integrátoregység/pmol	Fl		6,18	6,67	6,99	7,84	6,10		4,68	4,73	5,21	4,80		4,84	4,58	3,23	2,24	0,28		5,47	5,53	5,47	5,26	5,12
	UV		0,47	0,55	0,59	0,59	0,59		0,52	0,51	0,51	0,47		0,34	0,31	0,22	0,15	0,02		0,35	0,36	0,36	0,33	0,32
<i>n</i> -Heptilamin1	334	8,84	97,7	89,5	66,3	40,4	25,6	4,67	99,3	97,6	76,7	67,2	6,01	99,5	99,4	99,4	99,4	99,0	6,43	100	100	100	100	100
<i>n</i> -Heptilamin2	339	7,93	2,3	10,5	33,7	59,6	74,4	4,30	0,7	2,4	23,3	32,8	7,79	0,5	0,6	0,6	0,6	1,0		nk	nk	nk	nk	nk
integrátoregység/pmol	Fl		4,96	4,72	5,29	4,55	3,20		3,30	3,32	3,89	3,60		5,46	5,49	5,19	4,80	3,59		6,08	6,03	6,05	5,94	5,27
	UV		0,38	0,39	0,39	0,32	0,22		0,36	0,39	0,38	0,35		0,38	0,37	0,35	0,33	0,25		0,39	0,39	0,39	0,38	0,34
<i>n</i> -Oktilamin1	334	13,13	98,0	89,1	69,2	44,0	30,0	6,37	99,6	97,8	70,6	57,2	7,61	99,0	99,1	98,9	98,9	98,7	7,86	99,6	99,5	99,5	99,5	99,8
<i>n</i> -Oktilamin2	339	11,50	2,0	10,9	30,8	56,0	70,0	5,82	0,4	2,2	29,4	42,8	9,98	1,0	0,9	1,1	1,1	1,3	10,16	0,4	0,5	0,5	0,5	0,2
integrátoregység/pmol	Fl		4,37	4,37	4,91	3,67	2,58		3,27	3,32	3,81	3,50		5,46	5,49	5,19	4,80	3,59		5,90	5,80	6,07	5,85	5,47
	UV		0,35	0,36	0,36	0,36	0,18		0,36	0,36	0,38	0,35		0,38	0,37	0,35	0,33	0,25		0,39	0,40	0,40	0,38	0,37
β -Feniletilamin1	334	7,85	96,5	92,3	59,6	25,5	11,7	5,03	98,0	96,3	70,0	55,0	3,41	99,0	99,2	98,8	98,6	98,3	3,31	100	99,9	99,9	99,9	99,6
β -Feniletilamin2	339	8,43	3,5	7,7	40,4	74,5	88,3	6,27	2,0	3,7	30,0	45,0	4,00	1,0	0,8	1,2	1,4	1,7	5,85	nk	0,1	0,1	0,1	0,4
integrátoregység/pmol	Fl		5,69	5,93	6,51	5,39	2,40		3,73	3,78	3,94	3,78		5,19	4,33	3,59	2,58	0,43		6,03	6,07	5,98	5,95	5,66
	UV		0,35	0,35	0,36	0,29	0,13		0,38	0,40	0,38	0,38		0,37	0,34	0,26	0,18	0,04		0,41	0,41	0,40	0,40	0,38

Jelölések, mint az 1.–20. táblázatoknál.

Megjegyzés: [OPA]/[amin]=20/60/1; $1=1 \cdot 10^{-9}$ mol/dm³; Az elválasztás körülményei: OPA/MPA-reagens: 30 °C, 1 ml/perc, 30 % A-eluens + 70 % AcN, izokratikusan, O-1 és E-1 oszlopokkal. OPA/NAC-reagens: 30 °C, 1 ml/perc, O-1 és E-1 oszlopokon, gradiens: 0perc: 50 % A-eluens + 50 % MeOH; 3–10 perc: 20 % A-eluens + 80 % MeOH; 11–18 perc: 50 % A-eluens + 50 % MeOH; OPA/MCE-reagens: 30 °C, 1,2 ml/perc, O-2 és E-1 oszlopokon; 50 % B-eluens + 50 % AcN izokratikusan; OPA/ET-reagens, 30 °C, 1,2 ml/perc, O-1 és E-1 oszlopokon, 30 % B-eluens + 70 % AcN.

22. táblázat: A *n*-hexil-, *n*-heptil-, *n*-oktilamin, glicin és alanin OPA/MPA=1/50 molarányú, különböző pH-értékű reagensekkel képzett származékai-
nak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Amin/aminosav↓	Ret. idő ^g , perc ↓	λ_{\max}^h , nm↓	Válaszjel ⁱ , %															
			pH=8,80				pH=9,30				pH=9,75				pH=10,25			
Reakcióidő, perc →			7	60	180	360	7	60	180	360	7	60	180	360	7	60	180	360
<i>n</i> -Hexilamin0	2,09	343	4,16	15,5	31,2	97,6	4,1	10,6	25,2	39,0	3,8	7,5	11,4	22,7	1,1	2,1	4,1	6,6
<i>n</i> -Hexilamin1	4,56	334	95,8	83,5	66,9	2,0	95,9	88,6	73,4	59,7	96,1	91,5	87,5	76,2	98,9	97,9	95,9	93,4
<i>n</i> -Hexilamin2	4,17	339	0,04	1,0	1,9	0,4	nk ^k	0,8	1,4	1,3	0,1	1,0	1,1	1,1	nk	nk	nk	nk
integrátoregység/pmol	FI		2,05	4,38	4,46	4,95	3,98	5,03	5,19	5,36	5,02	5,00	4,92	4,86	4,77	4,89	4,86	4,79
	UV		0,19	0,29	0,32	0,34	0,28	0,38	0,39	0,44	0,70	0,37	0,37	0,37	0,37	0,36	0,36	0,36
<i>n</i> -Heptilamin0	2,56	343	3,5	13,0	25,7	94,1	4,1	7,9	20,2	32,5	3,0	8,2	17,9	21,5	2,9	4,4	6,1	8,8
<i>n</i> -Heptilamin1	6,71	334	96,4	85,6	72,0	5,1	95,8	91,1	78,1	65,9	96,8	90,3	80,4	76,9	97,1	94,8	92,7	90,2
<i>n</i> -Heptilamin2	6,10	339	0,1	1,4	2,3	0,8	0,1	1,0	1,7	1,6	0,2	1,5	1,7	1,6	nk	0,8	1,2	1,0
integrátoregység/pmol	FI		2,63	4,61	4,79	4,92	4,48	5,20	5,16	5,15	5,40	5,08	4,72	4,62	5,29	5,32	5,16	4,26
	UV		0,19	0,33	0,35	0,35	0,33	0,39	0,38	0,38	0,42	0,38	0,36	0,37	0,40	0,39	0,39	0,40
<i>n</i> -Oktilamin0	3,25	343	2,1	11,5	28,8	95,3	2,4	6,8	21,8	37,5	1,5	6,5	16,2	22,1	0,8	1,9	3,9	6,9
<i>n</i> -Oktilamin1	9,95	334	97,8	87,0	68,9	4,1	97,5	92,2	76,3	60,8	98,4	92,0	82,0	76,2	99,2	97,5	95,2	92,1
<i>n</i> -Oktilamin2	9,11	339	0,1	1,5	2,3	0,6	0,1	1,0	1,9	1,7	0,1	1,5	1,8	1,7	nk	0,6	0,9	1,0
integrátoregység/pmol	FI		2,54	4,51	4,67	5,65	4,27	4,96	4,58	4,33	5,16	4,28	4,14	3,93	5,31	5,09	4,88	3,98
	UV		0,19	0,35	0,35	0,39	0,32	0,37	0,34	0,32	0,39	0,36	0,31	0,29	0,9	0,38	0,37	0,30
Glicin0	2,12	343	1,2	10,2	23,2	43,9	na ^l	7,4	16,0	26,8	na	na	na	na	0,2	0,7	1,5	2,8
Glicin1	2,90	334	98,8	89,8	76,8	56,1	na	92,6	84,0	73,2	na	na	na	na	99,8	99,3	98,5	97,2
integrátoregység/pmol	FI		3,20	4,59	4,42	4,42	na	4,70	4,51	4,39	na	na	na	na	4,80	4,68	4,56	4,40
	UV		0,26	0,39	0,39	0,39	na	0,41	0,41	0,39	na	na	na	na	0,90	0,38	0,38	0,36
Alanin0	2,65	343	0,5	2,5	5,7	12,3	na	2,1	5,2	9,0	na	na	na	na	0,0	0,1	0,3	0,4
Alanin1	4,75	334	99,5	97,5	94,3	87,7	na	97,9	94,8	91,0	na	na	na	na	100	99,9	99,7	99,6
integrátoregység/pmol	FI		0,89	2,96	3,83	4,06	na	4,23	4,23	4,23	na	na	na	na	3,83	4,24	4,23	4,23
	UV		0,08	0,26	0,34	0,36	na	0,37	0,37	0,37	na	na	na	na	0,34	0,38	0,37	0,37

Jelölések, mint az 1.–21. táblázatoknál.

Megjegyzés: [OPA]/[MPA]/[A]=20/1000/1; $1=1 \cdot 10^{-9}$ mol/dm³

23. táblázat: A *n*-hexil-, *n*-heptil-, *n*-oktil- és β -feniletilamin, OPA/NAC=OPA/MCE=OPA/ET=1/50 molarányú, pH=8,8 és/vagy 9,3 értékű reagen-
sekkel képzett származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultrabolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Amin↓	λ_{\max}^h , nm↓	OPA/NAC						OPA/MCE										OPA/ET										
		Ret. idő ^g , perc ↓	Válaszjel ⁱ , %, pH=8,80				Ret. idő, perc c ↓	Válaszjel, %										Ret. idő, perc ↓	Válaszjel, %									
								pH=8,80					pH=9,30															
			7	60	180	300		1,5	7	30	120	180	1,5	7	30	120	180		1,5	7	30	120	180	1,5	7	30	120	180
Reakcióidő, perc→																												
<i>n</i> -Hexilamin0	343	7,05	0,2	1,4	3,1	6,8	3,87	nk	0,1	0,5	3,5	11,5	nk	nk	nk	nk	nk	3,67	nk	nk	nk	0,1	0,4	nk	nk	nk	nk	nk
<i>n</i> -Hexilamin1	334	9,68	99,8	97,9	95,5	91,5	4,71	99,5	99,4	98,8	95,8	88,0	99,4	99,3	98,1	97,6	99,7	5,34	100	100	100	99,9	99,6	100	100	100	100	100
<i>n</i> -Hexilamin2	339	7,53	nk ^k	0,7	1,4	1,7	5,90	0,5	0,5	0,7	0,7	0,5	0,6	0,7	1,9	2,4	0,3		nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
integrátoregység/pmol	FI	0,84	2,02	2,47	2,57		1,79	2,39	3,23	2,29	1,12	4,88	4,46	3,57	2,23	0,70		4,07	4,59	4,68	4,65	4,55	5,23	5,45	5,44	5,21	5,14	
	UV	0,12	0,28	0,35	0,36		0,12	1,16	0,23	0,16	0,08	0,33	0,32	0,25	0,15	0,05		0,30	0,33	0,33	0,32	0,32	0,32	0,34	0,34	0,33	0,32	
<i>n</i> -Heptilamin0	343	7,30	0,1	0,8	1,4	1,3	4,56	0,3	0,4	0,8	2,1	6,0	nk	nk	nk	nk	nk		nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
<i>n</i> -Heptilamin1	334	10,35	99,9	98,1	93,8	91,7	5,83	99,3	99,0	97,6	95,7	92,6	99,5	99,6	99,2	98,6	98,3	6,68	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>n</i> -Heptilamin2	339	8,08	nk	1,1	4,8	7,0	7,48	0,4	0,6	1,6	2,2	1,4	0,5	0,4	0,8	1,4	1,7		nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
integrátoregység/pmol	FI	0,83	1,96	2,27	2,50		1,89	2,75	3,75	3,11	1,85	5,61	5,29	5,09	4,76	4,03		4,40	4,61	4,78	4,88	4,70	5,79	5,98	5,99	5,64	5,53	
	UV	0,11	0,28	0,35	0,35		0,13	0,19	0,27	0,22	0,13	0,37	0,37	0,35	0,32	0,28		0,32	0,33	0,34	0,33	0,32	0,36	0,37	0,37	0,35	0,34	
<i>n</i> -Oktilamin0	343	8,93	0,4	2,2	4,1	7,0	5,87	0,2	0,4	0,6	1,4	3,2	1,4	1,4	1,2	1,0	0,7		nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
<i>n</i> -Oktilamin1	334	11,00	99,6	96,8	94,8	92,0	7,46	98,9	98,4	97,5	95,6	93,3	97,6	97,6	97,8	97,7	97,7	7,86	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>n</i> -Oktilamin2	339	10,83	nk	1,0	1,1	1,0	9,86	0,9	1,2	1,9	3,0	3,5	1,0	1,0	1,0	1,3	1,6		nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk	nk
integrátoregység/pmol	FI	0,89	2,36	2,55	2,60		1,79	2,94	3,96	3,89	2,98	5,65	5,46	5,28	5,19	4,86		4,49	4,76	4,94	4,92	4,61	4,82	5,97	5,87	5,47	5,29	
	UV	0,13	0,35	0,38	0,38		0,12	0,20	0,28	0,27	0,21	0,38	0,38	0,37	0,35	0,32		0,33	0,34	0,36	0,34	0,32	0,36	0,37	0,37	0,34	0,33	
β -Feniletilamin1	334		na	na	na	na	3,41	na	na	na	na	na	99,5	99,0	98,1	98,0	100	3,37	100	100	99,9	99,5	99,0	100	100	99,9	99,8	99,7
β -Feniletilamin2	339		na	na	na	na	4,00	na	na	na	na	na	0,5	1,0	1,9	2,0		6,33	nk	nk	0,1	0,5	1,0	nk	nk	0,1	0,2	0,3
integrátoregység/pmol	FI	na	na	na	na		na	na	na	na	na	5,36	4,90	3,73	2,25	0,59		4,55	4,73	4,71	4,83	4,48	5,79	6,08	5,98	5,74	5,65	
	UV	na	na	na	na		na	na	na	na	na	0,37	0,35	0,20	0,16	0,04		0,35	0,35	0,35	0,35	0,33	0,38	0,39	0,39	0,38	0,37	

Jelölések, mint az 1.–22. táblázatoknál.

Megjegyzés: [OPA]/[RSH]/[amin]=20/1000/1; 1=1·10⁻⁹ mol/dm³;

24. táblázat: A *n*-hexil-, *n*-heptil- és *n*-oktilamin különböző mennyiségének egyidejű meghatározása, OPA/ET=1/3 molarányú reagens alkalmazásával, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (Fl) detektálások alapján

Amin↓	Ret. idő ^g , min ↓	Detektálás↓	Integrátoregység/pmol ^o										
			Injektált mennyiség, pmol →										
			1800	900	450	225	112,5	62,25	31,125	15,625	7,81	átlag ^p	RSD %
<i>n</i> -Hexilamin	5,58	Fl	-	7,52	7,53	7,49	7,53	7,53	7,42	7,70	7,54	7,53	0,97
		UV	0,52	0,50	0,50	0,50	0,51	0,50	0,51	0,51	0,51	0,52	0,51
<i>n</i> -Heptilamin	7,00	Fl	5,95	5,89	5,87	5,78	5,79	5,70	5,40	5,46	5,43	5,70	3,7
		UV	0,40	0,39	0,39	0,38	0,38	0,36	0,36	0,36	0,36	0,38	0,38
<i>n</i> -Oktilamin	8,95	Fl	6,94	6,82	6,72	6,58	6,61	6,43	6,14	6,16	6,14	6,50	4,7
		UV	0,47	0,46	0,45	0,44	0,44	0,44	0,42	0,43	0,41	0,44	4,0

Jelölések, mint az 1.–23. táblázatoknál.

Megjegyzés: ^o=három párhuzamos mérés alapján; átlag^p=átlagok, amiket a következő molarányokkal kaptunk: [OPA]/[amin]=7:1; 14:1; 28 :1; 56:1; 112:1; 224:1; 448:1; 996:1; 1982:1; [OPA]=1,86·10⁻⁶ mol/dm³.

25. táblázat: A poliaminok OPA/MCE-származékainak stabilitása a reakcióidő és a reagensösszetétel függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálások alapján

Mólarány→ Detektálás→ Reakcióidő, perc → Amin↓	Ret. idő ^g , perc↓	λ_{\max}^h , nm↓	Válaszjel ⁱ , %																	
			OPA/MCE=1/3								OPA/MCE=1/50									
			FI				UV				FI				UV					
			1,5	7	27	141	1,5	7	27	141	1,5	7	27	87	127	1,5	7	27	87	127
Hisztamin1	8,55	334	88,9	90,2	89,3	92,9	91,9	94,4	91,8	89,4	84,1	85,2	86,9	100	92,5	92,0	92,0	93,0	94,9	97,9
Hisztamin2	9,19	348	11,1	9,8	10,7	7,1	8,1	5,6	8,2	10,6	15,9	14,8	13,1	0,0	7,5	8,0	8,0	7,0	5,1	2,1
integrátoregység/pmol			5,00	4,39	3,11	0,74	0,29	0,25	0,18	0,04	4,61	4,09	2,83	0,17	0,20	0,25	0,23	0,15	0,01	0,01
BHMTA1 ^q	8,62	334	3,9	3,2	2,5	0,7	2,5	2,3	1,5	0,0	3,6	3,1	2,2	0,7	0,1	2,7	2,3	1,7	0,4	0,0
BHMTA2	9,62	334	2,5	2,0	1,7	0,5	0,5	0,7	0,0	0,0	2,6	2,2	1,6	0,6	0,0	3,3	1,8	1,4	0,5	0,0
BHMTA3	10,92	334	1,8	1,1	1,2	1,3	3,6	2,8	3,5	4,1	1,8	2,0	2,8	2,7	3,1	5,0	5,3	7,2	7,2	7,9
BHMTA4	11,60	334	90,2	91,5	92,7	95,5	90,7	92,2	93,6	94,8	89,1	89,6	89,3	90,1	88,4	87,4	88,0	86,5	86,2	83,6
BHMTA5	12,09	334	1,7	2,2	1,9	2,0	2,7	2,0	1,5	1,1	3,0	3,1	4,1	6,0	8,4	1,6	2,6	3,2	5,7	8,5
integrátoregység/pmol			5,90	6,34	5,75	5,34	0,48	0,47	0,43	0,40	6,02	5,81	5,55	4,77	3,98	0,49	0,47	0,45	0,39	0,33
Agmatin1	9,85	334	95,2	90,9	93,2	91,2	74,7	75,3	71,9	64,7	91,6	91,5	90,1	86,7	80,1	76,1	76,8	73,7	67,9	58,4
Agmatin2	11,25	334	4,8	9,1	6,8	8,8	25,3	24,7	28,1	35,3	8,4	8,5	9,9	13,3	19,9	23,9	23,2	26,3	32,1	41,6
integrátoregység/pmol			3,67	3,28	2,56	0,56	0,25	0,23	0,18	0,09	3,92	3,85	2,83	1,40	0,55	0,30	0,28	0,21	0,11	0,04
Tiramin1 ^r	9,83	334	99,4	99,6	99,6	99,8	98,3	98,7	98,4	95,7	99,0	98,5	98,4	98,5	na ^j	98,1	97,0	97,4	97,8	na
Tiramin2	11,25	334	0,6	0,4	0,4	0,2	1,7	1,3	1,6	4,3	1,0	1,5	1,6	1,5	na	1,9	3,0	2,6	2,2	na
integrátoregység/pmol			6,07	5,72	3,98	3,25	0,41	0,37	0,26	0,22	6,33	5,86	4,31	1,48	na	0,40	0,36	0,26	0,09	na
Putreszcín1 ^s	10,08	334	1,2	1,4	1,6	1,6	4,0	4,4	5,0	5,5	1,5	1,5	1,5	2,1	2,5	4,9	4,9	5,0	6,6	8,1
Putreszcín2	11,07	334	96,7	96,4	96,1	96,2	94,1	93,5	92,9	92,0	95,2	94,9	94,0	92,8	90,8	91,6	91,2	90,0	87,8	84,8
Putreszcín3	11,52	334	2,1	2,2	2,3	2,2	1,9	2,1	2,1	2,5	3,3	3,6	4,5	5,1	6,7	3,5	3,9	5,0	5,5	7,1
integrátoregység/pmol			1,87	1,95	1,90	1,7	0,44	0,47	0,46	0,41	2,76	2,81	2,92	2,63	2,37	0,65	0,67	0,66	0,63	0,57
Spermidin1	10,41	334	25,8	25,6	20,6	17,6	9,3	9,6	8,7	6,5	29,6	27,3	34,7	72,2	na	13,2	10,7	12,1	8,0	na
Spermidin2	16,05	334	74,2	74,4	79,4	82,4	47,9	43,6	44,0	46,9	70,4	72,7	65,3	27,8	na	43,3	44,4	34,7	4,1	na
Spermidin3	11,67	334	0,0	0,0	0,0	0,0	42,8	46,8	47,3	46,6	0,0	0,0	0,0	0,0	na	43,5	44,9	53,2	87,9	na
integrátoregység/pmol			1,89	1,47	1,29	1,21	0,28	0,29	0,27	0,25	1,99	2,05	1,60	0,28	na	0,36	0,35	0,31	0,19	na
Spermin1	10,41	334	72,4	76,8	80,1	84,6	55,3	56,8	66,1	75,2	97,6	na	96,9	94,0	na	90,2	na	97,8	71,4	na
Spermin2	16,05	334	27,6	23,2	19,9	15,4	44,7	43,2	33,9	24,8	2,4	na	3,1	6,0	na	9,8	na	12,2	28,6	na
integrátoregység/pmol			2,18	1,82	1,41	0,90	0,17	0,15	0,10	0,06	1,36	na	1,07	0,38	na	0,09	na	0,07	0,03	na
Kadaverin1	10,44	334	0,6	0,7	0,8	0,6	3,6	3,9	4,7	4,6	1,2	1,1	1,5	1,2	1,3	5,8	5,8	6,8	7,9	9,0
Kadaverin2	11,37	334	99,4	99,3	99,2	99,4	96,4	96,1	95,3	95,4	98,8	98,9	98,5	98,8	98,7	94,2	94,2	93,2	92,1	91,0
integrátoregység/pmol			2,45	2,84	2,78	2,59	0,34	0,36	0,36	0,32	2,75	2,83	2,68	2,49	2,26	0,34	0,35	0,34	0,32	0,29

Jelölések, mint az 1.–24. táblázatoknál, valamint BHMTA1–5^q=bisz(hexametilén)triamin.

Megjegyzés: ^r=OPA/MCE=1/3 mólaránynál a reakcióidők rendre: 1,5 perc, 7 perc, 27 perc, 61 perc; ^s=OPA/MCE=1/3 mólaránynál a reakcióidők rendre: 1,5 perc, 7 perc, 27 perc, 81 perc;

26. táblázat: A biogén aminok OPA/ET=1/10 molarányú, 20 (V/V)% metanoltartalmú, 9,3-as pH-értékű reagenssel képzett származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultrabolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálás alapján

Amin↓		Ret. idő%, perc↓	λ _{max} ^h , nm↓	Válaszjel ⁱ , %															
Detektálás→				FI								UV							
Reakcióidő, perc→				1,5	3	5	7	27	42	82	122	1,5	3	5	7	27	42	82	122
Spermidin1		6,57	334	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
integrátoregység/pmol				5,01	5,22	5,09	5,37	5,05	5,49	5,64	5,29	0,53	0,50	0,51	0,51	0,47	0,49	0,49	0,46
Reakcióidő, perc→				1,5	3	5	7	17	27	42	72	1,5	3	5	7	17	27	42	72
Spermin1		6,62	334	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
integrátoregység/pmol				0,019	0,021	0,018	0,021	0,019	0,015	0,016	0,016	0,0014	0,0016	0,0018	0,0012	0,0012	0,0012	0,0010	0,0002
Reakcióidő, perc→				1,5	3	5	7	25	35	38	74	1,5	3	5	7	25	35	38	74
Putreszcín1		4,24	334	1,29	0,95	0,79	1,4	1,65	1,66	1,55	1,68	0,54	2,56	4,08	4,06	6,65	7,50	8,19	9,78
Putreszcín2		6,60	343	0,02	0,42	0,57	0,29	0,61	0,84	1,01	1,27	0,05	0,62	1,21	1,11	2,14	2,89	3,15	3,93
Putreszcín3		7,14	334	98,36	97,14	96,38	96,12	93,58	92,58	92,85	90,46	99,41	95,96	93,44	93,92	89,25	87,36	86,48	83,27
Putreszcín4		12,97	339	0,33	1,49	2,27	2,19	4,16	4,92	4,59	6,59	0,00	0,86	1,28	0,91	1,96	2,26	2,18	3,02
integrátoregység/pmol				4,27	4,01	3,79	3,68	3,23	3,11	2,60	2,45	0,69	0,64	0,62	0,58	0,52	0,50	0,45	0,41
Reakcióidő, perc→				1,5	3	5	7	25	38	74	110	1,5	3	5	7	25	38	74	110
Hisztamin1		7,38	334	84,92	82,55	84,90	86,85	78,18	72,45	64,17	57,96	73,62	74,28	74,06	85,81	86,77	81,59	75,25	71,77
Hisztamin2		8,09	339	15,08	10,52	8,76	13,08	21,44	26,6	33,62	38,75	23,93	5,95	4,8	4,19	13,04	17,53	22,55	24,04
Hisztamin3		12,03	339	0,00	6,02	6,16	0,05	0,15	0,35	0,72	1,21	1,43	19,59	20,01	0,00	0,00	0,22	0,71	1,11
Hisztamin4		12,21	339	0,00	0,91	0,19	0,02	0,22	0,61	1,49	2,08	1,01	0,18	1,13	0,00	0,19	0,67	1,49	3,08
integrátoregység/pmol				5,86	6,46	6,4	5,69	4,82	4,36	3,11	2,17	0,31	0,39	0,40	0,27	0,23	0,2	0,13	0,08
Reakcióidő, perc→				1,5	3	5	7	25	38	74	110	1,5	3	5	7	25	38	74	110
Kadaverin1		4,74	334	0,01	0,051	0,099	0,09	0,28	0,48	0,64	0,80	0,16	0,40	1,36	1,52	4,15	6,21	8,32	10,45
Kadaverin2		7,81	343	0,08	0,00	0,06	0,11	0,07	0,08	0,11	0,16	0,04	0,04	0,39	0,08	0,64	0,68	0,9	1,11
Kadaverin3		8,44	334	99,87	99,81	99,33	99,41	98,42	97,56	96,71	95,95	99,74	99,45	97,8	98,02	94,03	91,55	88,64	85,84
Kadaverin4		16,12	343	0,04	0,14	0,52	0,39	1,22	1,87	2,53	3,09	0,07	0,12	0,44	0,37	1,17	1,55	2,14	2,6
integrátoregység/pmol				8,33	8,04	7,60	7,70	6,73	6,21	5,98	5,49	0,65	0,63	0,60	0,60	0,54	0,54	0,51	0,48
Reakcióidő, perc→				1,5	3	7	25	38	74	110	1,5	3	7	25	38	74	110		
Agmatin1		8,21	339	1,52	3,59	8,38	18,00	23,03	35,92	44,47	2,34	2,03	5,22	13,29	17,07	27,84	35,04		
Agmatin2		9,38	334	98,47	93,70	89,01	71,48	69,61	56,05	46,42	89,90	88,01	84,00	75,01	64,92	52,36	44,28		
Agmatin3		12,06	334	0,02	2,70	2,56	10,11	6,95	6,80	7,62	7,76	9,92	10,69	11,08	17,3	18,4	18,8		
Agmatin4		14,55	343	0,00	0,01	0,05	0,42	0,46	1,23	1,48	0,00	0,04	0,09	0,62	0,71	1,40	1,88		
integrátoregység/pmol				4,67	4,63	4,65	5,11	5,23	5,16	4,98	0,30	0,31	0,30	0,31	0,32	0,31	0,29		
Reakcióidő, perc→				1,5	3	5	7	25	38	74	110	1,5	3	5	7	25	38	74	110
Tiramin1		10,57	339	6,99	8,13	11,66	14,42	24,82	30,39	39,54	45,66	4,20	6,81	9,93	12,1	21,55	26,36	34,84	40,43
Tiramin2		11,29	334	93,01	91,87	88,34	85,58	75,18	69,61	60,46	54,34	95,80	93,19	90,07	87,90	78,45	73,64	65,16	59,57
integrátoregység/pmol				7,13	7,31	7,31	7,31	7,62	7,67	7,77	7,68	0,48	0,49	0,49	0,44	0,45	0,45	0,44	0,44
Reakcióidő, perc→				1,5	7	27	42	62	82	122	1,5	7	27	42	62	82	122		
1,7-Diaminoheptán1		5,41	334	0,66	0,43	0,63	0,65	0,98	0,64	0,59	0,63	0,36	0,70	0,73	1,37	0,76	0,82		
1,7-Diaminoheptán2		12,41	334	0,38	0,34	0,38	0,38	0,34	0,39	0,43	0,35	0,27	0,40	0,30	0,23	0,57	0,17		
1,7-Diaminoheptán3		13,16	334	98,96	99,23	98,99	98,97	98,68	98,97	98,98	99,02	99,37	98,9	98,98	98,4	98,67	99,01		
integrátoregység/pmol				5,59	5,44	5,13	4,98	4,86	4,55	3,34	0,41	0,40	0,38	0,36	0,36	0,31	0,23		

Jelölések, mint az 1.–25. táblázatoknál.

Megjegyzés: E-1 és O-1 oszlopok, [OPA]/[amin]=30/1, 1=1·10⁻⁹ mol/10 μl. 30 °C, 1 ml/perc. Gradiens a hisztamin, agmatin, tiramin mérések: 0 perc: 100 % B-eluens; 5–10 perc: 50 % B-eluens + 50 % AcN; 10,1–18 perc: 100 % B-eluens. Gradiens a putreszcín, kadaverin, 1,7-diaminoheptán, spermidin, spermin mérések: 30 % B-eluens + 70 % AcN izokratikusan.

27. táblázat: A biogén aminok OPA/ET=1/10 molarányú {80 (V/V)% metanoltartalmú, pH=9,3} reagenssel képzett származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, ultraibolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálás alapján

Aminosav/amin↓ Detektálás→	Ret. idő ^g , perc↓	λ_{\max}^h , nm	Válaszjel ^l , %																							
			FI												UV											
Reakcióidő, perc →			1,5	3	7	16	32	64	91	175	364	átlag	RSD%	1,5	3	7	16	32	64	91	175	364	átlag	RSD%		
Hisztamin1	3,40	334	99,72	99,52	99,14	na ^j	98,78	na	97,75	97,60	98,34			99,98	99,77	99,91	na	99,36	na	99,07	98,26	98,23				
Hisztamin2	4,10	343	0,28	0,48	0,86	na	1,22	na	2,25	2,40	1,61			0,02	0,23	0,09	na	0,64	na	0,93	1,74	1,77				
integrátoregység/pmol			5,57	5,64	5,75	na	5,69	na	5,73	5,52	5,71	5,66	1,52	0,43	0,43	0,42	na	0,43	na	0,43	0,44	0,43	0,43	1,34		
Tiramin1	3,77	339	0,00	0,00	1,13	na	4,01	na	4,68	4,53	5,42			0,00	0,00	1,48	na	4,24	na	4,86	4,65	6,00				
Tiramin2	4,30	334	99,86	99,78	98,69	na	95,66	na	94,56	94,08	92,55			99,85	99,93	98,41	na	95,57	na	94,55	94,23	92,39				
Tiramin3	6,25	343	0,16	0,22	0,18	na	0,33	na	0,76	1,39	2,03			0,15	0,07	0,12	na	0,19	na	0,59	1,12	1,60				
integrátoregység/pmol			5,60	5,59	5,66	na	5,88	na	5,91	5,84	5,01	5,75	2,54	0,40	0,40	0,41	na	0,42	na	0,42	0,42	0,42	0,41	2,39		
Agmatin1	8,10	339	0,00	0,00	0,00	na	0,14	na	0,52	1,12	3,10			0,00	0,00	0,00	na	0,00	na	na	0,78	2,47				
Agmatin2	10,24	334	100	100	100	na	99,86	na	99,48	98,88	96,90			100	100	100	na	100	na	na	99,22	97,53				
integrátoregység/pmol			5,03	4,94	5,20	na	5,16	na	4,74	5,32	5,38	5,11	4,37	0,35	0,34	0,36	na	0,36	na	na	0,37	0,38	0,36	3,93		
Putreszcin1	9,15	339	0,90	0,89	0,99	1,34	1,66	2,44	na	na	na			0,84	0,92	0,90	0,90	1,08	1,65	na	na	na				
Putreszcin2	9,57	334	99,10	99,11	99,01	98,66	98,34	97,56	na	na	na			99,16	99,08	99,10	99,10	98,82	98,35	na	na	na				
integrátoregység/pmol			4,97	4,90	4,94	4,97	4,98	4,96	na	na	na	4,95	0,59	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	na	na	na	0,77	0,00		
Kadaverin1	9,45	339	0,10	0,16	0,55	0,57	1,34	2,78	na	na	na			0,00	0,00	0,02	0,39	2,66	2,66	na	na	na				
Kadaverin2	9,96	334	99,90	99,84	99,45	99,43	98,66	97,22	na	na	na			100	100	99,98	99,62	97,34	97,34	na	na	na				
integrátoregység/pmol			11,87	11,85	11,81	11,99	12,10	12,04	na	na	na	11,94	0,98	1,17	1,16	1,14	1,18	1,15	1,15	na	na	na	1,16	1,27		
1,7-Diaminoheptán1	10,13	339	0,07	0,11	0,21	0,39	0,73	1,47	na	na	na			0,11	0,07	0,17	0,37	1,35	1,35	na	na	na				
1,7-Diaminoheptán2	10,88	334	99,93	99,89	99,79	99,61	99,27	98,53	na	na	na			99,89	99,93	99,83	99,63	98,65	98,65	na	na	na				
integrátoregység/pmol			10,28	9,65	9,67	9,82	9,93	9,63	na	na	na	9,83	2,54	0,79	0,78	0,79	0,80	0,78	0,78	na	na	na	0,79	1,04		

Jelölések, mint 1.–26. táblázatoknál.

Megjegyzés: a *dölt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe. A hisztamin, a tiramin és az agmatin esetében E-2 és O-2 oszlopok, [OPA]/[amin]=67/1; 1=1·10⁻⁹ mol/10µl. Gradiens:50 °C, 1 ml/perc. 0 perc: 20 % A-eluens+80 % AcN; 10 perc: 15 % A-eluens+85 % AcN; 11–12 perc: 100 % AcN; 13–21 perc: 20 % A-eluens + 80 % AcN. Gradiens a putreszcin, kadaverin és 1,7-diaminoheptán: 30 % B-eluens + 70 % AcN izokratikusan.

28. táblázat: A spermidin, a putreszcin, a kadaverin, a spermin és a 1,7-diaminoheptán különböző mennyiségének egyidejű meghatározása OPA/ET-származékként, 20 (V/V)% metanoltartalmú reagenssel, fluoreszcens detektálás alapján

Amin↓	Ret. idő ^g , perc ↓	Integrátoregység/pmol ^o							
		Injektált mennyiség, pmol →	300	150	75	37,5	18,75	12,0	átlag
Spermidin	3,97–4,15	4,10	4,40	4,55	4,44	4,61	4,46	4,43	4,0
Putreszcin	4,23 – 4,43	3,89	4,27	4,38	4,31	5,49	5,23	4,60	13,5
Kadaverin	4,98 – 5,02	6,54	7,18	7,36	7,18	8,92	8,40	7,60	11,6
Spermin	5,88 – 5,90	0,37	0,27	0,29	0,23	0,24	0,20	0,27	22,3
1,7-Diaminoheptán	6,88 – 7,02	5,49	5,95	6,22	6,02	7,48	7,69	6,48	13,8

Jelölések, mint az 1.–27. táblázatoknál.

Megjegyzés: [OPA]/amin=45/1, $1=1,5 \cdot 10^{-9}$ mol/10 μ l. Mérési körülmények: O-1 és E-1 oszlopokon, 50 °C, 1,2 ml/min, 30 % B-eluens + 70 % acetonitril

29. táblázat: A putreszcín, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin különböző mennyiségének, egyidejű meghatározása OPA/ET/FMOC=1/10/0,13 molarányú, 20 (V/V)% metanoltartalmú reagens alkalmazásával, fluoreszcens (Fl) és ultrabolya (UV) detektálás alapján

Amin↓	Ret. idő ^g , perc ↓	Integrátoregység/pmol ^o							
		Injektált mennyiség, pmol →	300	150	75	37,5	18,75	12,0	átlag
Fl									
Putreszcín	6,00–6,06	4,55	4,62	4,67	4,77	4,52	4,70	4,64	2,0
Kadaverin	7,08 – 7,16	8,64	8,61	8,62	8,35	8,21	8,26	8,45	2,3
1,7-Diaminoheptán	10,30 – 10,36	7,91	8,12	8,28	8,13	7,95	7,97	8,06	1,8
Spermidin	10,83 – 10,91	7,15	6,90	7,00	6,06	5,70	5,56	7,02	1,8
Spermin	12,90 – 13,01	4,93	4,61	4,28	3,81	3,66	2,80	-	-
UV									
Putreszcín	6,00–6,06	0,69	0,70	0,70	0,66	0,72	0,68	0,69	3,0
Kadaverin	7,08 – 7,16	0,66	0,67	0,68	0,66	0,69	0,64	0,67	2,7
1,7-Diaminoheptán	10,30 – 10,36	0,63	0,62	0,61	0,61	0,60	0,60	0,61	1,9
Spermidin	10,83 – 10,91	0,56	0,50	0,54	0,53	0,52	0,52	0,53	3,9
Spermin	12,90 – 13,01	0,40	0,39	0,41	0,33	0,30	0,28	0,40	2,5

Jelölések, mint az 1.–28. táblázatoknál, valamint a *dőlt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe.

Megjegyzés: [OPA]/[ET]/[amin]=70/700/1; $1=1,5 \cdot 10^{-9}$ mol/10 μ l. Gradiens: 30 °C, 1,2 ml/perc, O-1 és E-1 oszlopokon; 0–7 perc: 30 % B-eluens+70 % acetonitril; 7,1–12 perc: 100 % acetonitril; 12,1–19 perc: 30 % B-eluens+70 % acetonitril.

30. táblázat: A spermidin és a spermin, OPA/ET/FMOC=1/10/0,4 molarányú, 80 (V/V) % metanoltartalmú, pH=9,30 reagenssel nyert származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, fluoreszcens (Fl) és ultraibolya (UV) detektálás alapján

Amin↓ Detektálás→	Ret. idő ^g , perc ↓	λ_{\max}^h , nm↓	Válaszjel ⁱ , %																	
			Fl									UV								
Reakcióidő, perc→			1+1	3+1	1+3	1+7	1+16	1+32	1+64	átlag	RSD %	1+1	3+1	1+3	1+7	1+16	1+32	1+64	átlag	RSD %
Spermidin1	11,34	262;334	99,25	99,23	99,10	98,28	98,77	98,36	98,61			99,39	99,37	99,19	98,41	99,01	99,12	99,29		
Spermidin 2	12,27	262;339	0,75	0,77	0,90	1,72	1,23	1,61	0,65			0,61	0,81	0,81	1,59	0,99	0,18	0,37		
integrátoregység/pmol			8,04	7,93	8,13	8,44	8,21	8,00	7,58	8,13	2,3	0,78	0,77	0,77	0,79	0,77	0,76	<i>0,71</i>	0,77	1,3
Spermin1	12,56	262;334	99,05	98,54	99,05	99,0	98,4	97,8	95,8			99,28	98,77	99,32	99,25	98,68	98,24	96,56		
Spermin 2	13,70	262;339	0,95	1,46	0,95	1,0	1,6	2,2	4,2			0,72	1,23	0,68	0,75	1,32	1,76	3,44		
integrátoregység/pmol			6,69	<i>5,61</i>	6,80	6,46	6,05	6,20	<i>5,24</i>	6,44	4,9	0,61	0,61	0,65	0,62	0,60	0,60	<i>0,51</i>	0,62	3,0

Jelölések, mint az 1.–29. táblázatoknál, valamint a *dőlt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe.

Megjegyzés: [OPA]/[amin]=70/1; $1=1 \cdot 10^{-9}$ mol/10 μ l. Gradiens: E-2 és O-2 oszlopokon, 50 °C, 1,8 ml/min; 0–4 perc: 60 % B-eluens+40 % metanol; 4,1 perc: 30 % B-eluens+70 % acetonitril; 9–12 perc: 100 % acetonitril; 12,1–18 perc: 60 % B-eluens+40 % metanol;

31. táblázat: A spermidin és a spermin, az OPA/ET/FMOC=1/10/0,5 molarányú reagenssel képzett származékainak abszorbancia-értékei 262 nm-en ($A_{262\text{ nm}}$)és 334 nm-en ($A_{334\text{ nm}}$), a metanoltartalom {MeOH (V/V) %} függvényében

MeOH (V/V) %↓	Spermidin			Spermin		
	$A_{262\text{ nm}}$	$A_{334\text{ nm}}$	$A_{262\text{ nm}}/A_{334\text{ nm}}$	$A_{262\text{ nm}}$	$A_{334\text{ nm}}$	$A_{262\text{ nm}}/A_{334\text{ nm}}$
38	519	251	2,06	672	207	3,25
56	570	275	2,07	782	241	3,25
66	564	275	2,05	758	244	3,11
70	664	317	2,09	920	289	3,18
75	554	266	2,08	789	244	3,23
80	637	305	2,09	971	299	3,25

Megjegyzés:[OPA]/[amin]=64/1; $1 \cdot 10^{-9}$ mol/10 μ l.

32. táblázat: Az ornitin (Orn) „vegyes” OPA/ET/FMOC-származékának fragmentációs lehetőségei: Orn5={ [OPA][ET][FMOC][Orn]-H₂O }[†]=m/z=497,5

A hasadás helye [†] ↓	az Orn5=m/z=497,5 lehetséges fragmensei	
	α-aminocsoport	δ-aminocsoport
C1 (45) és C2 (87) között	FMOC m/z=267,2	OPA/ET m/z=247,2-H ₂ O=229,2
	OPA/ET m/z=205,2	FMOC m/z=309,2
C2 (74) és C3 (58) között	FMOC m/z=296,2	OPA/ET m/z=218,2
	OPA/ET m/z=234,2	FMOC m/z=280,2
C3 (88) és C4 (44) között	FMOC m/z=310,2	OPA/ET m/z=204,2
	OPA/ET m/z=248,2	FMOC m/z=266,2
C4 (102) és C5 (30)	FMOC m/z=324,2	OPA/ET m/z=190,2
	OPA/ET m/z=262,2	FMOC m/z=252,2

Jelölések: [†]=a zárójelben levő értékek a kiindulási fragmensek m/z értékei.

33. táblázat: Az ornitin, a lizin, a putreszcín, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin eltérő mennyiségeinek, az OPA/ET/FMOC=1/10/0,4 mólarányú {80 (V/V) % metanoltartalmú, pH=9,30} reagenssel képzett származékainak egyidejű meghatározása, ultrabolya (UV) és fluoreszcens (FI) detektálás alapján

Aminosav/amin↓	Ret. idő ^g , perc ↓	Integrátoregység/pmól ^o									
Injektált mennyiség, pmol→		440	220	110	55	27,5	13,75	6,87	3,43	átlag	RSD%
FI											
Ornitin	3,47 – 3,66	2,75	2,78	2,85	3,07	3,62	-	-	-	2,79	1,8
Lizin	3,86 – 4,12	5,51	5,38	5,18	4,83	4,14	3,73	2,87	1,87	-	-
Putreszcín	9,75 – 9,79	5,21	5,18	5,12	5,04	4,97	4,99	4,00	3,65	5,09	2,0
Kadaverin	10,15 – 10,18	10,33	10,37	10,34	10,44	10,45	10,17	9,22	10,07	10,35	1,0
1,7-Diaminoheptán	11,05 – 11,08	11,26	11,41	11,52	11,69	11,50	11,27	10,25	9,83	11,44	1,4
Spermidin	11,32 – 11,37	7,34	6,94	7,38	7,23	7,37	7,08	7,16	7,07	7,20	2,2
Spermin	12,54 – 12,60	5,17	4,97	5,21	4,98	4,67	5,34	4,69	4,98	5,00	4,8
UV											
Ornitin	3,36 – 3,72	0,58	0,52	0,45	0,35	0,25	0,21	0,32	0,20	-	-
Lizin	3,85 – 4,12	0,58	0,53	0,44	0,41	0,41	0,40	0,40	0,22	-	-
Putreszcín	9,75 – 9,78	0,82	0,81	0,81	0,81	0,80	0,80	0,73	0,66	0,81	0,93
Kadaverin	10,15 – 10,17	0,82	0,82	0,82	0,83	0,82	0,82	0,75	0,67	0,82	0,50
1,7-Diaminoheptán	11,05 – 11,07	0,84	0,84	0,85	0,86	0,83	0,84	0,82	0,73	0,84	1,2
Spermidin	11,31 – 11,36	0,63	0,62	0,65	0,64	0,62	0,60	0,60	0,64	0,63	2,9
Spermin	12,53 – 12,60	0,45	0,44	0,48	0,46	0,46	0,44	0,40	0,41	0,44	6,0

Jelölések, mint az 1.–32. táblázatoknál, valamint a *dőlt betűvel* szedett értékeket az átlagszámításnál nem vettük figyelembe.

Megjegyzés: a mérési körülményeket lásd a 30. táblázatnál.

34. táblázat: Biológia szövetek ornitin-, lizin-, putreszcin-, kadaverin-, spermidin- és spermintartalmának meghatározása (belső standard: 1,7-diaminoheptán), OPA/ET/FMOC-származékokként, fluoreszcenciás detektálás alapján

Minta		Putreszcin (M _r =88,15)				Ornitin (M _r =132,16)				Lizin (M _r =146,19)				Spermidin (M _r =145,2)				Spermin (M _r =202,19)				1,7-Diaminoheptán (M _r =130,23)			
Neve ↓	Tömege, g ↓	Mért	Mintában összesen			Mintában összesen				Mintában összesen				Mért	Mintában összesen			Mért	Mintában összesen						
		pmol/10 μl	(·10 ⁻⁹) mol	(·10 ⁻⁷) g	(·10 ⁻⁴) %&	(·10 ⁻⁹) mol	RSD %	(·10 ⁻⁷) g	(·10 ⁻³) %	(·10 ⁻⁹) mol	RSD %	(·10 ⁻⁷) g	(·10 ⁻³) %	pmol/10 μl	(·10 ⁻⁸) mol	RSD %	(·10 ⁻⁶) g	(·10 ⁻³) %	pmol/10 μl	(·10 ⁻⁷) mol	RSD %				
AF/1	0,0273					3,32				1,32				14,1	0,50				18,6	0,67			697	2,51	
AF/2						3,14				1,50				15,8	0,57				21,7	0,74			727	2,62	
AF/3 ^u		12,7	2,5	2,2	8,1	2,62				1,22													1389/2	2,50	
AF (átlag)					3,03	12,0	4,0	1,5	1,35	10,5	2,0	7,2	15,0	0,54	9,25	0,78	2,8		0,71	7,02	1,43	5,3		2,54	2,62
DF1/1	0,0262					3,60				2,15				43,0	1,55				63,0	2,27			877	3,16	
DF1/2						-				-				41,9	1,51				53,3	1,92			864	3,11	
DF1/3 ^u		27,9	5,4	4,8	18,2	3,11				1,90				93,2	1,68				100,6/2	1,81			1776,2	3,20	
DF1 (átlag)					3,36	10,3	4,4	1,7	2,03	8,7	3,0	1,1		1,58	5,63	2,29	8,8		2,00	12,0	4,04	15,4		3,16	1,43
DF2a/1	0,0255					2,83				3,04				63,9	2,30				127,8	4,60			894	3,22	
DF2a/2						2,76				3,12				57,5	2,07				98,0	3,53			881	3,17	
DF2a/3 ^u		3,90	0,76	0,67	2,6	2,49				2,60				105/2	1,89				160/2	2,87			792	2,85	
DF2a (átlag)					2,69	6,7	3,6	1,4	2,92	9,6	4,3	1,7		2,07	9,85	3,00	11,8		3,67	23,8	7,42	22,9		3,08	6,52
DF2b/1	0,0324					3,31				3,93				71,9	2,59				86,3	3,11			716	2,58	
DF2b/2						2,86				3,98				71,3	2,57				76,7	2,76			703	2,53	
DF2b/3 ^u		3,92	0,76	0,67	2,1	3,34				3,41				116/2	2,09				143,8/2	2,59			1378/2	2,48	
DF2b (átlag)					3,17	8,5	4,2	1,3	3,77	8,4	5,5	1,7		2,42	11,71	3,51	10,8		2,82	9,4	5,70	23,7		2,53	1,98
AL/1	0,0229					5,10				2,98				102,0	3,67				146,7	5,28			1007	3,62	
AL/2						4,21				2,64				105,0	3,78				156,6	5,63			1014	3,65	
AL/3 ^u		45,7	8,9	7,8	34,2	4,23				2,38				173/2	3,37				268/2	5,22			1815/2	3,54	
AL (átlag)					4,51	11,3	6,0	2,6	2,67	11,3	3,9	1,7		3,61	5,88	5,24	22,9		5,38	4,12	10,9	47,5		3,60	1,58
JAB/1	0,0276					6,36				5,54				43,8	1,58				179,4	0,64			792	2,85	
JAB/2						6,51				5,52				44,6	1,60				217,2	0,78			864	3,11	
JAB/3		87,5	17,0	15,0	54,5	6,85				4,83				85,6/2	1,67				517/2	(1,01)			1894/2	3,41	
JAB (átlag)					6,57	3,8	8,7	3,1	5,30	7,6	7,7	2,8		1,62	2,92	2,35	8,5		0,71	23,1	1,43	5,2		3,12	8,97
No tis/1	0,0051																						1941	6,99	
No tis/2																							1928	6,94	
No tis (átlag)																							1935	6,97	0,36

Jelölések: AF/1–AF/3, stb.=párhuzamos mérések; AF (átlag)=AF/1–AF/3 mérések átlaga; %&=(g/g)%, a minta tömegére vonatkoztatva.

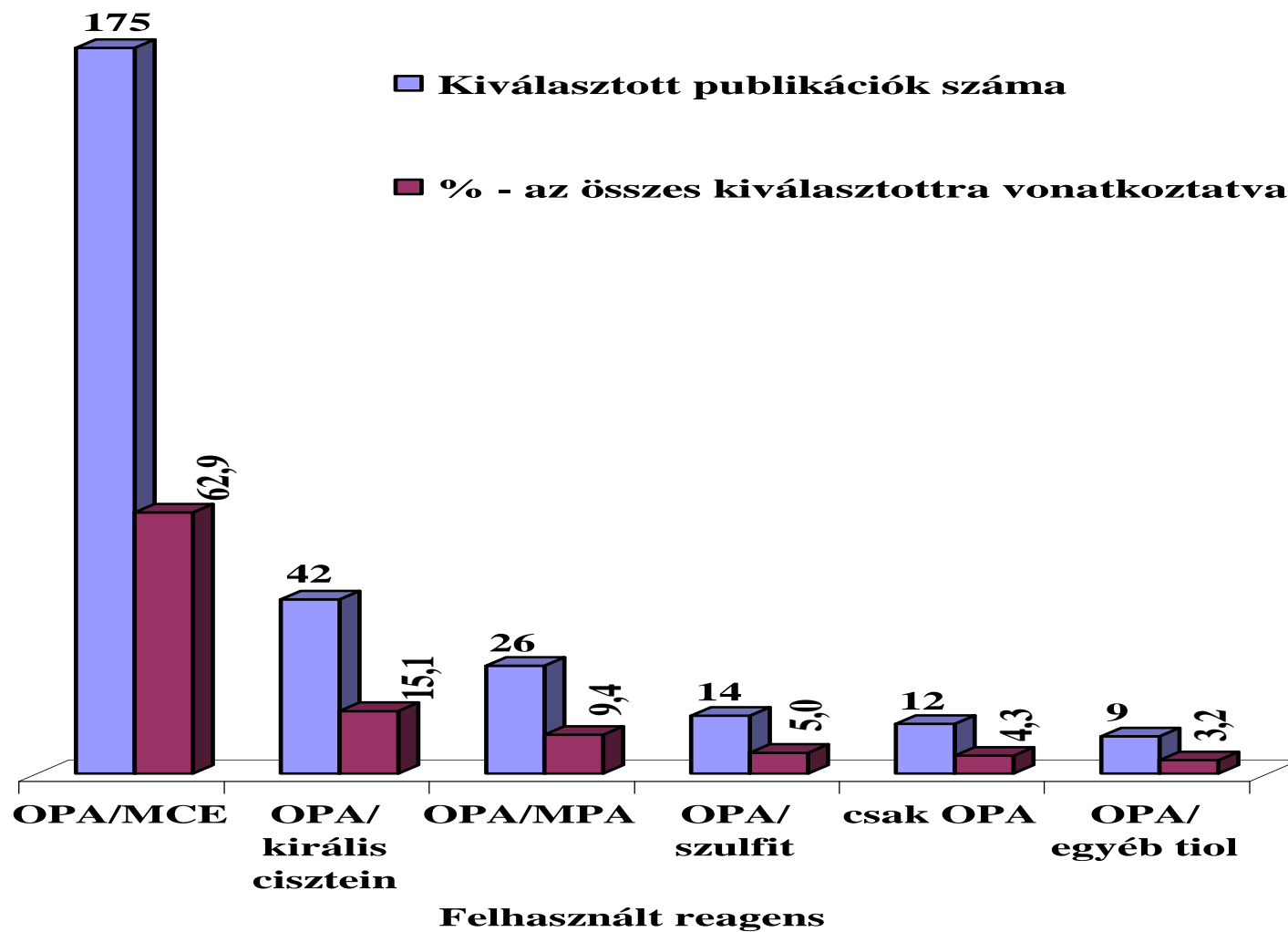
Megjegyzés: OPA/ET/FMOC=1/10/0,7; 1=6,5·10⁻⁷mol/10μl. Mérési körülmények, mint a 29. táblázatnál. A mintákat, minden esetben 150 μl desztillált vízben + 150 μl 1 mol/dm³-es KOH-oldatban oldottuk, a DF2b-t kivéve, amelynél 200 μl 1 mol/dm³-es KOH-oldat kellett a semlegesítéséhez. A 300 μl törzsoldatból 20 μl-t (az ^u-val jelölt esetekben 40 μl-t) reagáltattunk 200 μl OPA/ET=1/10 reagenssel 1 percig, majd 20 μl FMOC-cal is reagáltattuk, további 1 percig. Az elegyekből minden esetben 10 μl-t injektáltunk. Az értékeket az átlagos kalibráló integrátoregység/pmol értékek alapján számítottuk. A mintákban kadaverint nem találtunk.

35. táblázat: Az aszparagin, a glutamin és a metionin OPA/ET-származékainak válaszelei az elválasztás hőfokának és az eluensek pH-értékének függvényében, fluoreszcenciás detektálás alapján

Aminosav →		Aszparagin	Glutamin	Metionin
Elválasztás hőfoka, °C↓	Eluensek pH-értéke↓	Integrátoregység/pmol		
30	7,2	2,90	3,33	2,98
	9,2	3,08	4,45	3,21
50	7,2	2,28	2,41	3,05
	9,2	2,65	2,44	3,37

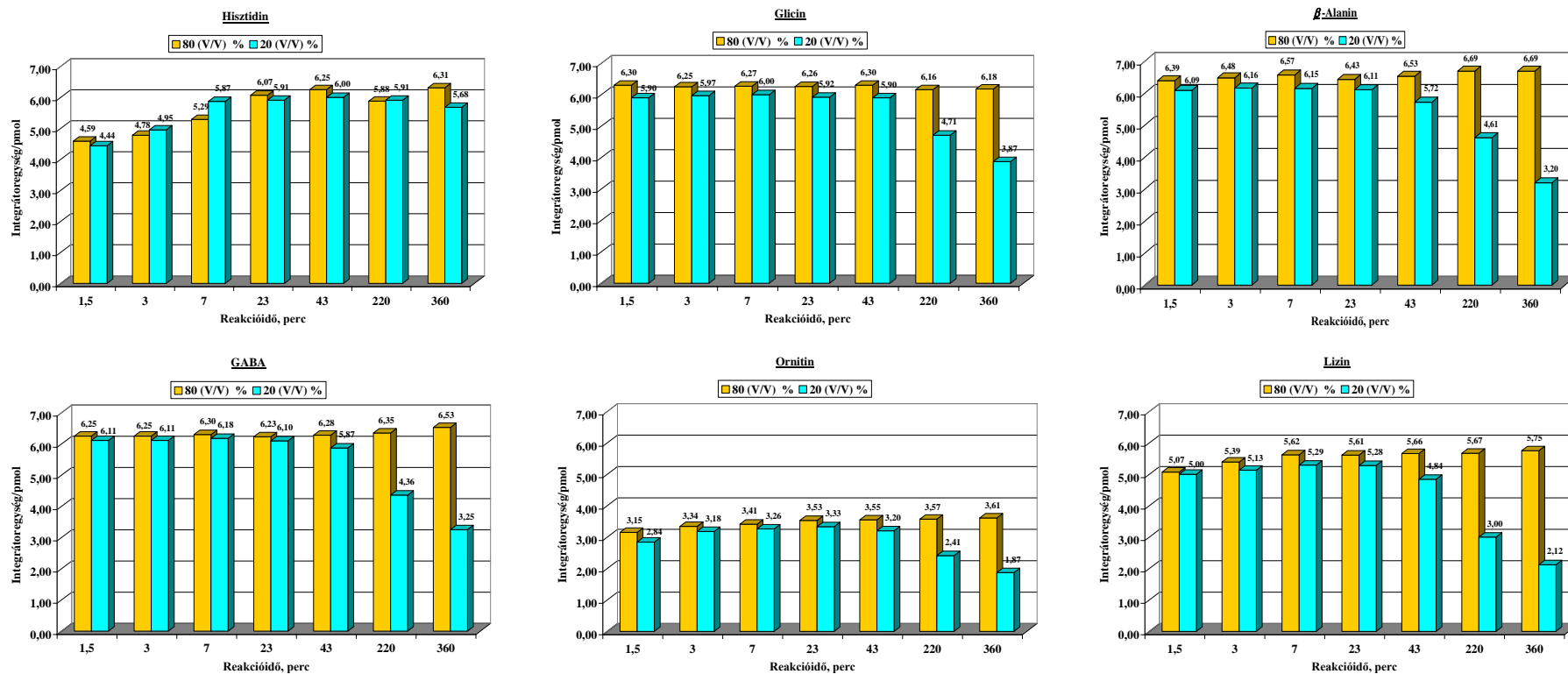
10. Ábrák jegyzéke

7. ábra: OPA-származékként készült nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias elválasztások: a 2000-2005 időszakban megjelent, választott közlemények alapján, az OPA reagens SH csoportú segédanyagai szerinti csoportosításban



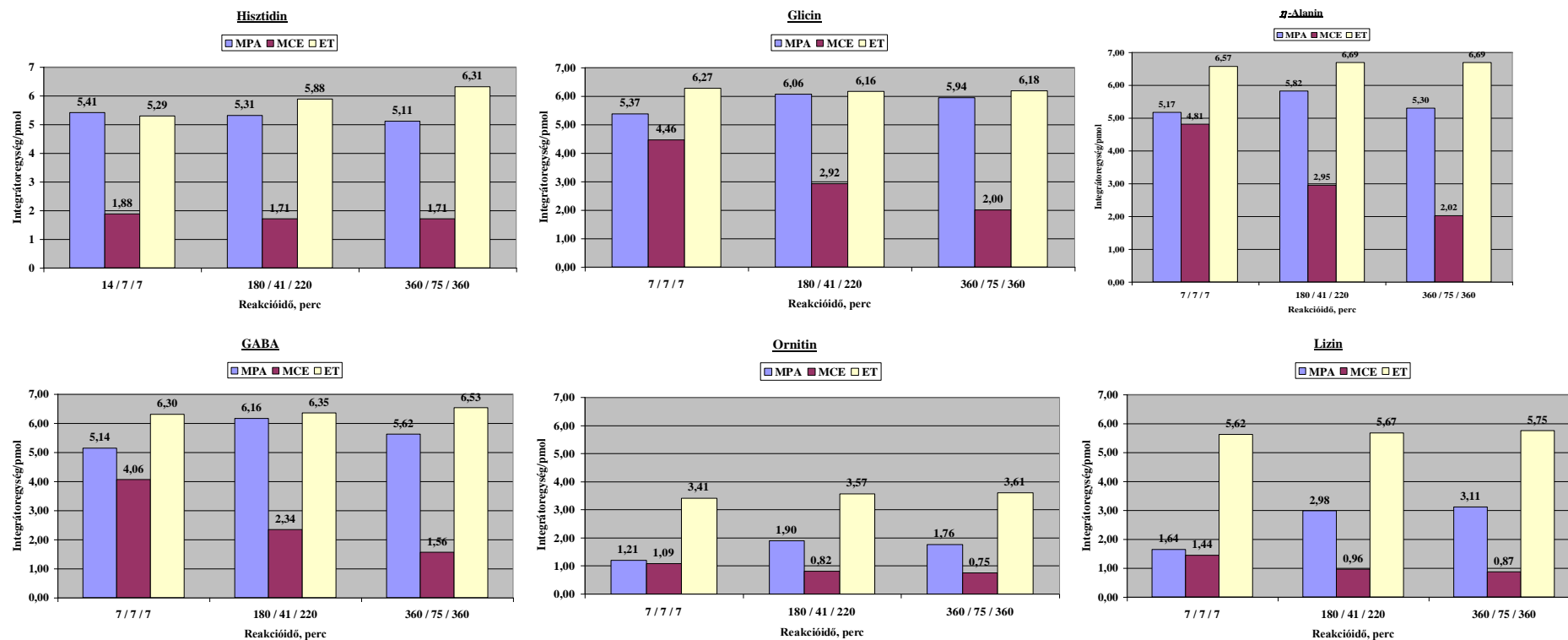
Jelölések: OPA=*o*-ftálaldehid; MCE=2-merkaptoetanol; MPA=3-merkaptopropionsav;

8. ábra: Az egynél több OPA/ET-származékot adó aminosavak fluoreszcenciás válaszjeleinek összehasonlítása a reagens metanoltartalmának {(V/V)%} és a reakcióidő függvényében



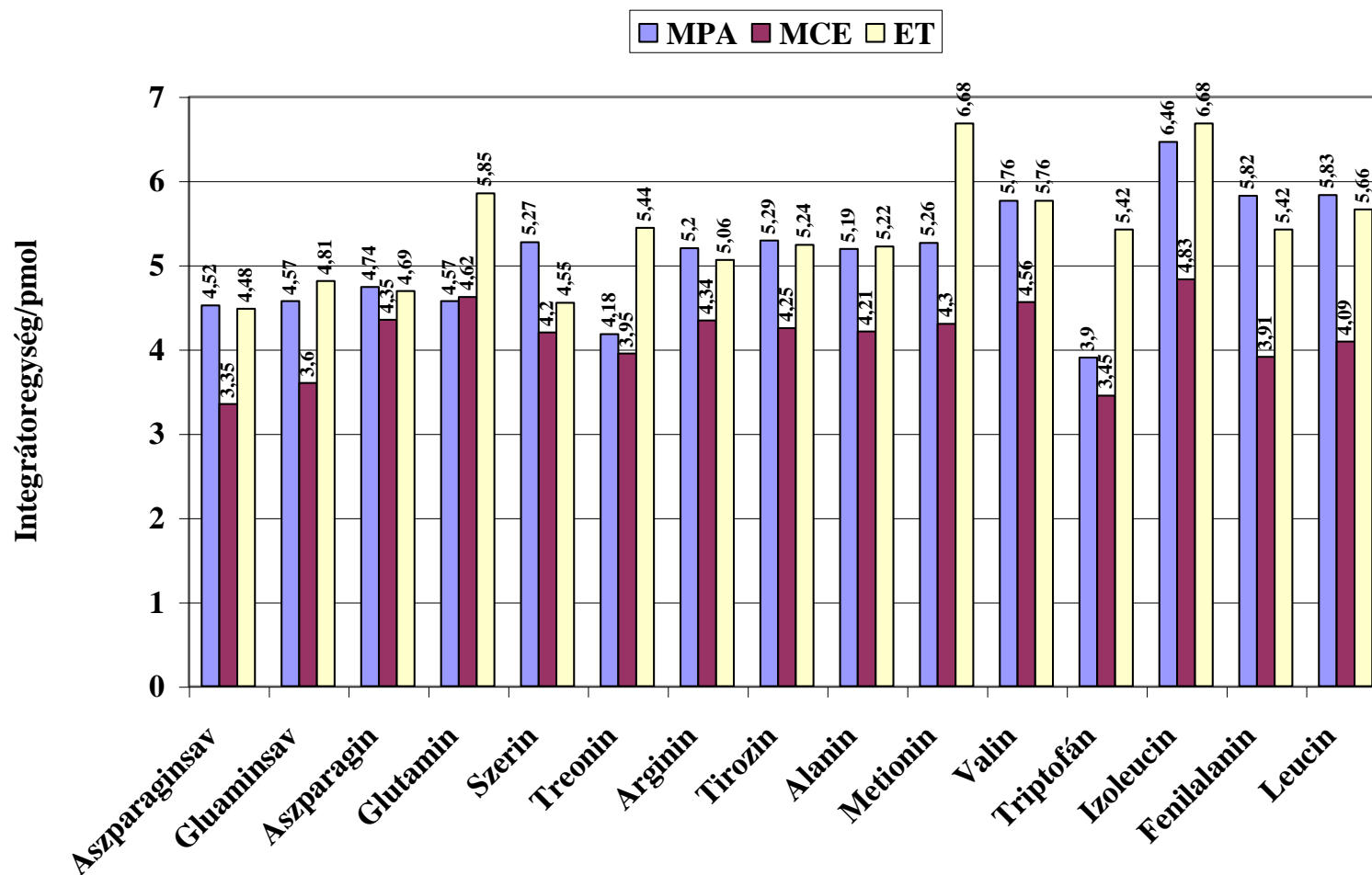
Megjegyzés: részletes adatok a 15. táblázatban

9. ábra: Az egynél több OPA-származékot szolgáltató aminosavak fluoreszcenciás válaszjeleinek összehasonlítása, az SH-csoportú segédanyag milyensége és a reakcióidő függvényében



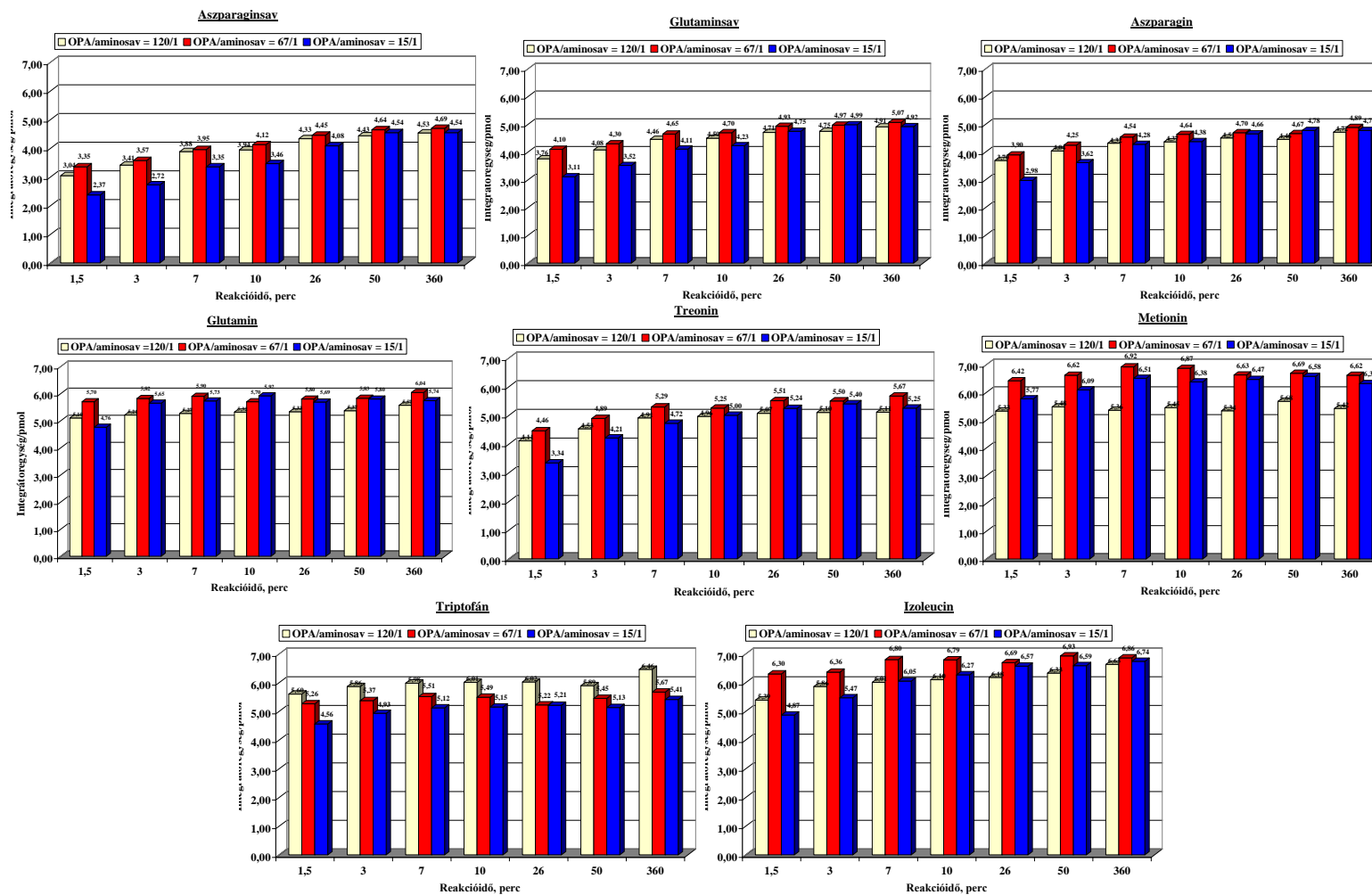
Jelölések: MPA=3-merkaptopropionsav {20 (V/V) % metanoltartalom}; MCE=2-merkptoetanol {20 (V/V) % metanoltartalom}; ET=etántiol {80 (V/V) % metanoltartalom}; Megjegyzés: az integrátoregység/pmol adatok rendre a [297]-ből, a 14. és 15. táblázatból véve

10. ábra: Az egyetlen OPA-származékot adó aminosavak fluoreszcenciás válaszjeleinek összehasonlítása, az SH-csoportú segédanyag milyensége függvényében



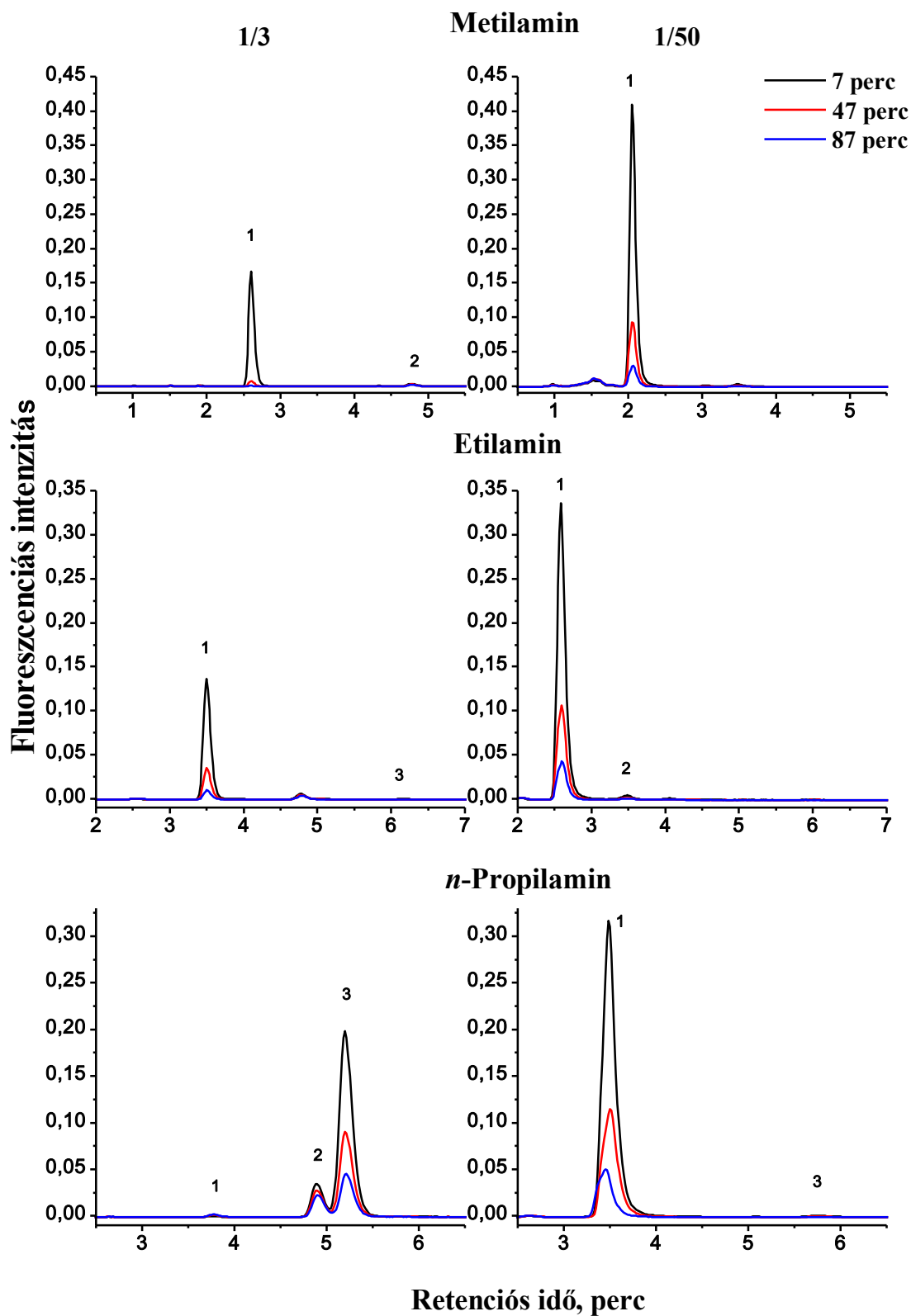
Jelölések, mint . Megjegyzés: az integráregység/pmol adatok rendre a [297]-ből {[OPA]/[aminosav]=20/1}, a 16. táblázatból {[OPA]/[aminosav]=20/1} és a 17. táblázatból {[OPA]/[aminosav]=67/1} véve

11. ábra: Az egyetlen OPA/ET-származékot adó aminosavak fluoreszcenciás válaszjeleinek összehasonlítása, az OPA/aminosav mólarány és a reakcióidő függvényében



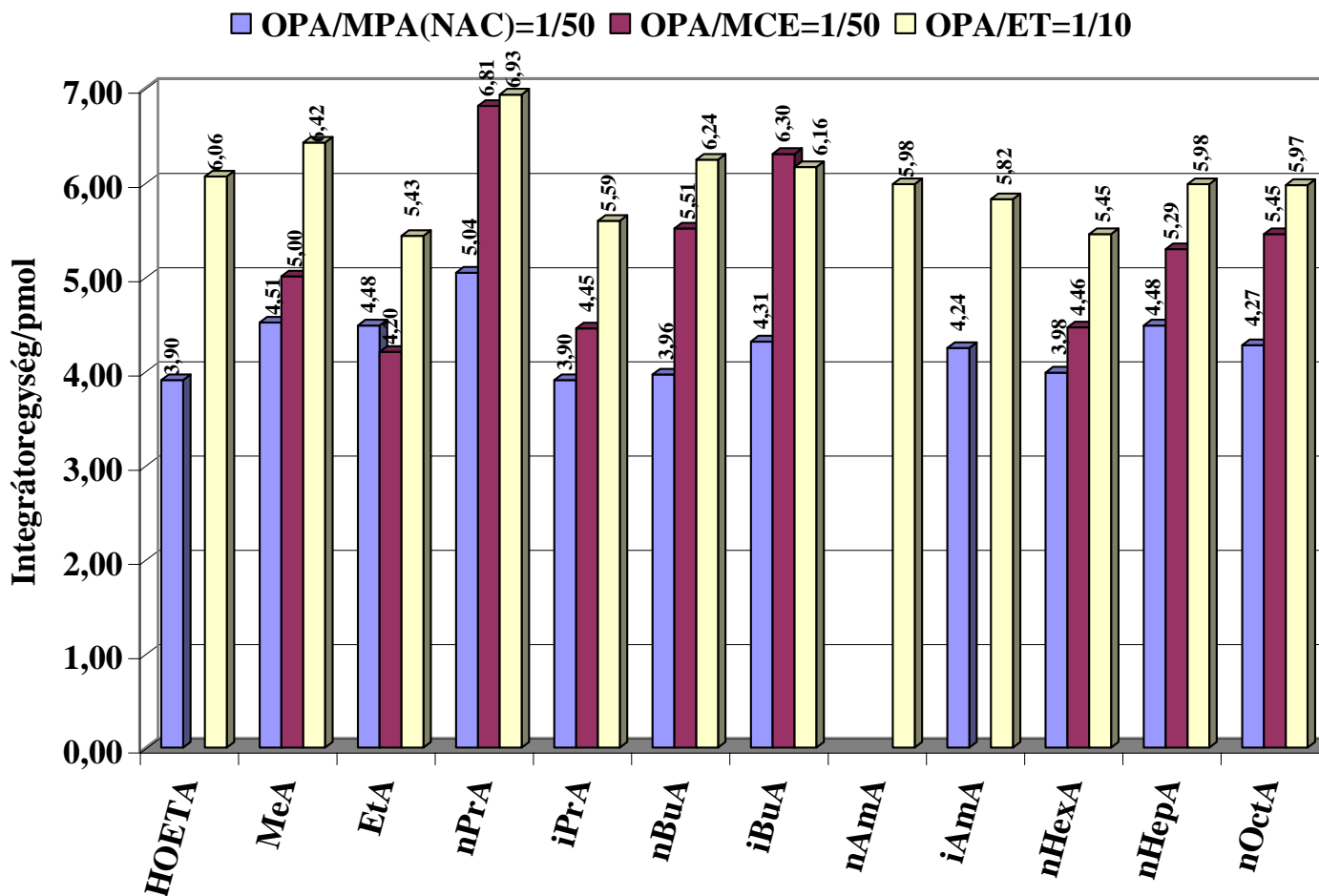
Megjegyzés: az adatok a 17. táblázatból véve.

12. ábra: A metil-, etil- és *n*-propilamin OPA/MCE-származékai fluoreszcenciás intenzitásának változása a kölcsönhatás és a reagens összetételének (OPA/MCE=1/3 és 1/50) függvényében



Megjegyzés: a részletes adatokat lásd a 19. táblázatban.

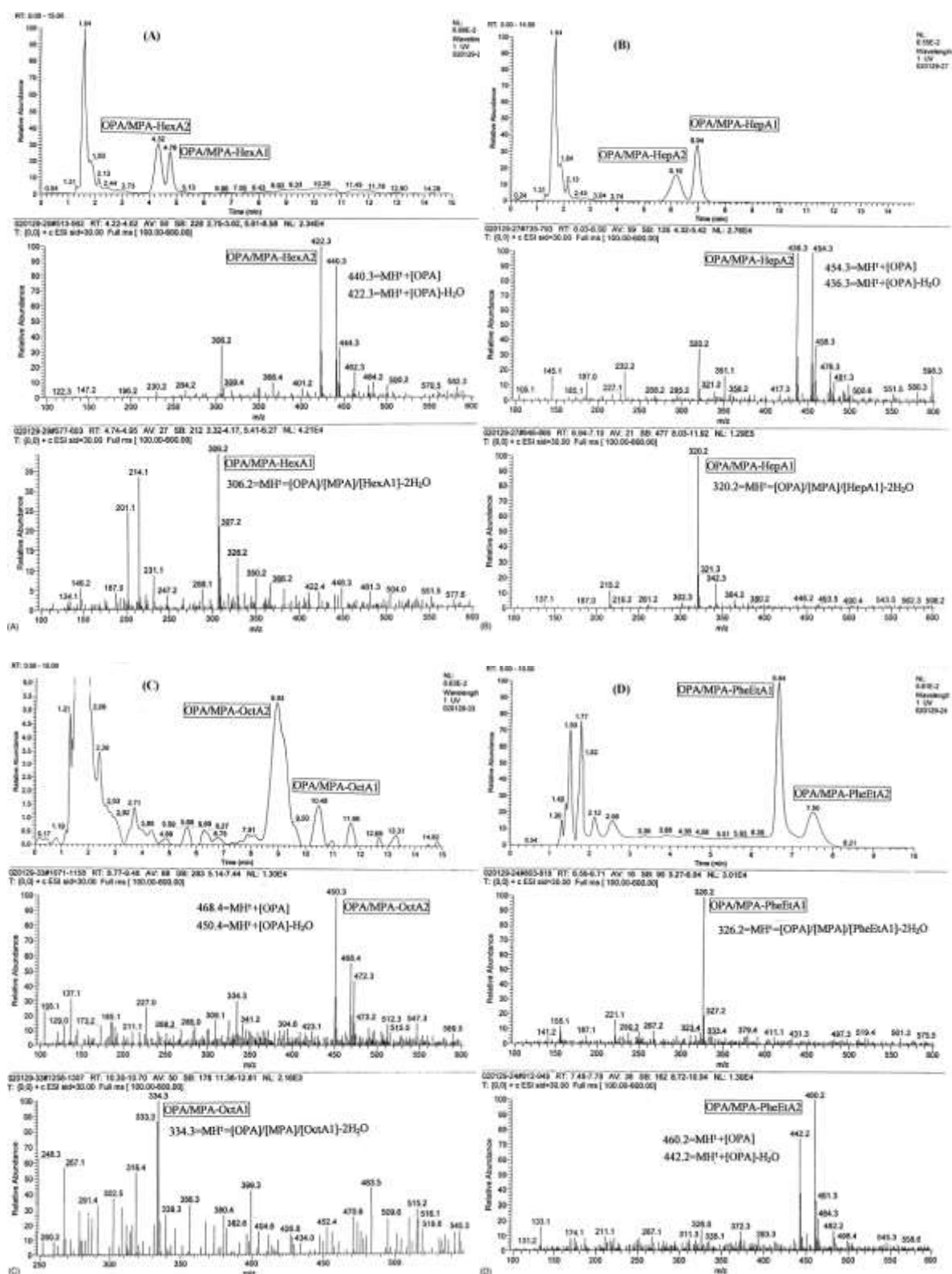
13. ábra: Az alifás monoaminok OPA-származékai fluoreszcenciás válaszeleinek összehasonlítása, az SH-csoportú segédanyag milyensége függvényében



Jelölések: mint az 1.–12. ábránál, valamint NAC=N-acetil-L-cisztein, HOEtA=etanolamin; MeA=metilamin; EtA=etilamin; nPrA=*n*-propilamin; iPrA=*i*-propilamin; nBuA=*n*-butilamin; iBuA=*i*-butilamin; nAmA=*n*-amilamin; iAmA=*i*-amilamin; nHexA=*n*-hexilamin; nHepA=*n*-heptilamin; nOctA=*n*-oktilamin.

Megjegyzés: az integrátoregység/pmol adatok rendre a [298]-ból, a 19. és 20. táblázatból véve.

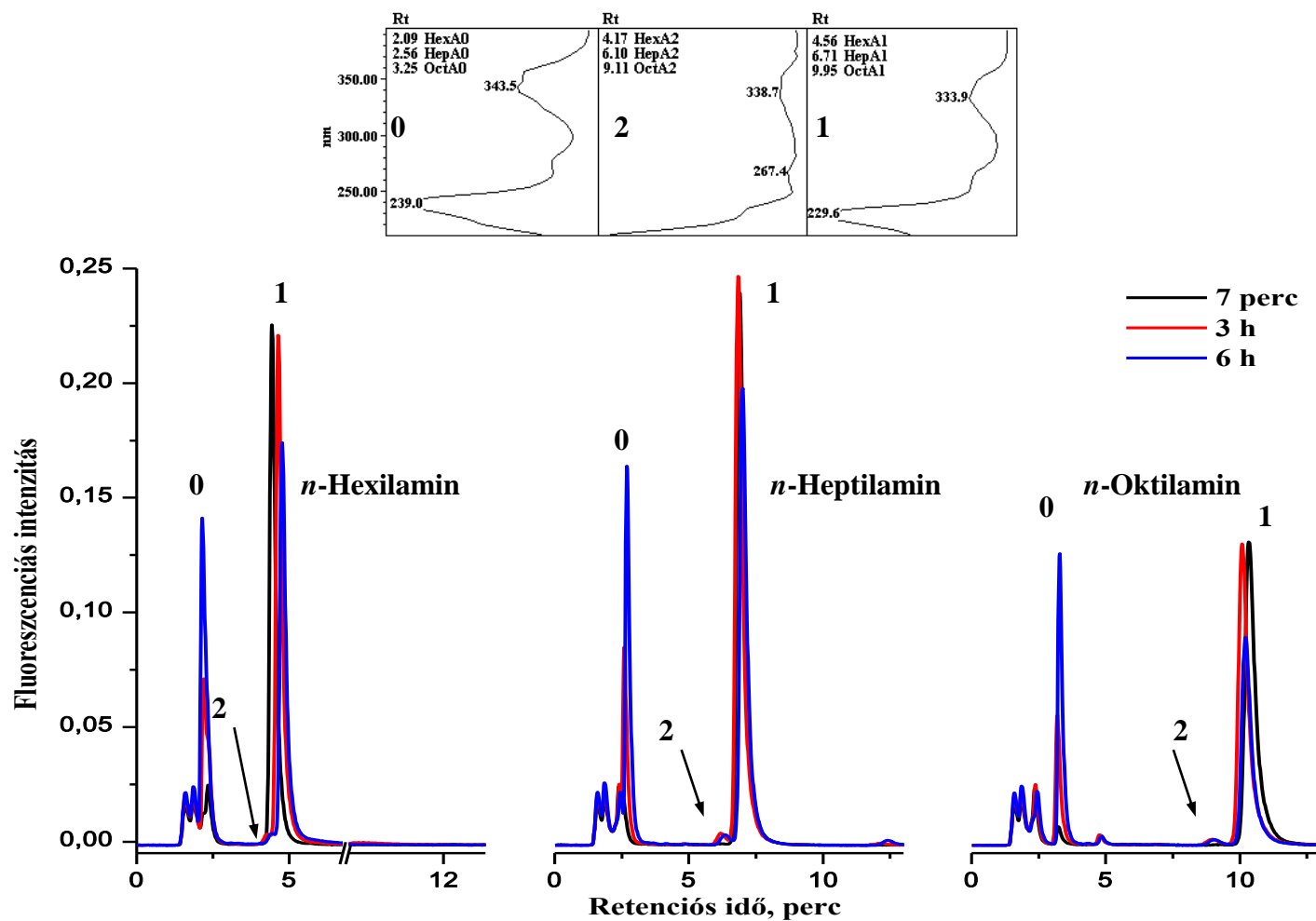
14. ábra (A)–(D): A *n*-hexil-, *n*-heptil- és *n*-oktil- és β -feniletilamin, az OPA/MPA=1/50 mólarányú reagenssel képzett származékainak (1–2) UV kromatogramja és tömegspektruma



Jelölések, mint a 7.–14. ábránál.

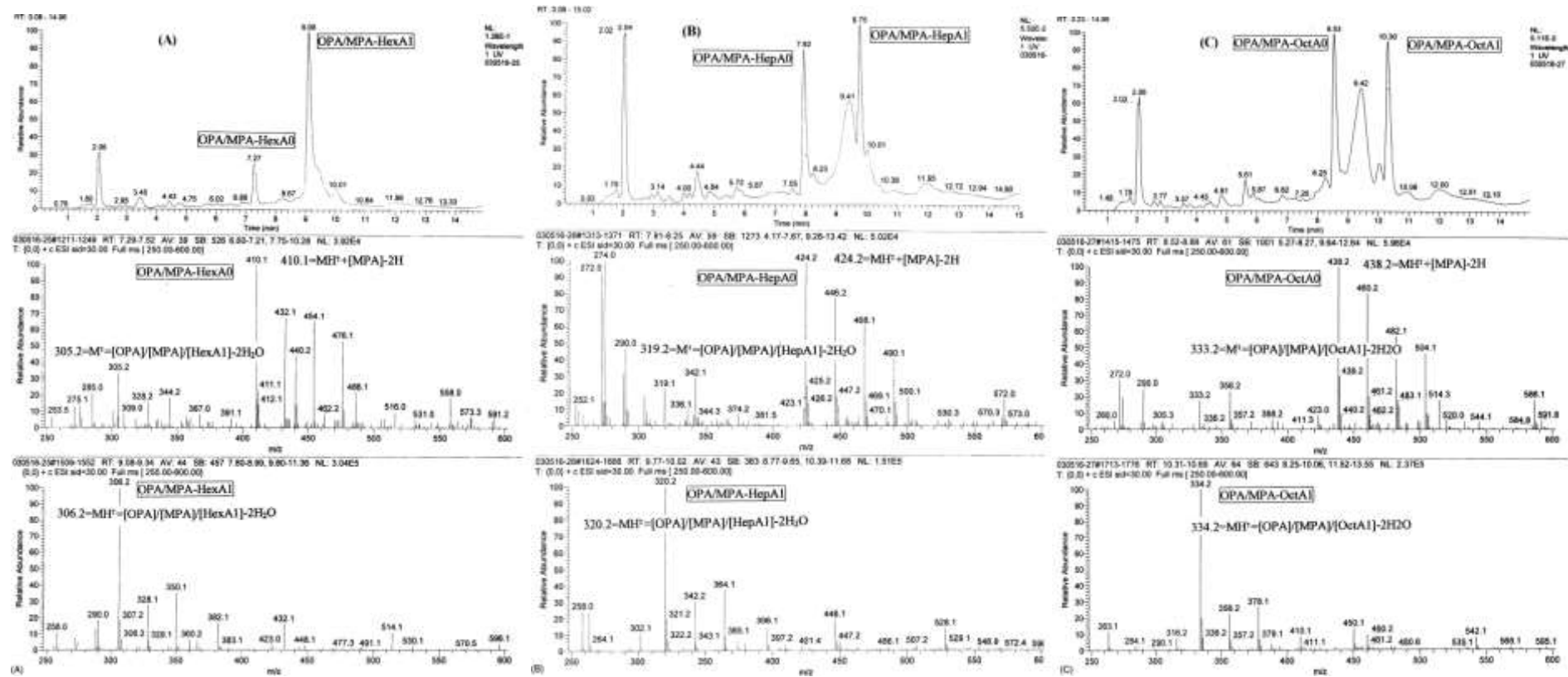
Megjegyzés: az (A–D) ábrák első sorában az UV-kromatogramok; második sorában az 1-es számmal jelölt (klasszikus izoindol) tömegspektruma; harmadik sorában a 2-es számmal jelölt (még egy OPA-molekula felvételével továbbalakult) termék tömegspektruma látható.

15. ábra: A *n*-hexil-, *n*-heptil- és *n*-oktilamin, az OPA/MPA=1/50 molarányú reagenssel képzett származékainak (0–2) fluoreszcenciás kromatogramja és a termékek UV-spektruma



Jelölések: HexA=*n*-hexilamin; HepA=*n*-Heptilamin; OctA=*n*-oktilamin
 Megjegyzés: a részletes adatokat lásd a 21.–23. táblázatban.

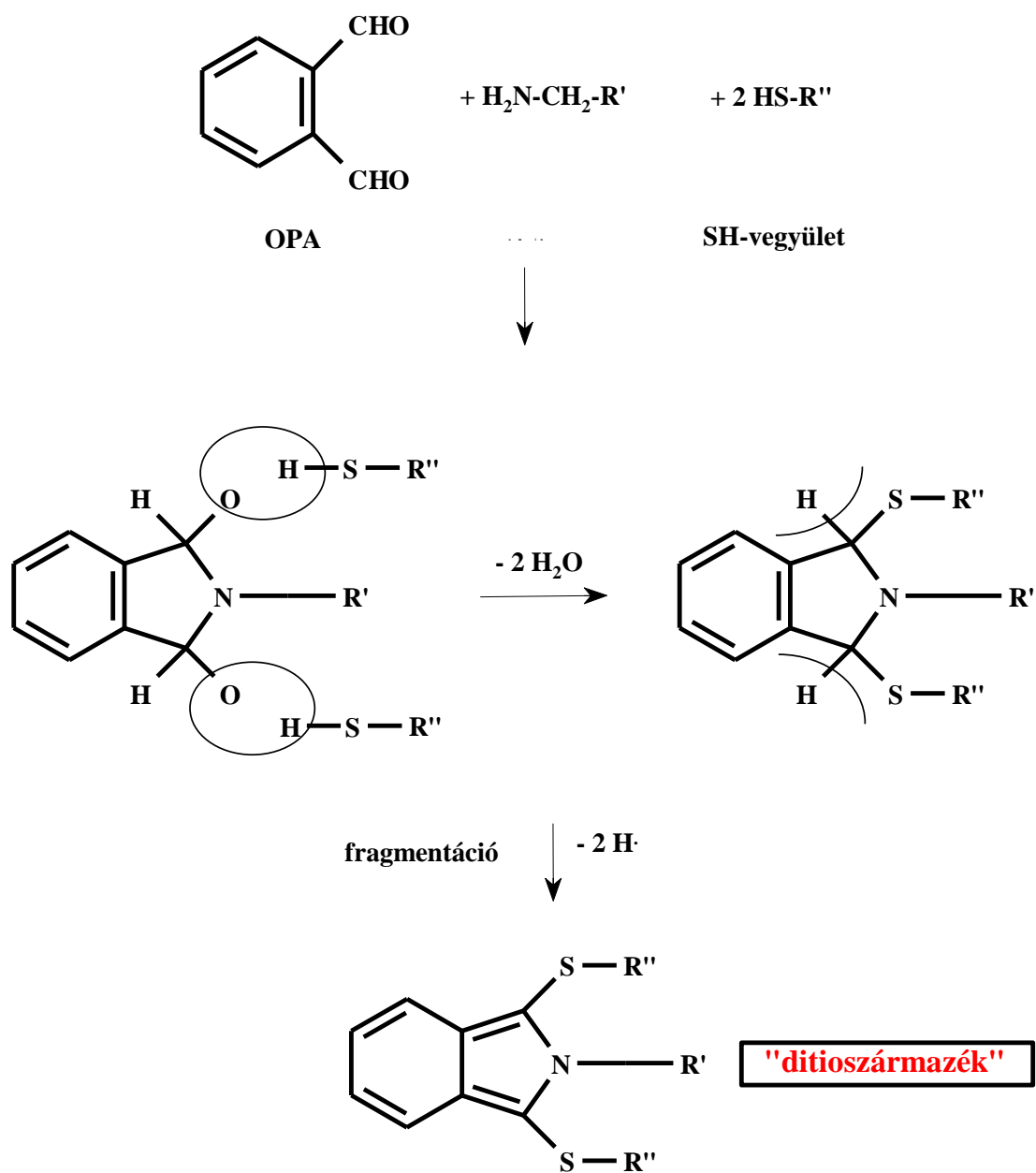
16. ábra (A–C): A *n*-hexil-, *n*-heptil- és *n*-oktilamin, az OPA/MPA=1/50 molarányú reagenssel képzett származékainak (0–1) UV kromatogramja és tömegspektruma



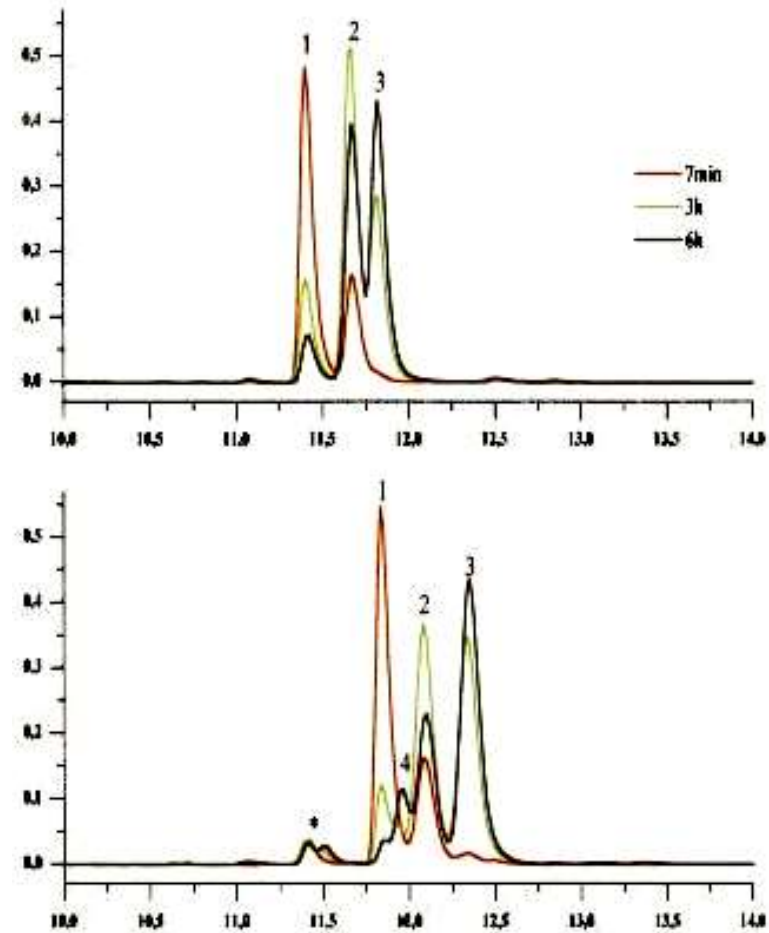
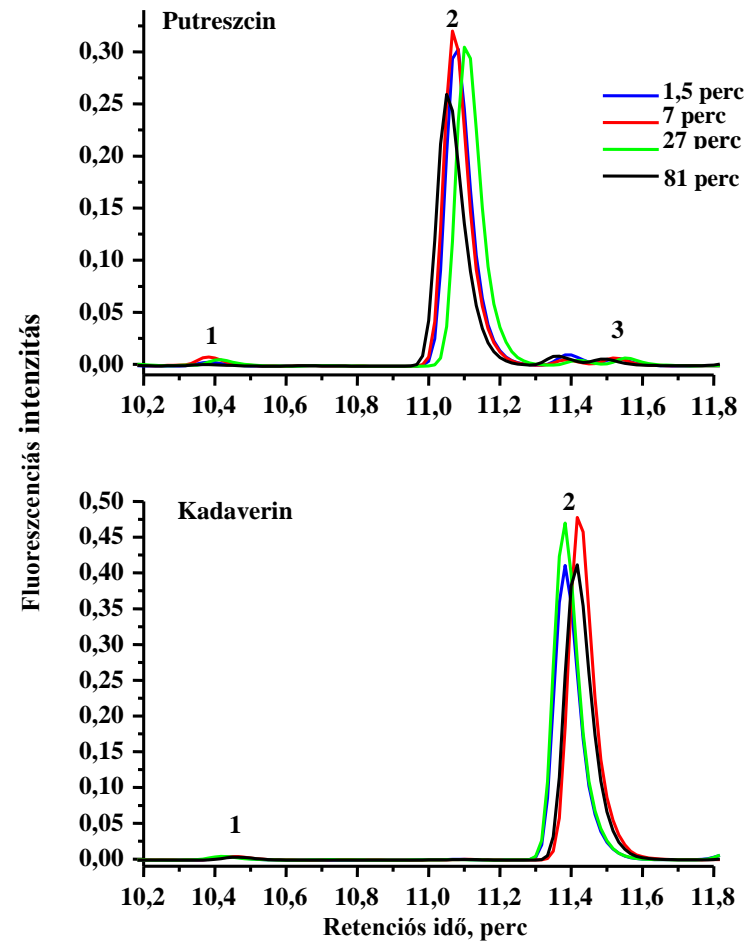
Jelölések, mint a 7.–15. táblázatoknál, valamint MPA=3-merkaptopropionsav.

Megjegyzés: az (A–C) ábrák első sorában az UV-kromatogramok; második sorában az 0-val jelölt (ditioszármazék) tömegspektruma; harmadik sorában az 1-es számmal jelölt (klasszikus izoindol) tömegspektruma látható.

17. ábra: Primer aminocsoportú vegyületek reakciója az OPA/RSH=1/50 molarányú reagenssel, a ditioszármazék keletkezése

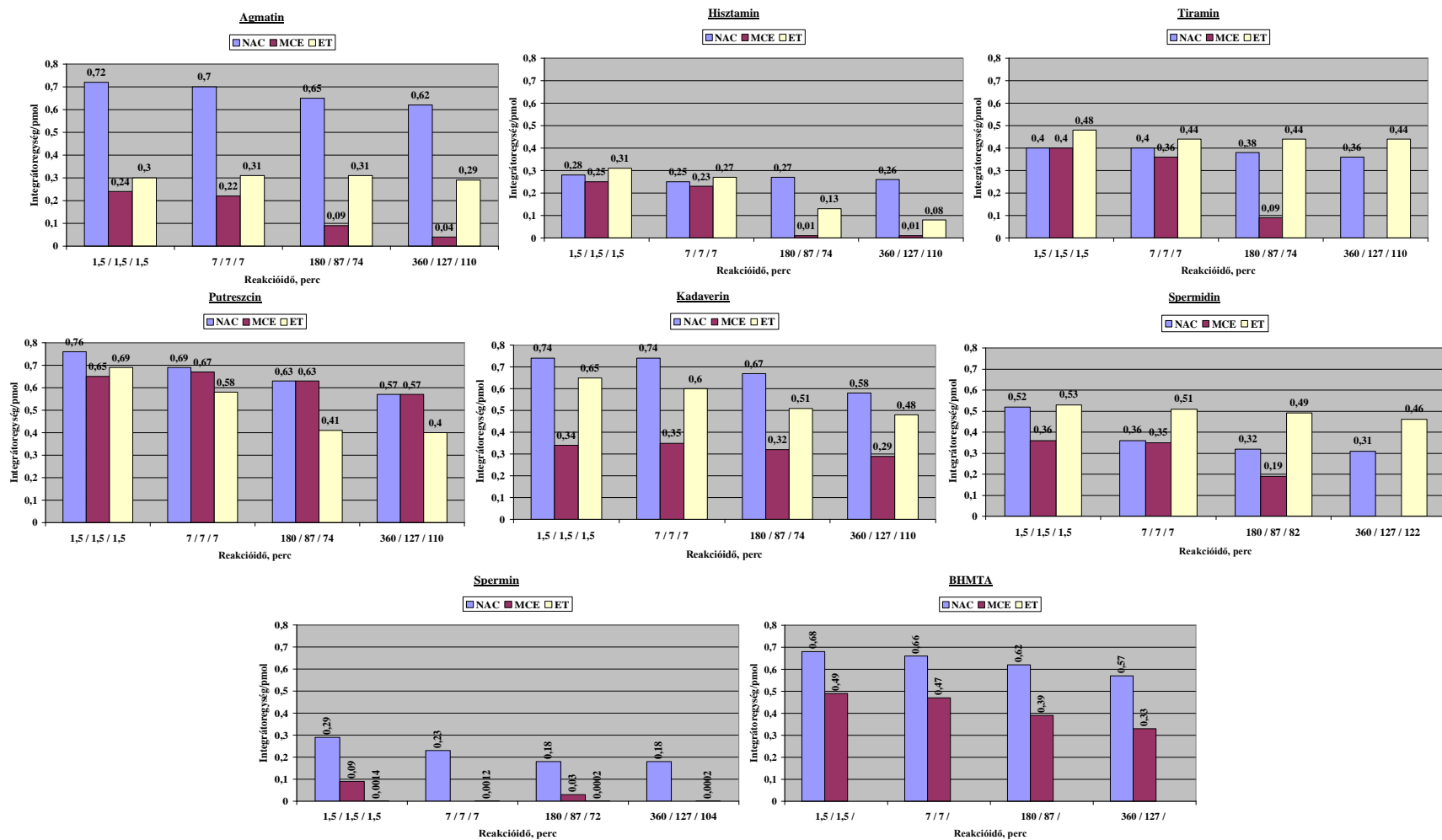


18. ábra: A putreszcin és a kadaverin, az OPA/MCE és az OPA/MPA=1/3 molarányú reagensekkel képzett származékainak (1–3), eltérő reakcióidők után nyert fluoreszcenciás kromatogramjai



Megjegyzés: az OPA/MCE-reagenssel mért adatokat lásd a 25. táblázatban, az OPA/MPA-reagens adatai a [298]-ből származnak.

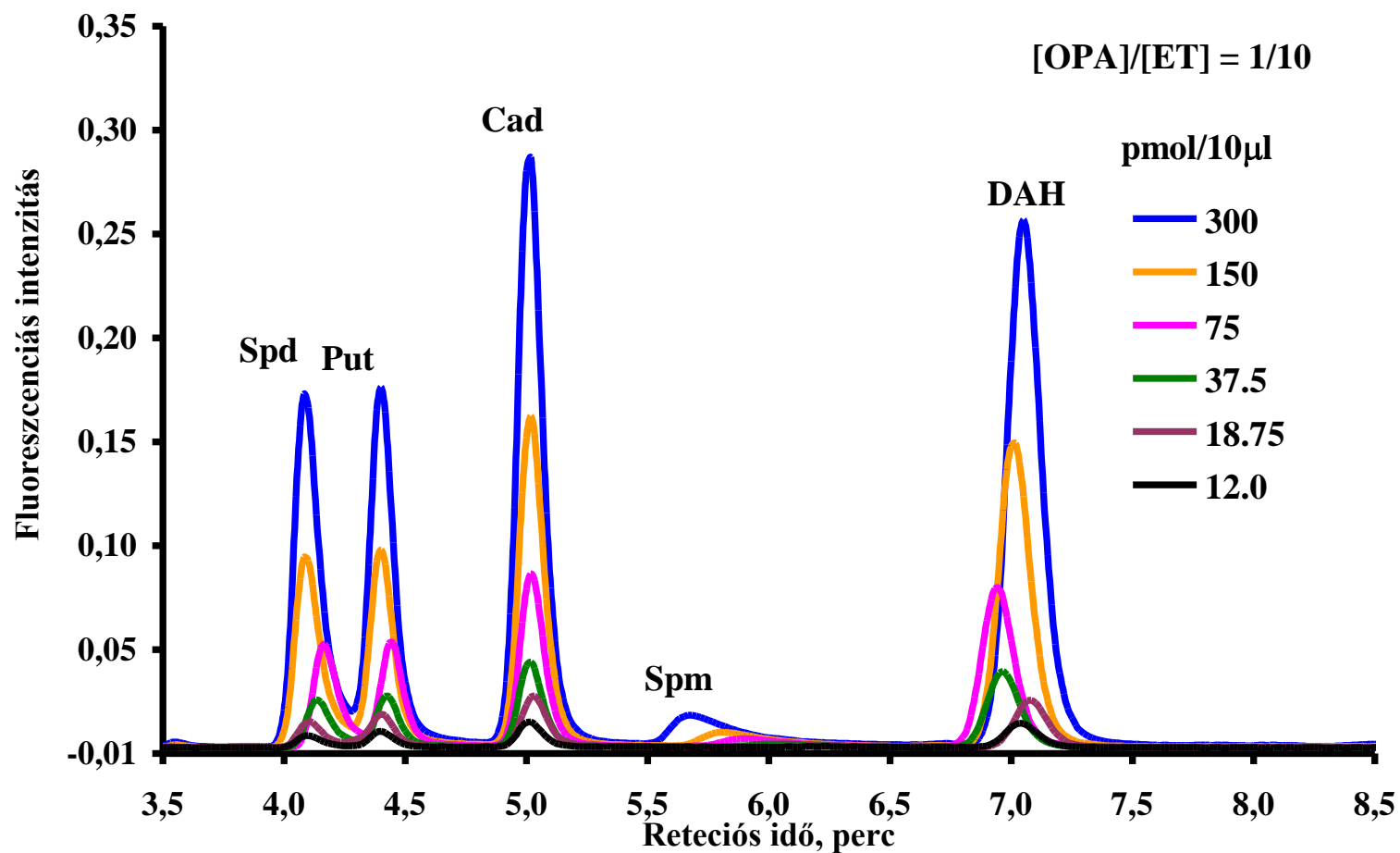
19. ábra: A biogén aminok OPA/NAC-, OPA/MCE- és OPA/ET-reagensokkal képzett származékai UV válaszjeleinek összehasonlítása, a reakcióidő függvényében



Jelölések, mint az 1.–18. ábránál.

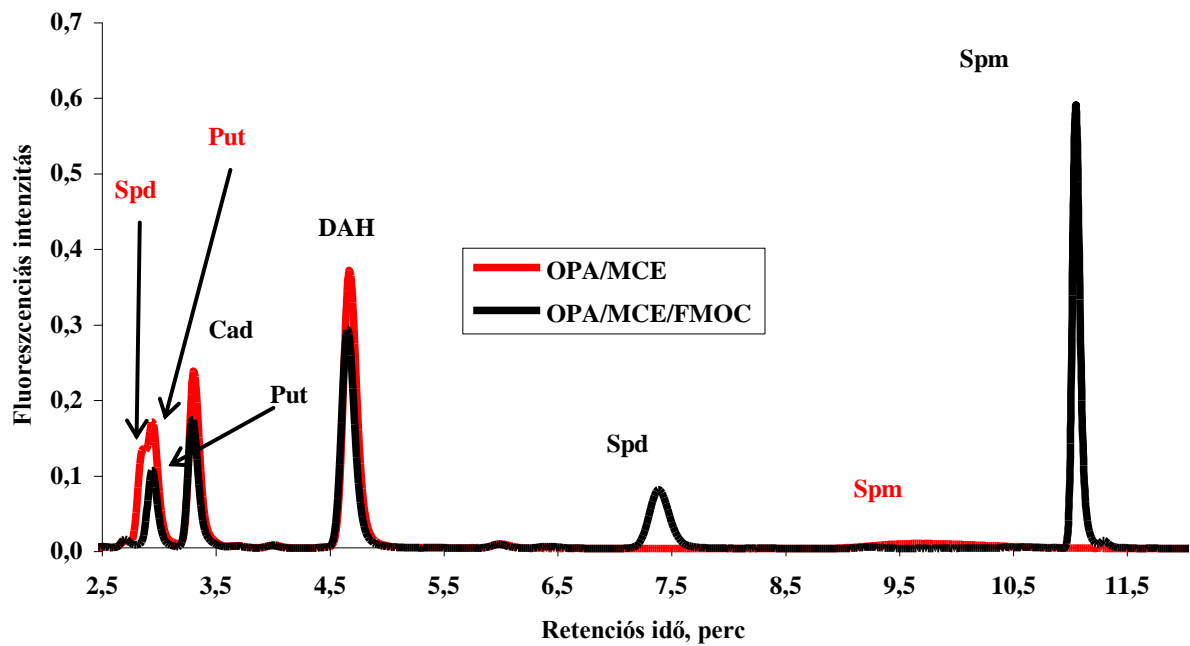
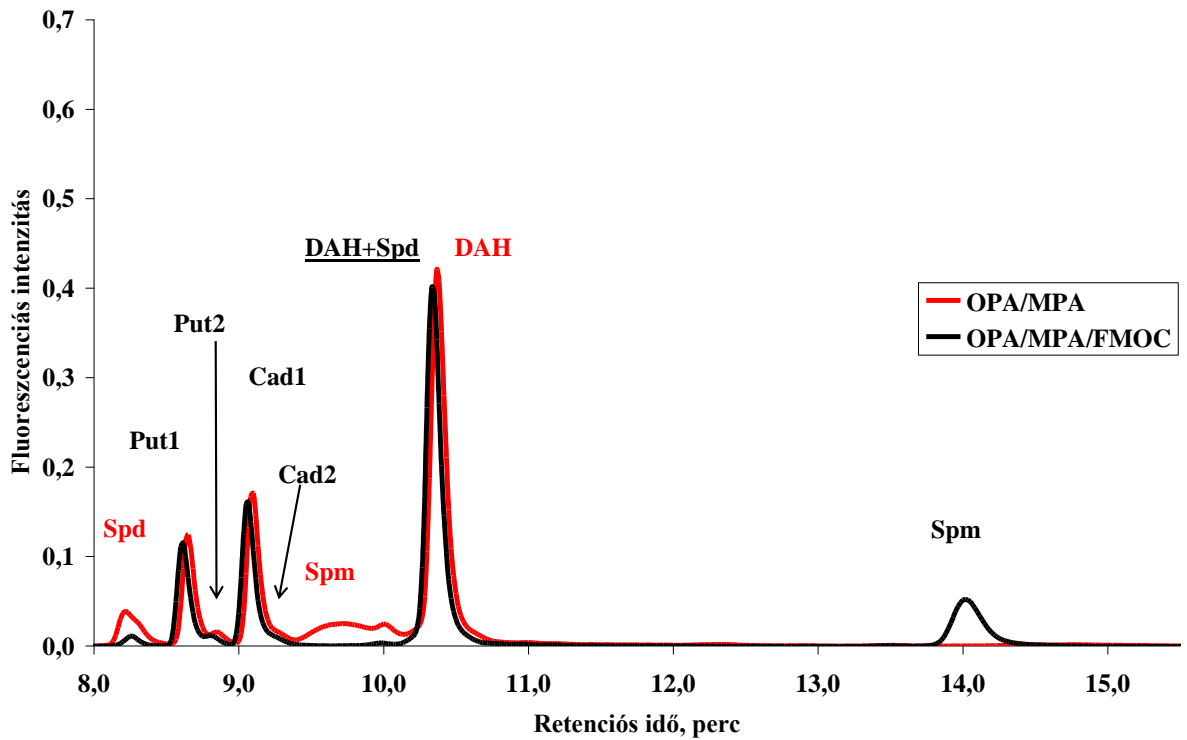
Megjegyzés: az adatok a NAC, MCE, ET sorrendben a [298]-ból, a 25. és 26. táblázatokból véve

20. ábra: A spermidin, a putreszcin, a kadaverin, a spermin és az 1,7-diaminoheptán különböző mennyiségének egyidejű meghatározása OPA/ET-származékként, 20 (V/V) % metanoltartalmú reagenssel, fluoreszcens detektálással, 90 s-os reakcióidővel



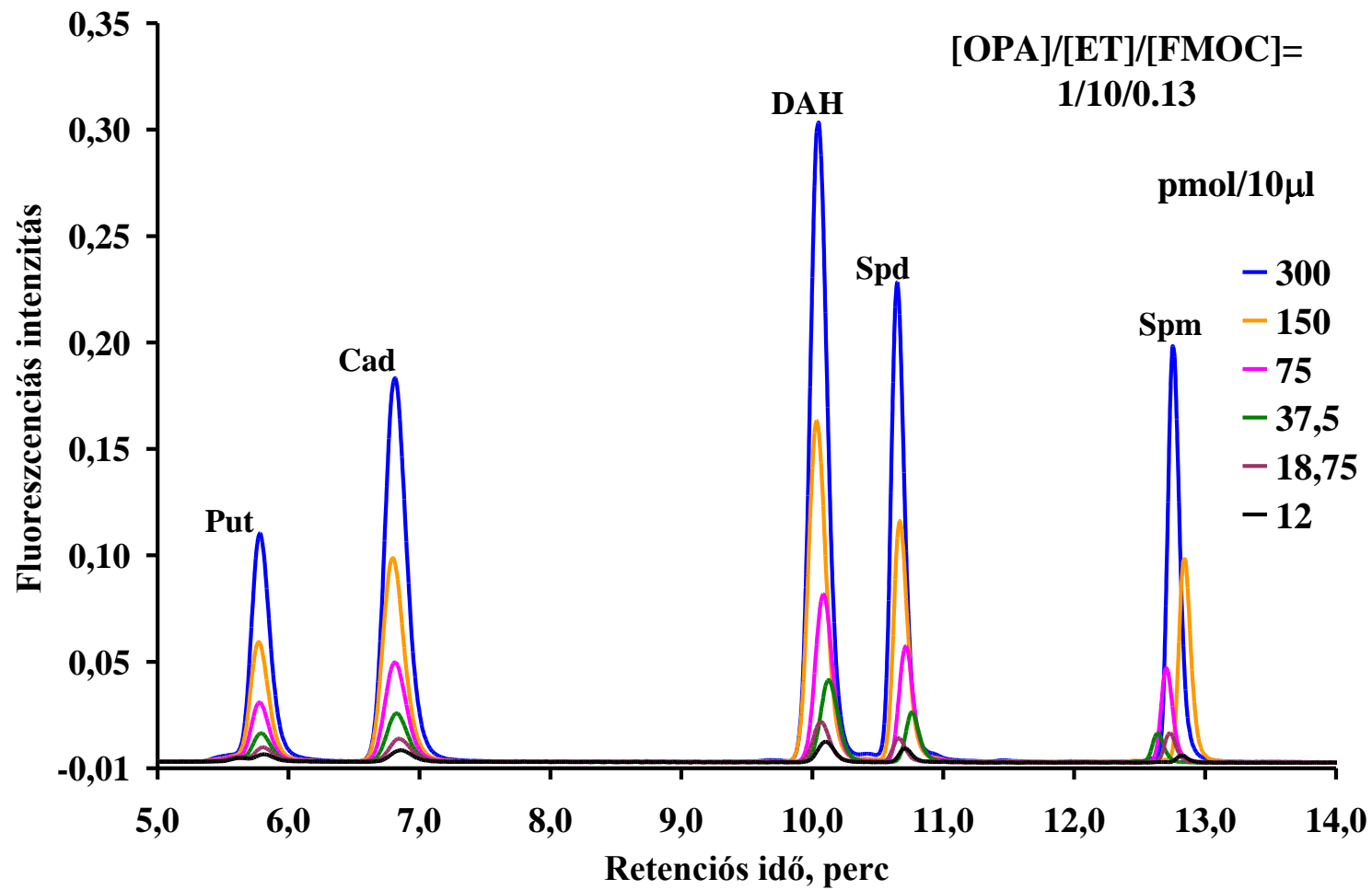
Jelölések: Spd=spermidin; Put=putreszcin; Cad=kadaverin; Spm=spermin; DAH=1,7-diaminoheptán;
Megjegyzés: a részletes adatokat lásd a 28. táblázatnál.

21. ábra: A spermidin, a putreszcín, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán és a spermin meghatározása OPA/MPA(/FMOC)- és OPA/MCE(/FMOC)-reagensekkel



Jelölések, mint az 1–20. ábránál.

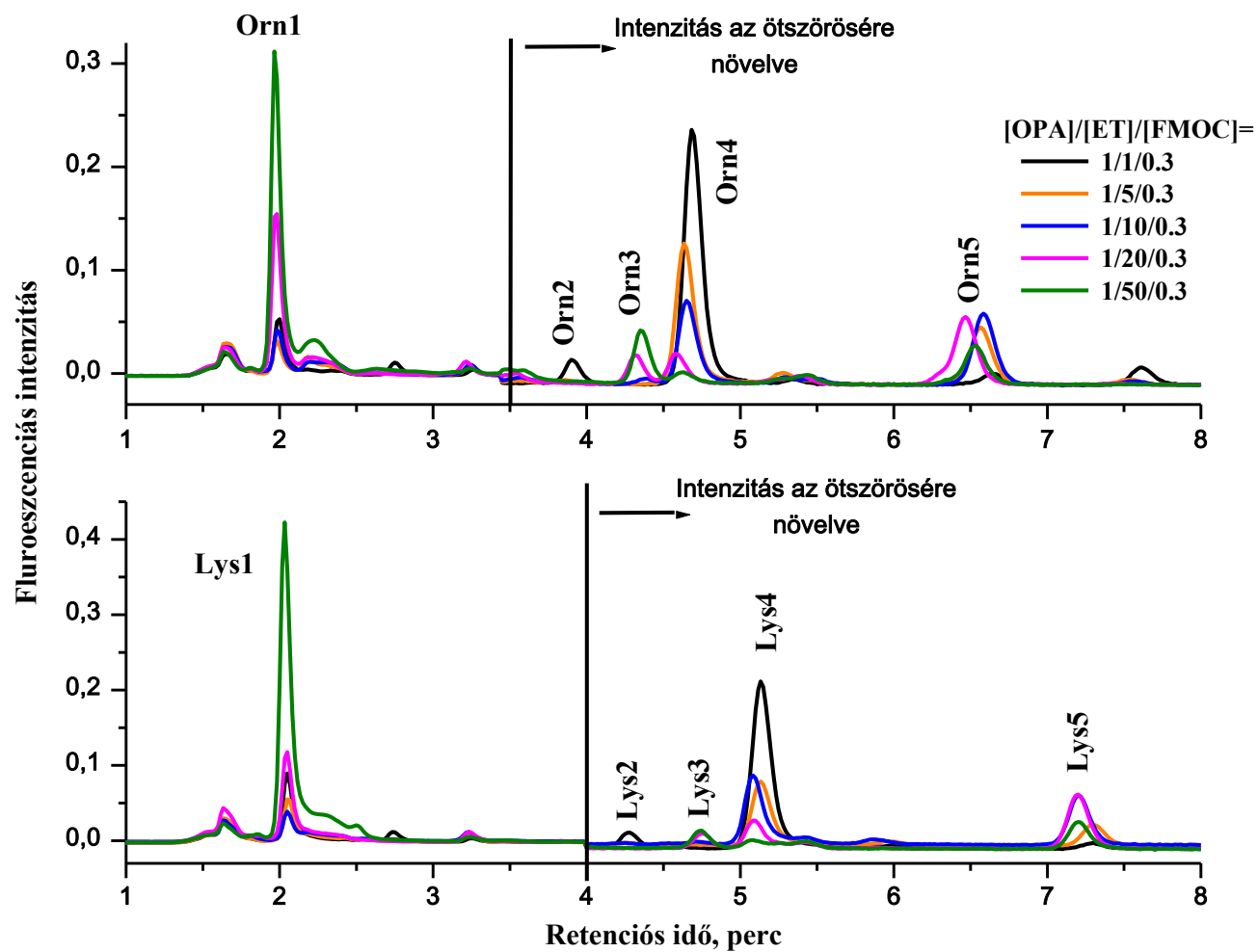
22. ábra: A putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin különböző mennyiségének, egyidejű meghatározása OPA/ET/FMOC=1/10/0,13 molarányú, 20 (V/V)% metanoltartalmú reagens alkalmazásával, fluoreszcens detektálással, 90 s+90 s reakcióidővel



Jelölések, mint a 7.–21. ábránál.

Megjegyzés: a részletes adatokat lásd a 29. táblázatnál.

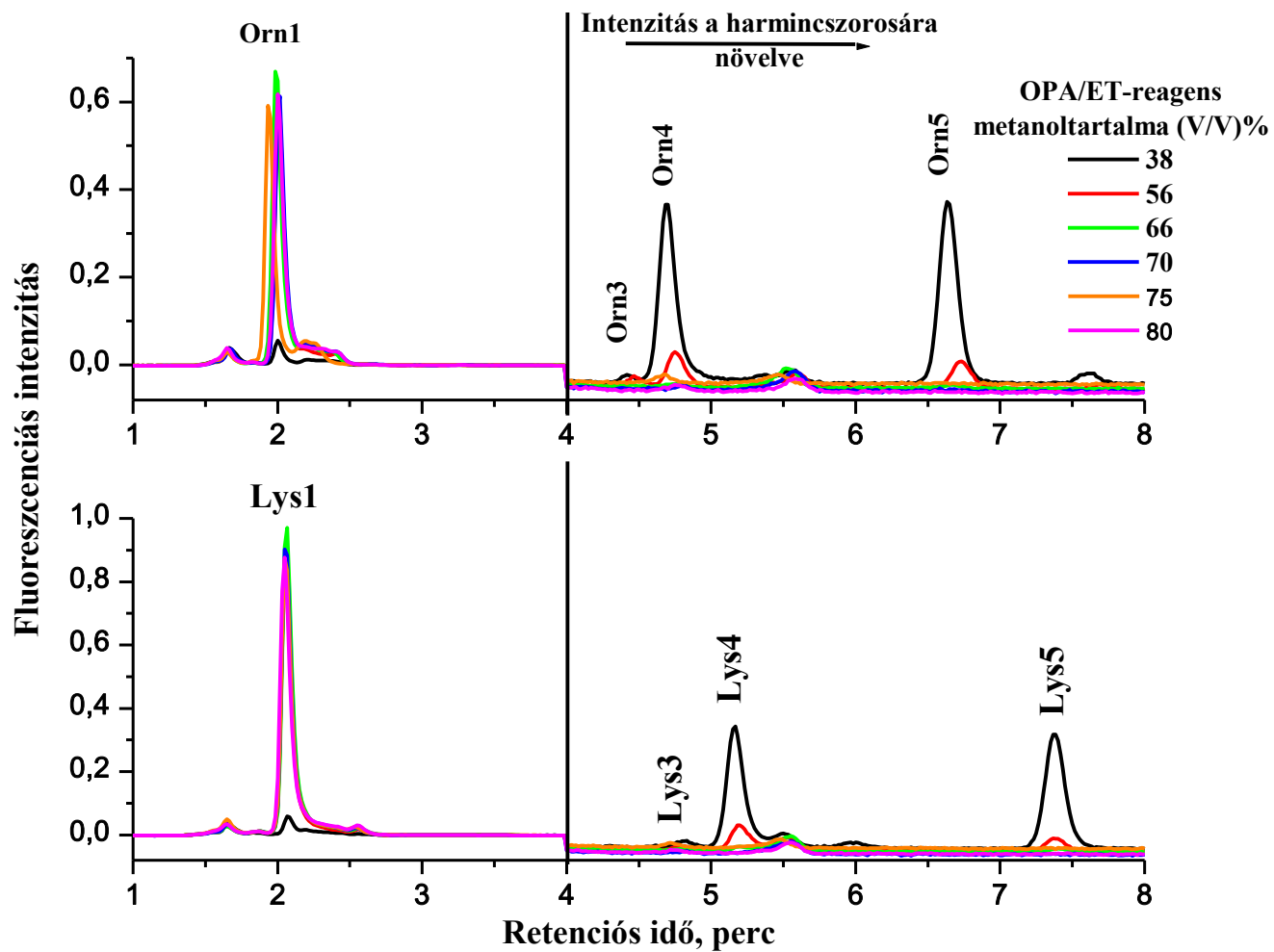
23. ábra: Az ornitin és lizin OPA/ET/FMOC-származékainak fluoreszcenciás kromatogramjai az OPA/ET mólarány függvényében {20 (V/V)% metanoltartalmú reagens }



Jelölések: Orn=ornitin; Lys=lizin;

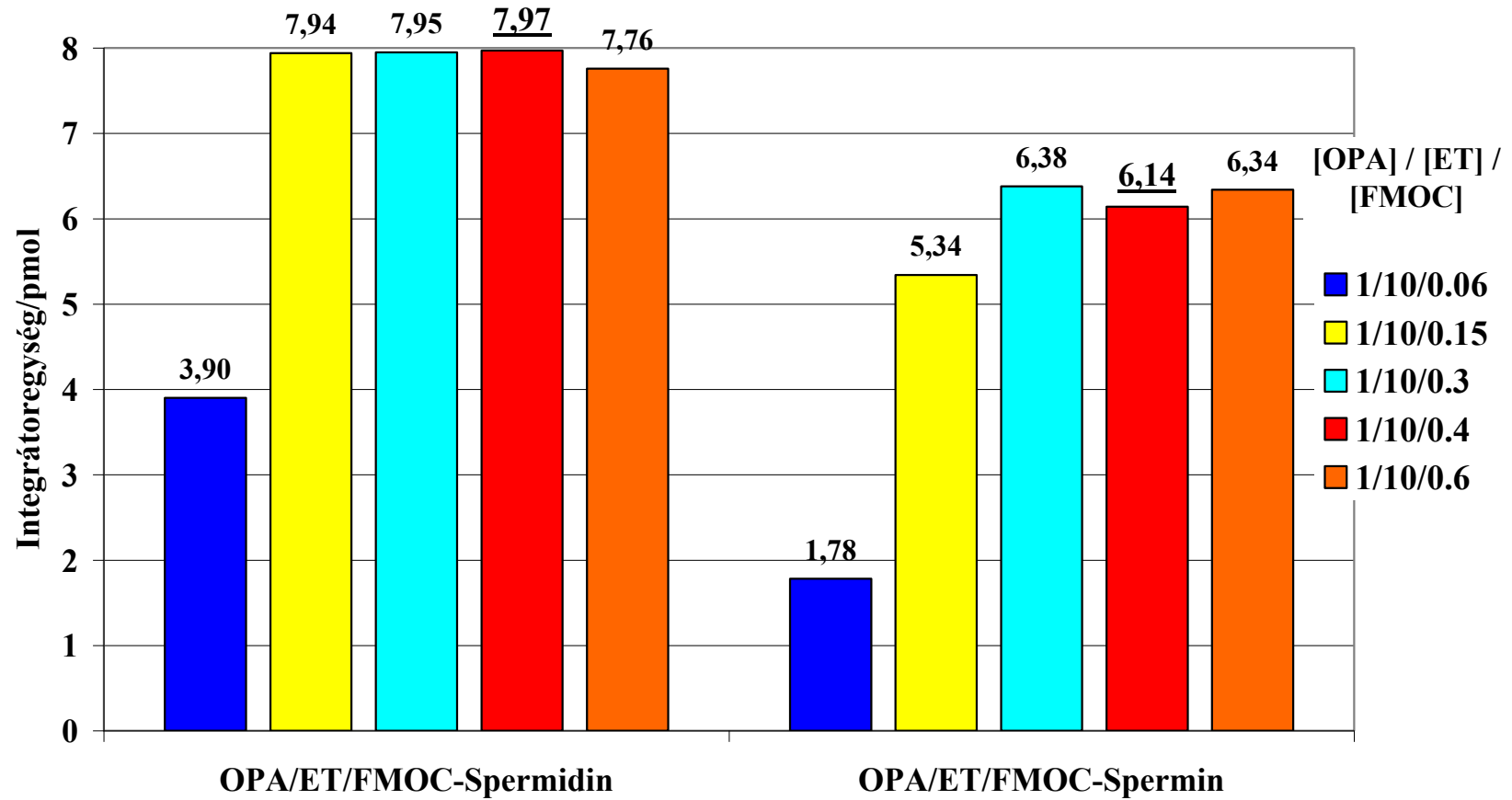
Megjegyzés: E-2 és O-2 oszlopokat használva, 50 °C, 1 ml/perc. Gradiens: 0 perc: 30 % A-eluens+70 %MeOH; 4 perc: 25 % A-eluens+75 %MeOH; 4,1 perc–10 perc: 100 % MeOH; 10,1 perc–18 perc: 30 % A-eluens+70 %MeOH;

24. ábra: Az ornitin és lizin, az OPA/ET/FMOC=1/10/0,3 reagenssel képzett származékainak fluoreszcenciás kromatogramjai a reagens metanoltartalmának $\{(V/V) \%$ } függvényében

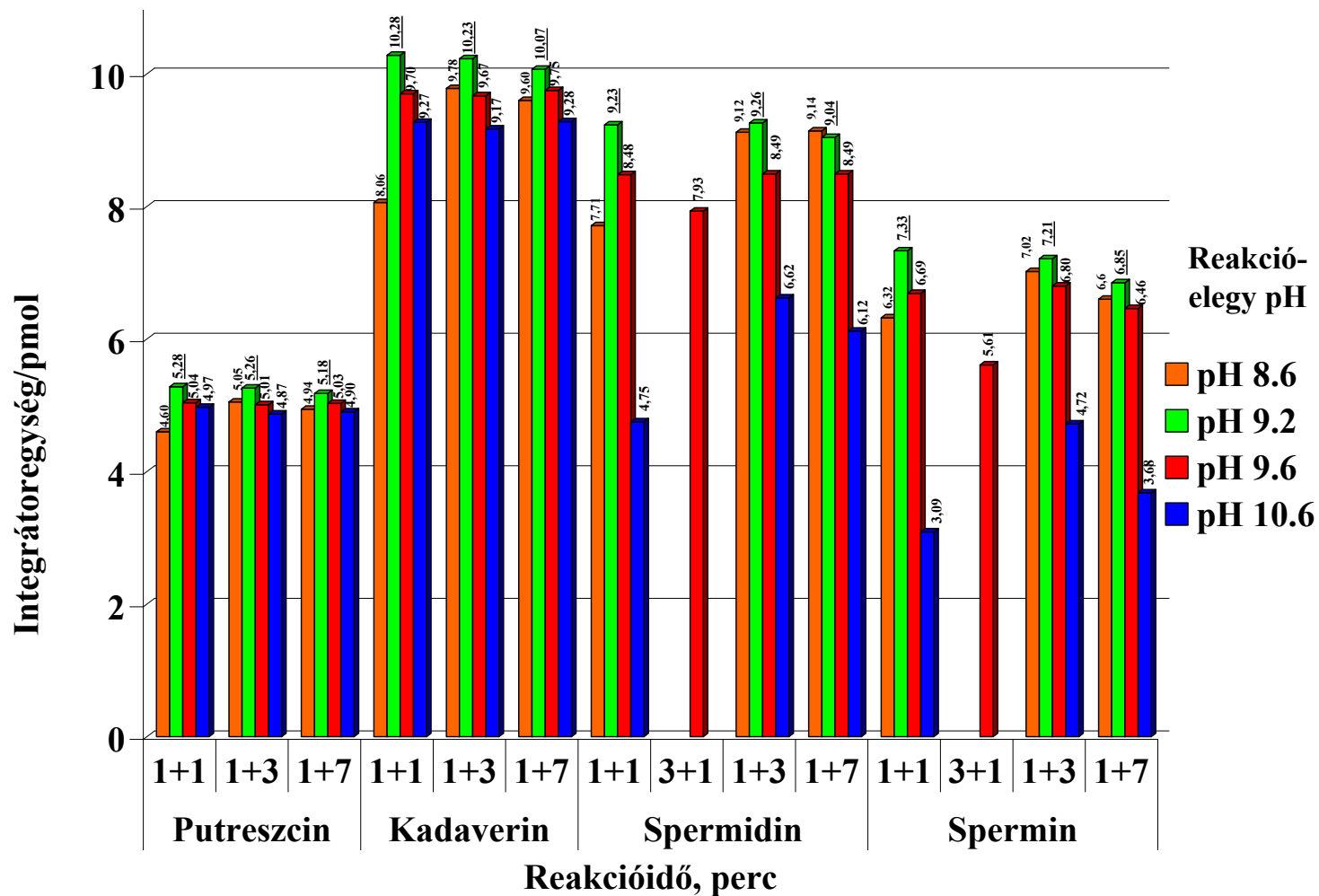


Jelölések, megjegyzések, mint a 23. ábránál.

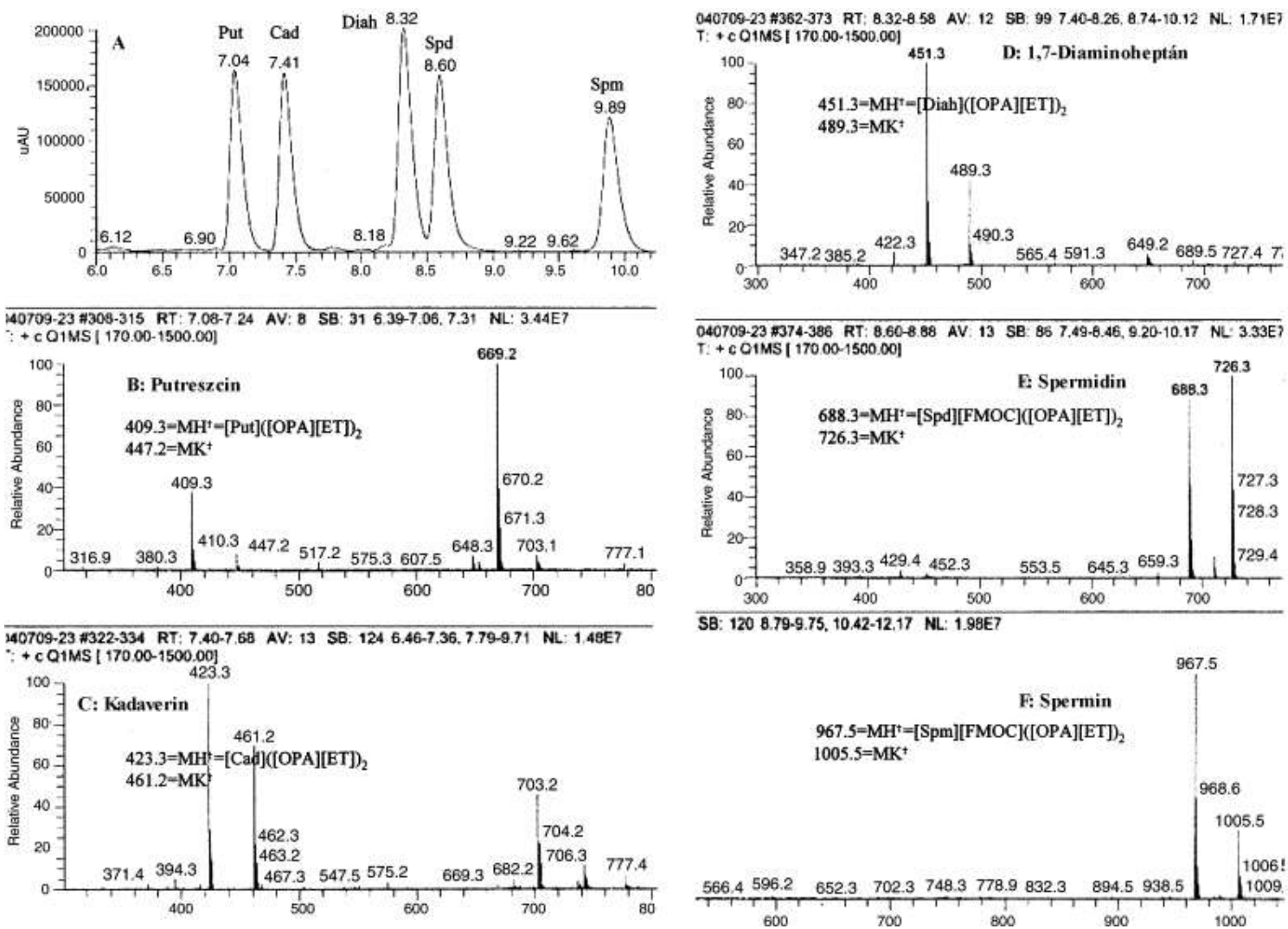
25. ábra: A spermidin és spermin OPA/ET/FMOC-származékok fluoreszcenciás válaszjelei az OPA/ET/FMOC-reagens molarányának függvényében



26. ábra: A putreszcinn, a kadaverinn, a spermidinn és a sperminn OPA/ET/FMOC-származékainak fluoreszcenciás válaszjelei, a reakcióelegy pH-értékének függvényében



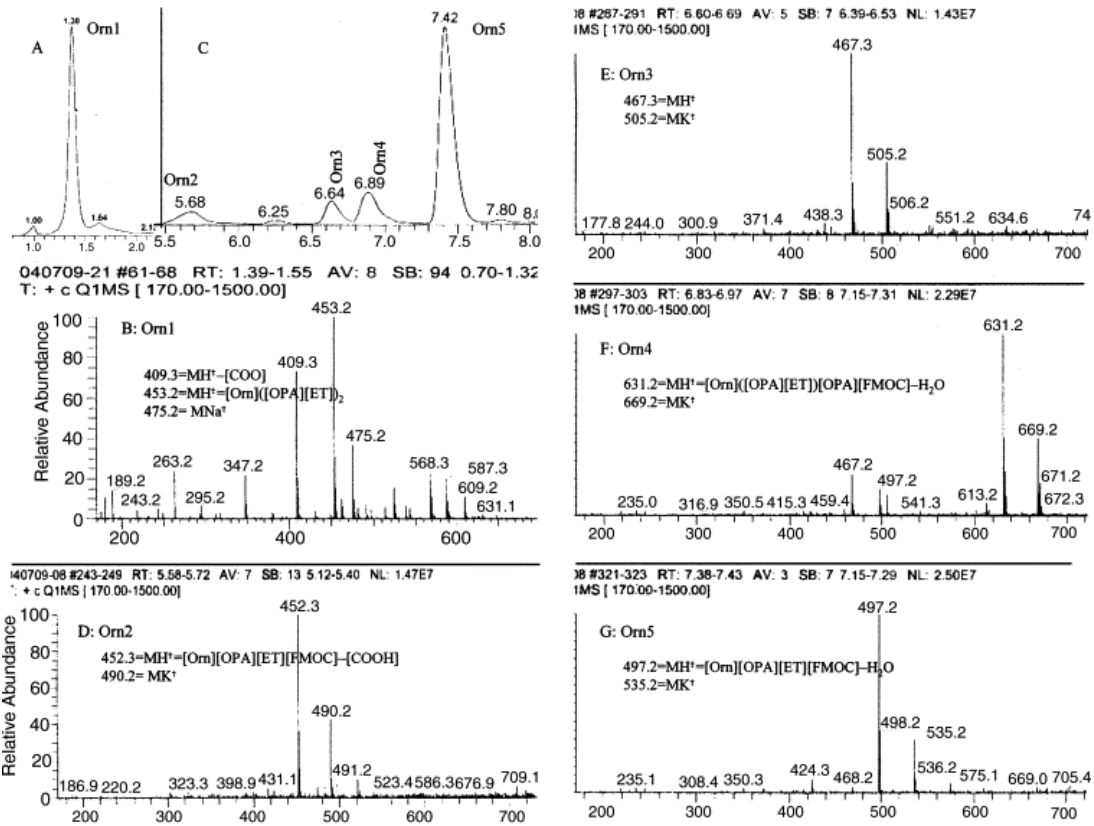
27. ábra: A putreszcin, a kadaverin, az 1,7-diaminoheptán, a spermidin és a spermin OPA/ET/FMOC-származékainak UV-kromatogramja és tömegspektruma



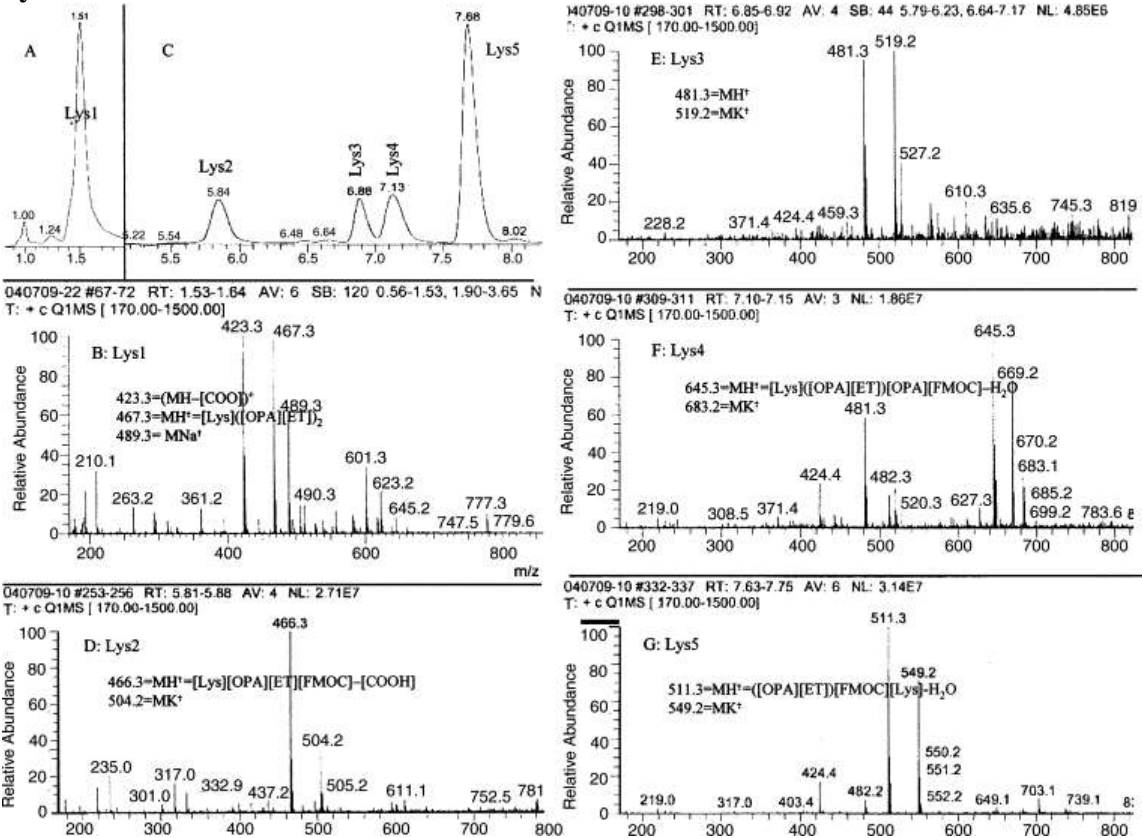
Jelölések, mint a 7.–26. ábráknál.

28. ábra: Az ornitin (Orn1–Orn5) és a lizin (Lys1–Lys5) OPA/ET/FMOC-származékainak UV-kromatogramja (A, C) és tömegspektruma (B,D–G)

Orn:

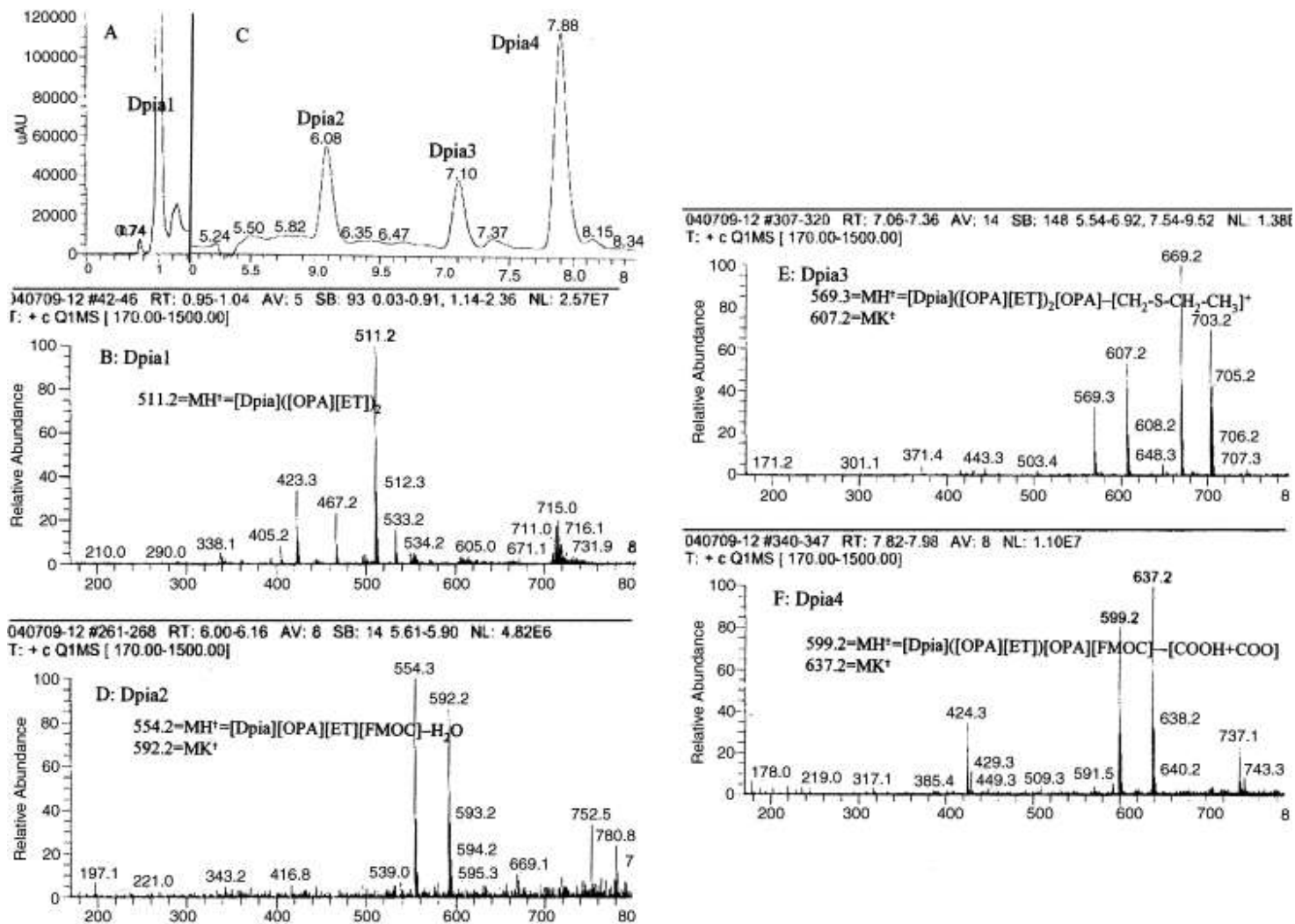


Lys:

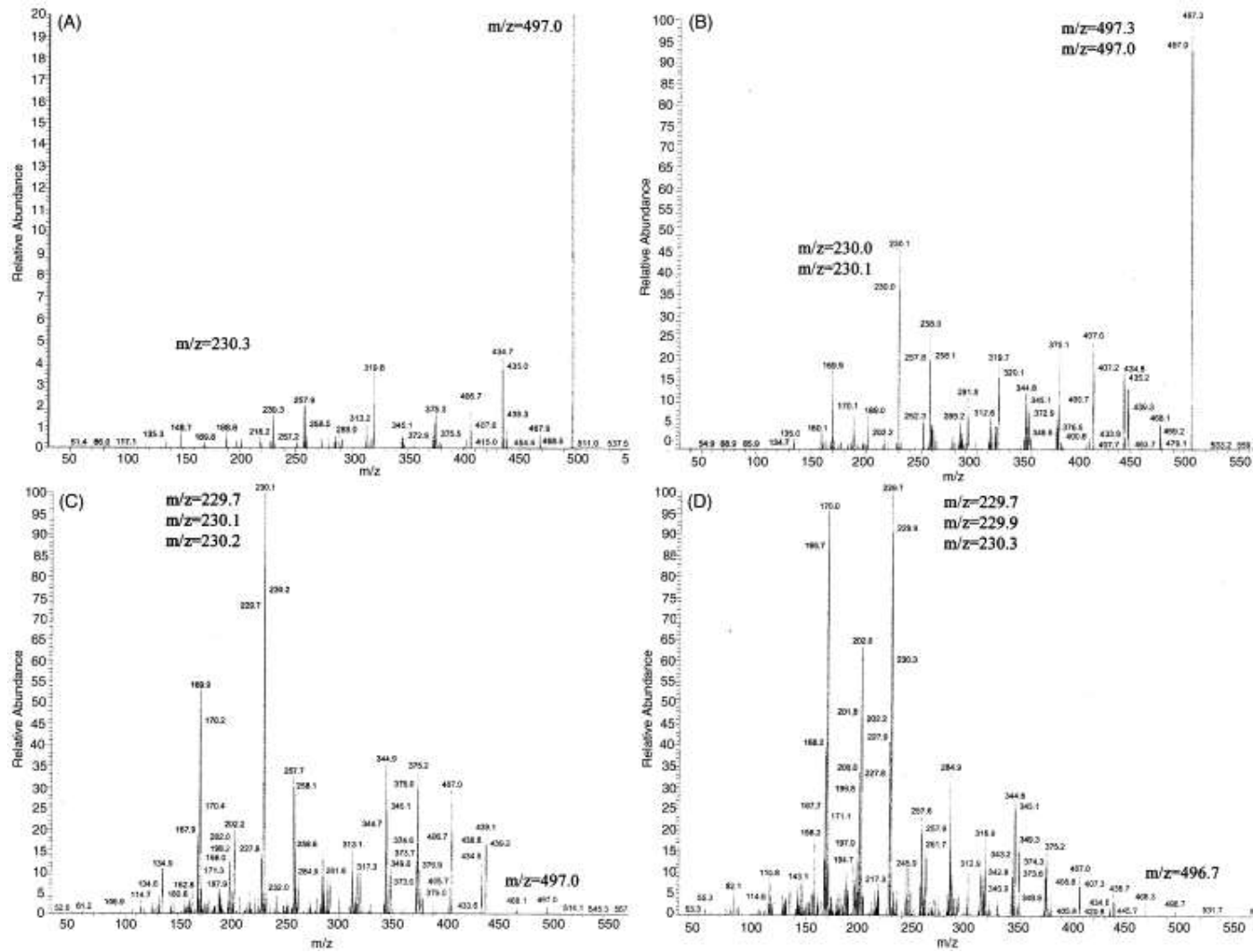


Jelölések, mint az 1.-27. ábránál.

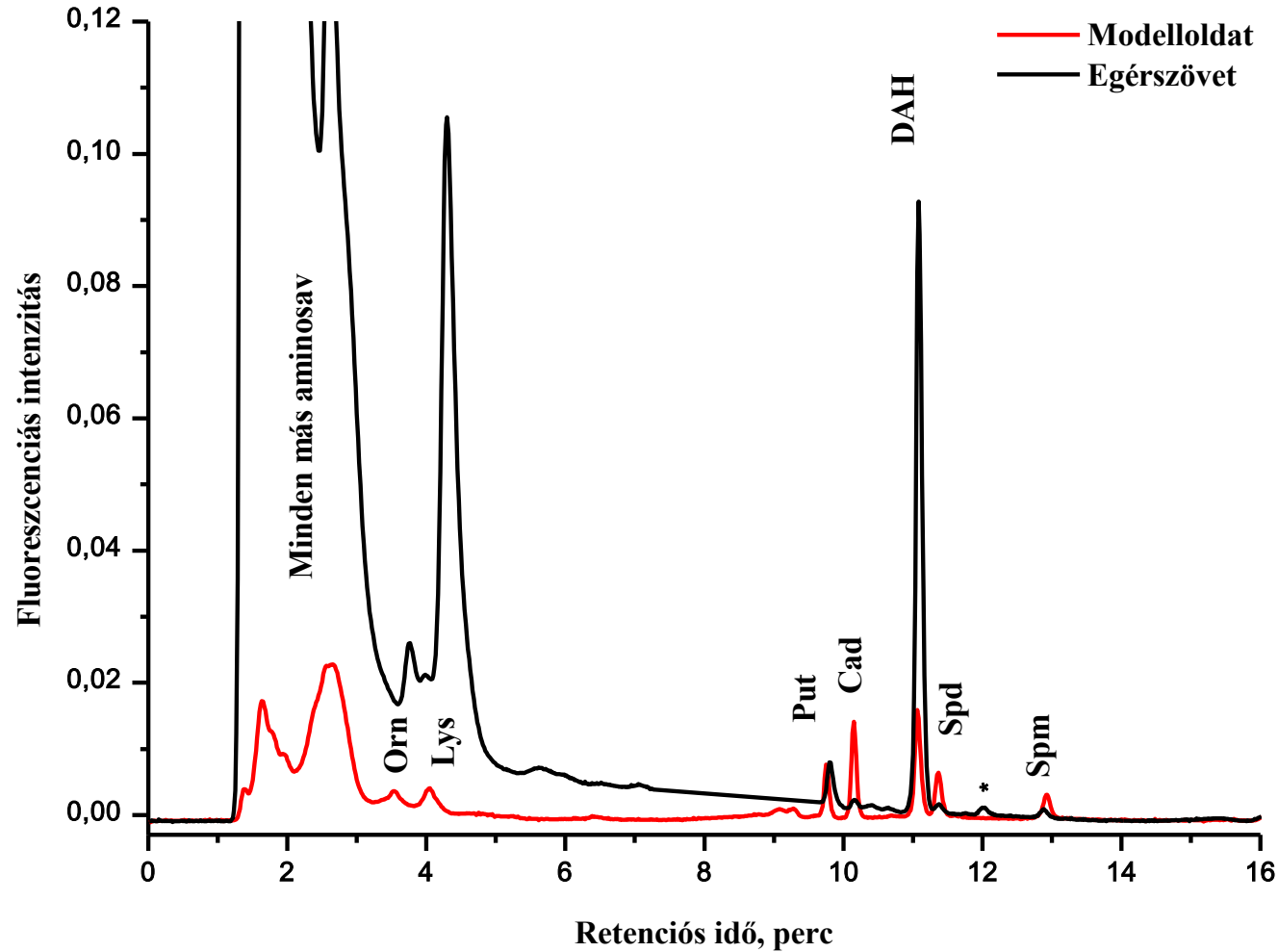
29. ábra: A 2,6-diaminopimelinsav (Dpia1–Dpia4) OPA/ET/FMOC-származékainak UV-kromatogramja (A, C) és tömegspektruma (B,D–F)



30. ábra: Az OPA/ET/FMOC-ornitin5-származék MS–MS-vizsgálata, az alkalmazott feszültség függvényében (A: 10 eV; B: 20 eV; C: 30 eV; D: 40 eV)

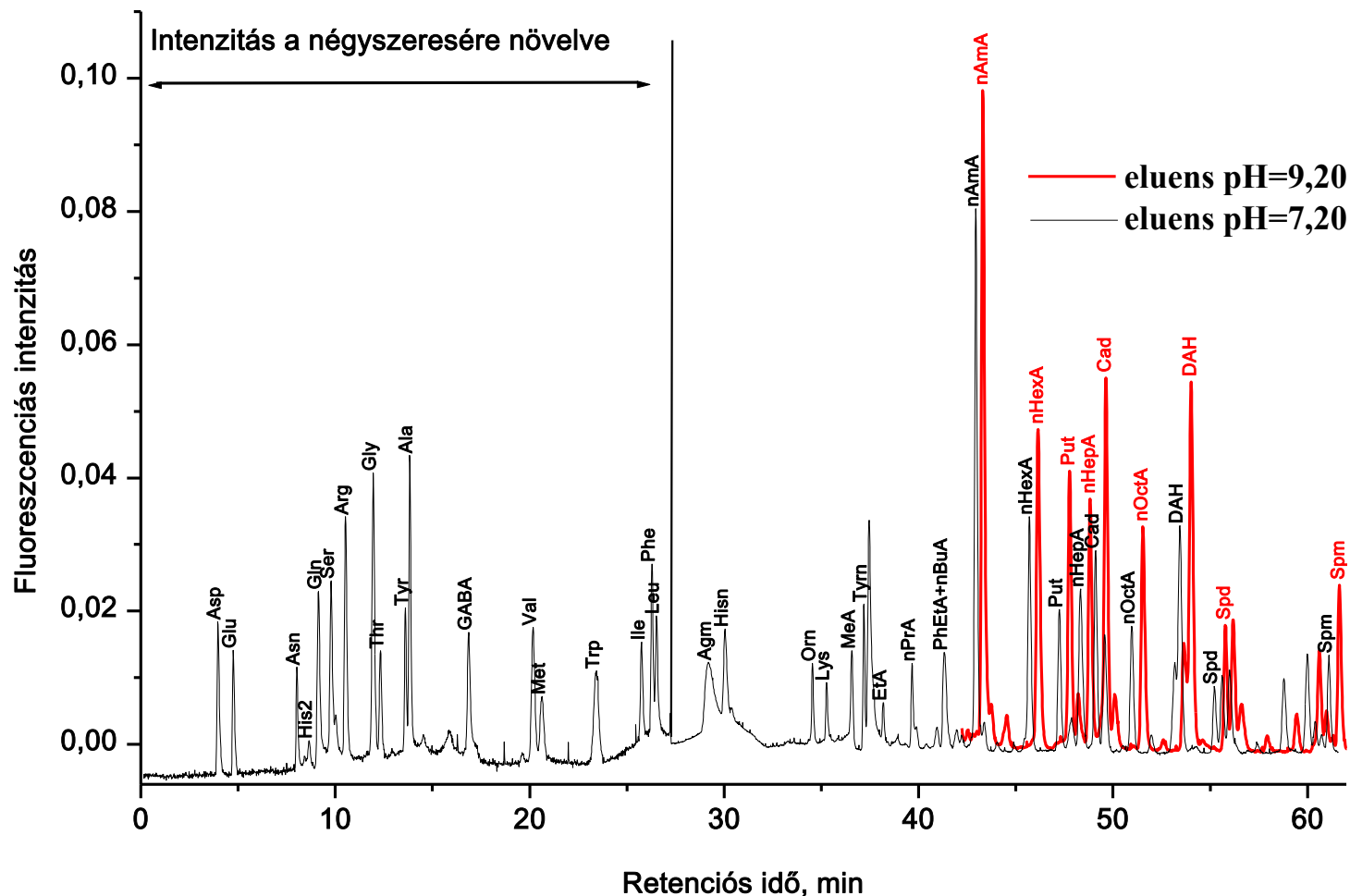


31. ábra: Modelloldat és biológiai szövet aminosav- és amintartalmának meghatározása az OPA/ET/FMOC-reagens alkalmazásával



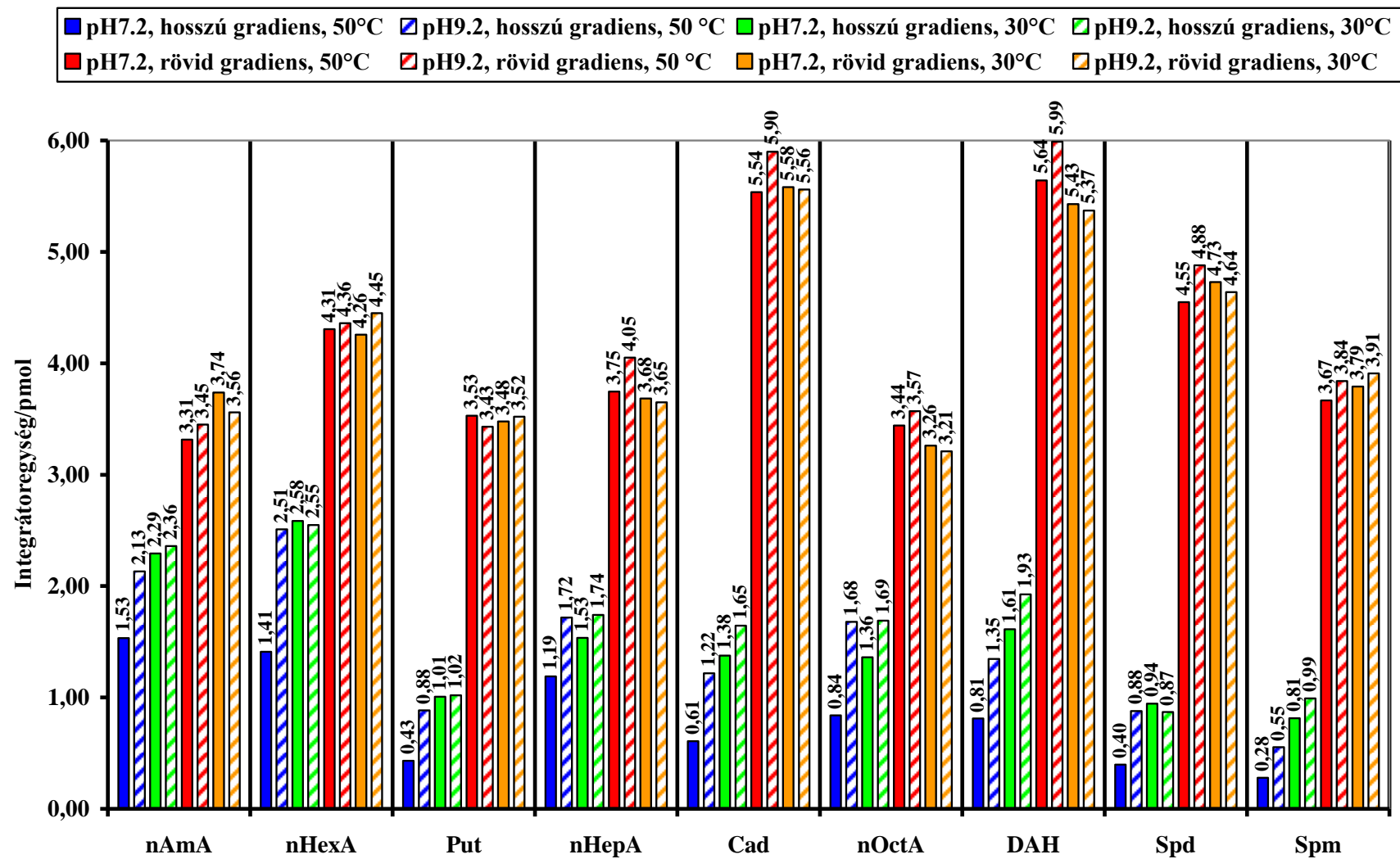
Megjegyzés: Orn=ornitin, Lys=lizin, Put=putreszcín, Cad=kadaverin, DAH=1,7-diaminoheptán, Spd=spermidin, Spm=spermin, *=ismeretlen.. A modelloldat 13-14 pmol/injektált mennyiségű ornitint, lizint, putreszcint, kadaverint, 1,7-diaminoheptánt, spermidint és spermint tartalmazott. A 77 mg egér szövetből származó minta 23,8 µg Orn-t; 27,7 µg Lys-t; 0,40 µg Put-t; 0,04 µg Cad-t; 4,43 µg DAH-t (belső standardot); 0,13 µg Spd-t és 0,32 µg Spm-t tartalmazott.

32. ábra: Harminchét összetevő egyidejű elválasztása az OPA/ET/FMOC=1/10/0,4 molarányú (pH=9,30), 80 (V/V)% metanoltartalmú reagens alkalmazásával, az alkalmazott eluensek függvényében.



Jelölések: Asp=szparaginsav; Glu=glutaminsav; Asn=aszparagin; His2=hisztidin2; Gln=glutamin; Ser=szerin; Arg=arginin; Gly=glicin; Thr=treonin; Tyr=tirozin; Ala=alanin; GABA= γ -aminovajsav; Val=valin; Met=metionin; Trp=triptofán; Ile=izoleucin; Leu=Leucin; Agm=agmatin; Hisn=hisztamin; Orn=ornitin; Lys=lizin; MeA=metilamin; Tyrn=tiramin; EtA=etilamin; nPrA=*n*-propilamin; PhEtA= β -feniletamin; nBuA=*n*-butilamin; nAmA=*n*-amilamin; nHexA=*n*-hexilamin; Put=putreszcin; nHepA=*n*-heptilamin; Cad=kadaverin; nOctA=*n*-oktilamin; DAH=1,7-diaminoheptán; Spd=spermidin; Spm=spermin

33. ábra: Aminok fluoreszcenciás válaszelőnének függése a hőmérséklettől (50 °C vagy 30 °C), az elválasztás időtartamától (43 perc vagy 74 perc) és az eluensek pH-értékétől (pH=7,2 vagy 9,2)



Jelölések, mint a 33. ábránál

11. Irodalomjegyzék

- [1] T.P. Davis, C.W. Gehrke, C.W. Gehrke Jr., T.D. Cunningham, K.C. Kuo, K.O. Gerhardt, H.D. Johnson, C.H. Williams, *Clin. Chem.* 24 (1978) 1317–1324.
- [2] K. Saito, M. Horie, N. Nose, K. Nakagomi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr.* 595 (1992) 163–168.
- [3] I. Molnár-Perl, editor, *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005).
- [4] Claire Elfakir, HPLC of Amino Acids without Derivatization, in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, I. Molnár-Perl, editor, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005) 120–136.
- [5] K. Blau, John Halkett, editors, *Handbook of Derivatives for Chromatography*. – 2nd ed. (1993) J.Wiley & Sons, 163.
- [6] I. Molnár-Perl, HPLC of Amino Acids as Phenylthiocarbamoyl Derivatives, in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, I. Molnár-Perl, editor, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005) 137–162.
- [7] K. Blau, J. Halket, Editors, *Handbook of Derivatives for Chromatography*. – 2nd ed. (1993) J.Wiley & Sons, 187.
- [8] Björn Josefsson, HPLC of Amino Acids as Chloroformate Derivatives, in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, I. Molnár-Perl, editor, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005) 199–228.
- [9] K. Blau, J. Halket, editors, *Handbook of Derivatives for Chromatography*. – 2nd ed. (1993) J.Wiley & Sons, 177.
- [10] G. Lunn, L. C. Hellwig, Editors, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC* (1998) J.Wiley & Sons, 595.
- [11] Toyohide Takeuchi, HPLC of Amino Acids as Dansyl and Dabsyl Derivatives, in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, I. Molnár-Perl, editor, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005) 229–241.
- [12] G. Lunn, L. C. Hellwig, Editors, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC* (1998) J.Wiley & Sons, 567.
- [13] Steve A. Cohen, Quantitation of Amino Acids as 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate Derivatives, in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, I. Molnár-Perl, editor, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005) 242–268.
- [14] K. Blau, J. Halket, Editors, *Handbook of Derivatives for Chromatography*. – 2nd ed. (1993) J.Wiley & Sons, 194.
- [15] M. Roth, *Anal. Chem.* 43 (1971) 880–882.
- [16] I. Molnár-Perl, (Review) *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 283–302, 2. táblázat.
- [17] Y.-H. Tseng, Y.-L. Lee, R.-C Li, J.-L. Mau, *Food Chem.* 90 (2005) 409–415.
- [18] H.J. Lee, J.Y. Ban, S.O. Cho, Y.H. Seong, *Pharmacol. Res.* 51 (2005) 261–268.
- [19] M.C. Leitão, A.P. Marques, M.V. San Romão, *Food Control* 16 (2005) 199–204.
- [20] J.H. Yang, Y.H. Tseng, H.L. Chang, Y.-L. Lee, J.-L. Mau, *Food Chem.* 90 (2005) 303–309.
- [21] W. Almgauer-Melian, R. Cruz-Aguado, C. de la Riva, K.M. Kendrick, J.U. Frey, J. Bergado, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (2005) 877–883.
- [22] P.K. Naraharisetti, M.D.N. Lew, Y.-C. Fu, D.-J. Lee, C.-H. Wang, *J. Control. Rel.* 102 (2005) 345–359.
- [23] B. Hibbert, I. Fung, R. McAuley, M. Samia, V. Trudeau, *Gen. Comp. Endocrinol.* 140 (2005) 176–183.
- [24] M. Ávila, S. Garde, P. Gaya, M. Medina, M. Nuñez, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 145–153.
- [25] S. Morales-Muñoz, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 1–7.
- [26] T. Ishide, A. Amer, T.J. Maher, A. Ally, *Neurosci. Res.* 51 (2005) 93–103.

- [27] A. Marcobal, M.C. Polo, P.J. Martín-Álvarez, M.V. Moreno-Arribas, *Food Res. Int.* 38 (2005) 387–394.
- [28] B. Boonyapiwat, B. Forbes, G.B. Steventon, *Anal. Biochem.* 335 (2004) 91–97.
- [29] P.K. Kar, V. Tandon, N. Saha, *Parasitol. Int.* 53 (2004) 287–291.
- [30] M. Tranberg, M.H. Stridh, Y. Guy, B. Jilderos, H. Wigström, S.G. Weber, M. Sandberg, *Neurochem. Int.* 45 (2004) 1195–1204.
- [31] B. Ji, K. Ito, S. Sekine, A. Tajima, T. Horie, *Free Rad. Biol. Med.* 37 (2004) 1718–1729.
- [32] J. H. Park, H.J. Lee, S.B. Koh, J.Y. Ban, Y.H. Seong, *J. Ethnopharm.* 95 (2004) 39–45.
- [33] A.I. Esquifino, F. Chacon, P. Cano, A. Marcos, R.A. Cutrera, D.P. Cardinali, *J. Neuroimmunol.* 156 (2004) 66–73.
- [34] Y. Miyamoto, R. Yoshimoto, M. Yumoto, A. Ishihara, K. Takahashi, H. Kotani, A. Kanatani, S. Tokita, *Anal. Biochem.* 334 (2004) 89–96.
- [35] U. Krügel, T. Schraft, R. Regenthal, P. Illes, H. Kittner, *Int. J. Dev. Neurosci.* 22 (2004) 565–570.
- [36] S.K. Al Deeb, I.I. Hamdan, S.M. Al Najjar, *Talanta* 64 (2004) 695–702.
- [37] B. Lu, Y. Yuan, C. Zhang, J. Ou, W. Zhou, Q. Lin, *Plant Sci.* In press 2004.
- [38] A. Marcobal, B. de las Rivas, M.V. Moreno-Arribas, R. Muñoz, *FEMS Microbiol. Lett.* 239 (2004) 213–220.
- [39] W. Muschamp, M.J. Regina, E.M. Hull, J.C. Winter, R.A. Rabin, *Brain Res.* 1023 (2004) 134–140.
- [40] D. Lochmann, S. Stadlhofer, J. Weyermann, A. Zimmer, *Int. J. Pharm.* 283 (2004) 11–17.
- [41] B. Hibbert, I. Fung, R. McAuley, K. Larivière, B. MacNeil, N. Bafi-Yebo, J. Livesey, V. Trudeau, *Mol. Brain Res.* 128 (2004) 121–130.
- [42] M.M.J. Oosthuizen, H. Lambrechts, *Biochim. Biophys. Acta* 1674 (2004) 111–121.
- [43] C.K. Zacharis, G.A. Theodoridis, A.N. Voulgaropoulos, *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 169–175.
- [44] G. Zhu, M. Okada, S. Yoshida, S. Hirose, S. Kaneko, *Neurosci. Lett.* 367 (2004) 241–245.
- [45] M. Okada, G. Zhu, S. Yoshida, S. Hirose, S. Kaneko, *Neuropharm.* 47 (2004) 485–504.
- [46] E. Svensson, A. Skoog, J.P. Amend, *Org. Geochem.* 35 (2004) 1001–1014.
- [47] P. De Witte, *Addictive Behaviors* 29 (2004) 1325–1339.
- [48] C. Sperling, K. Salchert, U. Steller, C. Werner, *Biomater.* 25 (2004) 5101–5113.
- [49] S. Hara, T. Mukai, K. Kurosaki, F. Kuriwa, T. Endo, *Brain Res.* 1016 (2004) 281–284.
- [50] A. Slézia, A.K. Kékesi, T. Szikra, A.M. Papp, K. Nagy, M. Szente, Zs. Maglóczky, T.F. Freund, G. Juhász, *Neurobiol. Disease* 16 (2004) 490–499.
- [51] I. Pérez-Neri, S. Montes, M.-C. Boll, J. Ramírez-Bermúdez, C. Ríos, *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 133–139.
- [52] M.C. Aristoy, F. Toldrá, *Meat Sci.* 67 (2004) 211–217.
- [53] M. Ma, B. Chen, X. Luo, H. Tan, D. He, Q. Xie, S. Yao, *J. Membr. Sci.* 234 (2004) 101–109.
- [54] R. Gatti, M. G. Gioia, P. Andreatta, G. Pentassuglia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 339–348.
- [55] D. Farthing, T. Larus, I. Fakhry, T. Gehr, J. Prats, D. Sica, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 355–359.
- [56] P. Fernández-Tomé, B. Brera, M.-A. Arévalo, M.L. de Ceballos, *Neurobiol. Disease* 15 (2004) 580–589.
- [57] Z.-P. Li, X.-Y. Zhang, X. Lu, M.-K. Zhong, Y.-H. Ji, *Neurochem. Int.* 44 (2004) 263–270.

- [58] X. Zhu, B. Chen, M. Ma, X. Luo, F. Zhang, S. Yao, Z. Wan, D. Yang, H. Hang, J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 695–704.
- [59] M.-C. Aristoy, C. Soler, F. Toldrá, Food Chem. 84 (2004) 485–491.
- [60] A.I. Esquifino, P. Cano, V. Jimenez, C.F.R. Toso, D.P. Cardinali, Exp. Gerontol. 39 (2004) 45–52.
- [61] J.V. Valencia, S.C. Weldon, D. Quinn, G.H. Kiers, J. DeGroot, J.M. TeKoppele, T.E. Hughes, Anal. Biochem. 324 (2004) 68–78.
- [62] X.-P. Li, Y. Zhou, S.-P. Zhao, M. Gao, Q. Zhou, Y.-S. Li, Clin. Chim. Acta 339 (2004) 183–188.
- [63] N. Ishii, H. Ikenaga, P.K. Carmines, Y. Aoki, Z. Ogawa, T. Saruta, T. Suga, Metabolism 53 (2004) 868–874.
- [64] M. Jiménez, J.J. Mateo, M.J. Hinojo, R. Mateo, Int. J. Food Microbiol. 89 (2003) 185–193.
- [65] J. Martens-Lobenhoffer, S.M. Bode-Böger, J. Chromatogr. B 798 (2003) 231–239.
- [66] L. Hertz, B.S. O’Dowd, K.T. Ng, M.E. Gibbs, Brain Res. 994 (2003) 226–233.
- [67] B. Wessner, E.-M. Strasser, A. Spittler, E. Roth, Clin. Nutrition 22 (2003) 515–522.
- [68] S. Inoue, T. Yamanaka, T. Kita, T. Nakashima, H. Hosoi, Brain Res. 991 (2003) 78–83.
- [69] G. Schlosser, G. Mező, R. Kiss, E. Vass, Zs. Majer, M. Fejlbrieff, A. Perczel, Sz. Bősze, S. Welling-Wester, F. Hudecz, Biophys. Chem. 106 (2003) 155–171.
- [70] E.A. Milusheva, M. Baranyi, Neurochem. Int. 43 (2003) 543–550.
- [71] A. Metaxatos, C. Panagiotopoulos, L. Ignatiades, J. Exp. Marine Biol. Ecol. 294 (2003) 203–217.
- [72] A. Cuadrado, G. Amat, J.A. Armijo, Pharmacol. Res. 48 (2003) 183–192.
- [73] M.P.G. Cirilo, A.F.S. Coelho, C.M. Araújo, F.R.B. Gonçalves, F.D. Nogueira, M.B.A. Glória, Food Chem. 82 (2003) 397–402.
- [74] S. Hara, T. Mukai, K. Kurosaki, F. Kuriwa, T. Endo, Brain Res. 979 (2003) 27–36.
- [75] T.S. Rao, K.D. Lariosa-Willingham, N. Yu, Brain Res. 978 (2003) 213–222.
- [76] B.S. Wright, J.W. Snow, T.C. O’Brien, D.V. Lynch, Arch. Biochem. Biophys. 415 (2003) 184–192.
- [77] K. Salchert, T. Pompe, C. Sperling, C. Werner, J. Chromatogr. A 1005 (2003) 113–122.
- [78] P.R. Hutson, M.E. Crawford, R.L. Sorkness, J. Chromatogr. B 791 (2003) 427–430.
- [79] A.I. Duarte, M.S. Santos, R. Seica, C.R. de Oliveira, Brain Res. 977 (2003) 23–30.
- [80] J. Pi, S. Horiguchi, Y. Sun, M. Nikaido, N. Shimojo, T. Hayashi, H. Yamauchi, K. Itoh, M. Yamamoto, G. Sun, Free Radical Biol. Med. 35 (2003) 102–113.
- [81] Y. Kitamaki, J.-Y. Jin, T. Takeuchi, J. Chromatogr. A 1003 (2003) 197–202.
- [82] K. Shimizu, K. Matsubara, K. Ohtaki, S. Fujimaru, O. Saito, H. Shiono, Brain Res. 976 (2003) 243–252.
- [83] B.D. Wagner, G.J. McManus, Anal. Biochem. 317 (2003) 233–239.
- [84] W.C. Santos, M.R. Souza, M.M.O.P. Cerqueira, M.B.A. Glória, Food Chem. 81 (2003) 595–606.
- [85] W. Hanpitakpong, B. Kamanikom, V. Banmairuroi, K. Na-Bangchang, J. Chromatogr. B 788 (2003) 221–231.
- [86] M.C. Vidal-Carou, F. Lahoz-Portolés, S. Bover-Cid, A. Mariné-Font, J. Chromatogr. A 998 (2003) 235–241.
- [87] M.L. Byrnes, J.N. Reynolds, J.F. Brien, Neurotoxicol. Teratol. 25 (2003) 303–310.
- [88] I.-S. Shiah, L.N. Yatham, Y.-C. Gau, G.B. Baker, Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry 27 (2003) 419–423.
- [89] Q. Zhang, C. Anastasio, Atmos. Environ. 37 (2003) 2247–2258.
- [90] J. Landry, R. Sternglanz, Biochem. Biophys. Res. Commun. 303 (2003) 771–776.

- [91] D.S. Lorrain, C.S. Baccei, L.J. Bristow, J.J. Anderson, M.A. Varney, *Neurosci.* 117 (2003) 697–706.
- [92] Y.-W. Tang, *Burns* 29 (2003) 107–113.
- [93] M. Loeliger, C.S. Watson, J.D. Reynolds, D.H. Penning, R. Harding, A.D. Bocking, S.M. Rees, *Neurosci.* 116 (2003) 705–714.
- [94] E.H. Soufleros, E. Bouloumpasi, C. Tsarchopoulos, C.G. Biliaderis, *Food Chem.* 80 (2003) 261–273.
- [95] H. Zhang, S.D. Zhai, Y.M. Li, L.R. Chen, *J. Chromatogr. A* 784 (2003) 131–135.
- [96] Y.G. Kim, S.K. Kim, J.W. Kwon, O.J. Park, S.G. Kim, Y.C. Kim, M.G. Lee, *Life Science* 72 (2003) 1171–1181.
- [97] M.E.M. Rocha, F. Dutra, B. Bandy, R.L. Baldini, S.L. Gomes, A. Faljoni-Alário, C.W. Liria, M. Terêsa, M. Miranda, E.J.H. Bechara, *Arch. Biochem. Biophys.* 409 (2003) 349–356.
- [98] J.A. Ho, R.A. Durst, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 7–13.
- [99] N.S. Butters, J.N. Reynolds, J.F. Brien, *Neurotoxicol. Teratol.* 25 (2003) 59–68.
- [100] T. Ishide, T.J. Maher, A. Ally, *Pharmacol. Res.* 47 (2003) 59–68.
- [101] O.A. Shpigun, E.N. Shapovalova, I.A. Ananeiva, A.V. Pirogov, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 191–199.
- [102] T.P. Piepponen, K. Kiiianmaa, L. Ahtee, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74 (2002) 21–30.
- [103] D. L. Jones, A.G. Owen, J.F. Farrar, *Soil Biol. Biochem.* 34 (2002) 1893–1902.
- [104] J. Lange, K. Thomas, C. Wittmann, *J. Chromatogr. B* 779 (2002) 229–239.
- [105] B.I. Juárez, M.L. Martínez, L. Dufour, E. García, M.E. Jiménez-Capdeville, *Neurotoxicol. Teratol.* 24 (2002) 767–771.
- [106] A. Cuadrado, I. de las Cuevas, E.M. Valdizán, J.A. Armijo, *Eur. J. Pharmacol.* 453 (2002) 43–52.
- [107] A. Ally, S.M. Nauli, T.J. Maher, *Brain Res.* 952 (2002) 176–187.
- [108] E. Wang, E. Struble, P. Liu, A.P. Cheung, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 415–427.
- [109] K. Eggenreich, U. Zeipper, E. Schwendenwein, S. Hadju, G. Kaltenecker, I. Laslo, S. Lang, P. Roschger, V. Vecsei, R. Wintersteiger, *J. Biochem. Biophys. Methods* 53 (2002) 51–59.
- [110] F. Zhou, J. F. Braddock, Y. Hu, X. Zhu, R.J. Castellani, M.A. Smith, K.L. Drew, *J. Neurosci. Methods* 119 (2002) 121–128.
- [111] E. Hinoi, S. Fujimori, T. Takarada, H. Taniura, Y. Yoneda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 452–458.
- [112] A. Iyengar, S.L. Bearne, *Anal. Biochem.* 308 (2002) 396–400.
- [113] A.D'Aniello, A. De Simone, P. Spinelli, S. D'Aniello, M. Branno, F. Aniello, J. Rios, M. Tsesarskaja, G. Fisher, *Anal. Biochem.* 308 (2002) 42–51.
- [114] S. Iqbal, A. Baziany, S. Gordon, S. Wright, M. Hussian, H. Miyashita, A. Shuaib, A. H. Rajput, *Brain Res.* 946 (2002) 162–170.
- [115] M. Zielińska, W. Hilgier, R.O. Law, P. Gorynski, J. Albrecht, *Neurochem. Int.* 41 (2002) 87–93.
- [116] C.M.G. Silva, M.B.A. Glória, *Food Chem.* 78 (2002) 241–248.
- [117] L. Favalli, A. Rozza, P. Frattini, E. Masoero, R. Scelsi., A. Pascale, S. Govoni, *Neurosci. Lett.* 326 (2002) 183–186.
- [118] D. A. Bereiter, S. Shen, A. P. Benetti, *Pain* 98 (2002) 89–99.
- [119] A. Lafuente, A. I. Esquifino, *NeuroToxicology* 23 (2002) 207–213.
- [120] R. Maldonado, M. I. Escribano, C. Merodio, *Postharvest Biol. Technol.* 25 (2002) 301–309.
- [121] L.M. Trulsson, T. Gasslander, T. Sundqvist, *Regul. Pept.* 106 (2002) 97–104.

- [122] B.H. Harvey, L.P. Jonker, L. Brand, M. Heenop, D. J. Stein, *Life Sci.* 71 (2002) 43–54.
- [123] J.B. Gramsbergen, M. Sandberg, A.M. Dall, B. Kornblit, J. Zimmer, *Brain Res.* 935 (2002) 47–58.
- [124] A. Winkler, C. C. Müller-Goymann, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (2002) 281–287.
- [125] X.-W. Dong, P.A. Williams, Y.-P. Jia, T. Priestley, *Pain* 96 (2002) 309–318.
- [126] A. Parada, P. Soares-da-Silva, *Neurochem. Int.* 40 (2002) 435–440.
- [127] S.K. Kim, Y.C. Kim, *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 545–549.
- [128] F. C. Wu, E. Tanoue, *Chem. Geol.* 184 (2002) 139–149.
- [129] B. Eppler, R. Dawson Jr., *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1051–1060.
- [130] P. Hušek, A. Pohlídal, D. Slabík, *J. Chromatogr. B* 767 (2002) 169–174.
- [131] C.P. Smith, G.T. Somogyi, E.T. Bird, M.B. Chancellor, T.B. Boone, *Brain Res. Protocols* 9 (2002) 57–64.
- [132] S.H. Kenyon, C.J. Waterfield, J.A. Timbrell, A. Nicolaou, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 381–391.
- [133] M.S. Reid, L.B. Ho, K. Hsu, L. Fox, B.K. Tolliver, J.U. Adams, A. Franco, S.P. Berger, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71 (2002) 37–54.
- [134] J.A. Rufian-Henares, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova, *Food Res. Int.* 35 (2002) 527–533.
- [135] T. Ishide, T.J. Maher, W.J. Pearce, S.M. Nauli, P. Chaivakul, A. Ally, *Brain Res.* 923 (2001) 137–146.
- [136] S.M. Nauli, W.J. Pearce, A. Amer, T.J. Maher, A. Ally, *Brain Res.* 922 (2001) 234–242.
- [137] M. Rydh-Rinder, N. Kerekes, M. Svensson, T. Hökfelt, *Regul. Pept.* 102 (2001) 69–79.
- [138] Z.-B. You, Y.-Q. Chen, R.A. Wise, *Neurosci.* 107 (2001) 629–639.
- [139] K. Tominaga, A. Yamauchi, H. Shuto, M. Niizeki, K. Makino, R. Oishi, Y. Kataoka, *Eur. J. Pharmacol.* 430 (2001) 243–249.
- [140] T. Abe, H. Tohgi, T. Murata, C. Isobe, C. Sato, *Neurosci. Lett.* 312 (2001) 177–179.
- [141] B.-M. Chen, L.-W. Xia, S.-X. Liang, G.-H. Chen, F.-L. Deng, W.-R. Zhang, L.-J. Tao, *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 223–227.
- [142] M.G. Giovannini, A. Rakovska, R.S. Benton, M. Pazzagli, L. Bianchi, G. Pepeu, *Neurosci.* 106 (2001) 43–53.
- [143] A. Laufente, E. Fernández-Rey, R. Seara, M. Pérez-Lorenzo, A.I. Esquifino, *Neurochem. Int.* 39 (2001) 187–192.
- [144] R. Kurita, H. Tabei, K. Hayashi, T. Horiuchi, K. Torimitsu, O. Niwa, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 165–174.
- [145] A.B.P. Van Kuilenburg, A.E.M. Stroomer, G.J. Peters, A.H. Van Gennip, *J. Chromatogr. B* 759 (2001) 51–61.
- [146] G. Galaverna, R. Corradini, F. Dallavalle, G. Folesani, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 151–163.
- [147] B. Eppler, R. Dawson Jr., *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 29–39.
- [148] M. Sugahara, S. Asai, H. Zhao, T. Nagata, T. Kunimatsu, Y. Ishii, T. Kohno, K. Ishikawa, *Neurochem. Int.* 39 (2001) 65–73.
- [149] M. W. Fleck, G. Barrionuevo, A.M. Palmer, *Neurochem. Int.* 39 (2001) 75–81.
- [150] C. Birago, E. Marchei, R. Pennino, L. Valvo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 759–765.
- [151] M. Zielińska, W. Hilgier, H.D. Borkowska, S.S. Oja, P. Saransaari, J. Albrecht, *Brain Res.* 904 (2001) 173–176.
- [152] T.P. Piepponen, A. Skujins, *J. Chromatogr. B* 757, 2001, 277–283.
- [153] J.-L. Mau, H.-C. Lin, J.-T. Ma, S.-F. Song, *Food Chem.* 73 (2001) 461–466.
- [154] P. Zanolì, G. Cannazza, M. Baraldi, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 235–238.

- [155] P. Chaiyakul, D. Reidman, L. Pilipovic, T. Maher, A. Ally, *Brain Res.* 900 (2001) 186–194.
- [156] Y.V. Teherkas, L.A. Kartsova, I.N. Krasnova, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 303–308.
- [157] Y.V. Teherkas, A.D. Denisenko, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 309–313.
- [158] P.-S. Tsai, J.-K. Cheng, M. Marsala, C.-R. Lin, G.-H. Wen, L. Ch. Yang, *Neurosci. Lett.* 301 (2001) 115–118.
- [159] A. Nakabachi, H. Ishikawa, *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31 (2001) 491–496.
- [160] J.-H. Yang, H.-C. Lin, J.-L. Mau, *Food Chem.* 72 (2001) 465–471.
- [161] J. A. Bourne, P. Fosbraey, J. Haliday, *Eur. J. Pharmacol.* 413 (2001) 189–198.
- [162] J. Mühling, A. Sablotzki, M. Fuchs, M. Krüll, M.G. Dehne, S. Weiss, J. Gonter, D. Quandt, G. Hempelmann, *J. Nutr. Biochem.* 12 (2001) 46–54.
- [163] J.-L. Mau, H.-C. Lin, C.-C. Chen, *Food Res. Int.* 34 (2001) 521–526.
- [164] C. Wallin, M. Puka-Sundwall, H. Hagberg, S.G. Weber, M. Sandberg, *Dev. Brain Res.* 125, 2000, 51–60.
- [165] N. Llorens, L. Arola, C. Bladé, A. Mas, *Plant Sci.* 160 (2000) 159–163.
- [166] H. Ooboshi, S. Ibayashi, K. Takano, S. Sadoshima, A. Kondo, H. Uchimura, M. Fujishima, *Brain Res.* 884 (2000) 23–30.
- [167] E. Masoero, P. Frattini, L. Favalli, A. Rozza, R. Scelsi, S. Govoni, *Alcohol* 22 (2000) 173–177.
- [168] N. O. Dalby, *Neuropharm.* 39 (2000) 2399–2407.
- [169] B. Washington, J. B. Shaw, J. Li, B. Fisher, J. Gwathmey, *Eur. J. Pharm.* 407 (2000) 117–122.
- [170] M.-J. Yoo, R. V. Searles, J.-R. He, W.-B. Shen, D.R. Grattan, M. Selmanoff, *Brain Res.* 878 (2000) 1–10.
- [171] R.V. Searles, M.-J. Yoo, J.-R. He, W.-B. Shen, M. Selmanoff, *Brain Res.* 878 (2000) 11–19.
- [172] J. Borycz, M. Vohra, G. Tokarczyk, I. A. Meinertzhagen, *J. Neurosci. Methods* 101 (2000) 141–148.
- [173] K. Igarashi, Y. Sugiyama, F. Kasuya, H. Inoue, R. Matoba, N. Castagnoli, *J. Chromatogr. B* 746 (2000) 33–40.
- [174] E. Quertemont, F. Lallemant, G. Colombo, P. De Witte, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10, 2000, 377–383.
- [175] T. Ishide, Y. Hara, T. J. Maher, A. Ally, *Brain Res.* 874 (2000) 107–115.
- [176] E.M. Siaghy, Y. Deveaux, H. Schroeder, N. Sfaksi, D. Ungureanu-Longrois, F. Zannad, J.P. Nabet, P.M. Mertes, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 279–286.
- [177] Y. Matsuda, T. Fujita, T. Hada, K. Higashino, *Hepatology Res.* 18 (2000) 132–140.
- [178] K. A. Kékesi, N. Szilágyi, G. Nyitrai, Á. Dobolyi, N. Skuban, J. Kardos, *Neurochem. Int.* 37 (2000) 171–178.
- [179] D. Fekkes, A. Voskuilen-Kooyman, R. Janike, J. Huijmans, *J. Chromatogr. B* 744 (2000) 183–188.
- [180] A. Landén, P.O.J. Hall, *Mar. Chem.* 71 (2000) 53–68.
- [181] F.R. Conde, M.S. Churio, C.M. Previtali, *J. Photochem. Photobiol. B* 56 (2000) 139–144.
- [182] J. Pi, Y. Kumagai, G. Sun, N. Shimojo, *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 199–203.
- [183] T. Numakawa, N. Takei, H. Hatanaka, *Neurosci. Res.* 37 (2000) 59–65.
- [184] N. S. Butters, M.A.S. Gibson, J.N. Reynolds, J.F. Brien, *Alcohol* 21 (2000) 1–9.
- [185] D. Spassova, T. White, A.K. Singh, *Comp. Biochem. Physiol. C* 126 (2000) 79–89.
- [186] E. Morillo, T. Unadbeytia, C. Maqueda, A. Ramos, *Chemosphere* 40 (2000) 103–107.
- [187] T. Ishide, M. Mancini, T.J. Maher, P. Chayaikul, A. Ally, *Brain Res.* 865 (2000) 177–185.
- [188] M.F. Olive, K.K. Mehmert, C.W. Hodge, *Brain Res. Protocols* 5 (2000) 16–24.
- [189] D.A. Reidman, T.J. Maher, P.- Chayaikul, A. Ally, *Neurosci. Res.* 36 (2000) 147–156.

- [190] A. Dachour, P. De Witte, *Pharmacol., Biochem. Behav.* 65 (2000) 345–350.
- [191] M. Sitges, V. Nekrassov, A. Guarneros, *Brain Res.* 854 (2000) 48–56.
- [192] G.D. Kramer, C. Pausz, G.J. Herndl, *Deep Sea Res.* 52 (2005) 85–97.
- [193] Y. Inaba, S. Tokishita, N. Hamada-Sato, T. Kobayashi, C. Imada, H. Yamagata, E. Watanabe, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 833–840.
- [194] Y. Takano, T. Horiuchi, K. Marumo, M. Nakashima, T. Urabe, K. Kobayashi, *Org. Geochem.* 35 (2004) 1105–1120.
- [195] T. Horiuchi, Y. Takano, J.-I. Ishibashi, K. Marumo, T. Urabe, K. Kobayashi, *Org. Geochem.* 35 (2004) 1121–1128.
- [196] Y.M. Martinez, C.M. Legua, P.C. Falcó, *Talanta* 62 (2004) 373–382.
- [197] V. Concha-Herrera, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 191–197.
- [198] T. Sonke, B. Kaptein, A.F.V. Wagner, P.J.L.M. Quaedflieg, S. Schultz, S. Ernste, A. Schepers, J.H.M. Mommers, Q.B. Broxterman, *J. Mol. Catal. B* 29 (2004) 265–277.
- [199] S. Hess, K. r. Gustafson, D. J. Milanowski, E. Alvira, M. A. Lipton, L. K. Pannell, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 211–219.
- [200] M. Xia, Y. Liu, D.J. Figueroa, C.-S. Chiu, N. Wei, A.-M. Lawlor, P. Lu, C. Sur, K.S. Koblan, T.M. Connolly, *Mol. Brain Res.* 125 (2004) 96–104.
- [201] D.P. Glavin, G. Matrajt, J.L. Bada, *Adv. Space Res.* 33 (2004) 106–113.
- [202] Y. Takano, K. Kobayashi, T. Yamanaka, K. Marumo, T. Urabe, *Earth Planet. Sci. Lett.* 219 (2004) 147–153.
- [203] Z. Chen, W. Huang, S.R. Srinivas, C.R. Jones, V. Ganapathy, P.D. Prasad, *J. Soc. Gynecol. Invest.* 11 (2004) 294–303.
- [204] K. Kobayashi, Y. Takano, H. Masuda, H. Tonishi, T. Kaneko, H. Hashimoto, T. Saito, *Adv. Space Res.* 33 (2004) 1277–1281.
- [205] N.O.G. Jørgensen, R. Stepanaukas, A.-G.U. Pedersen, M. Hansen, O. Nybroe, *FEMS Microbiol. Ecol.* 46 (2003) 269–280.
- [206] W. Masuda, C. Nouse, C. Kitamura, M. Terashita, T. Noguchi, *Arch. Biochem. Biophys.* 420 (2003) 46–54.
- [207] Y. Takano, R. Sato, T. Kaneko, K. Kobayashi, K. Marumo, *Org. Geochem.* 34 (2003) 1491–1496.
- [208] T. Yamashita, M. Ashiuchi, K. Ohnishi, S.-I. Kato, S. Nagata, H. Misono, *J. Mol. Catal. B* 23 (2003) 213–222.
- [209] A. Watanabe, S. Yamaguchi, K. Urabe, Y. Asada, *J. Mol. Catal. B* 23 (2003) 379–387.
- [210] N. Nimura, T. Fujiwara, A. Watanabe, M. Sekine, T. Furuchi, M. Yohda, A. Yamagishi, T. Oshima, H. Homma, *Anal. Biochem.* 315 (2003) 262–269.
- [211] K. Shibata, T. Watanabe, H. Yoshikawa, K. Abe, S. Takahashi, Y. Kera, R.-H. Yamada, *Comp. Biochem. Physiol. B* 134 (2003) 713–719.
- [212] D.S. Kaufman, *Quaternary Sci. Rev.* 22 (2003) 899–914.
- [213] K. Shibata, T. Watanabe, H. Yoshikawa, K. Abe, S. Takahashi, Y. Kera, R.-H. Yamada, *Comp. Biochem. Physiol. B* 134 (2003) 307–314.
- [214] Y. Sadakane, T. Yamazaki, K. Nakagomi, T. Akizawa, N. Fujii, T. Tanimura, M. Kenda, Y. Hatanaka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1825–1833.
- [215] D.H. Baek, J.J. Song, S.-G. Lee, S.J. Kwon, Y. Asano, M.-H. Sung, *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 131–139.
- [216] A. Tarui, K. Shibata, S. Takahashi, Y. Kera, T. Munegumi, R.-H. Yamada, *Comp. Biochem. Physiol. B* 134, 2003, 79–87.
- [217] W. Masuda, C. Nouse, C. Kitamura, M. Terashita, T. Noguchi, *Arch. Oral Biol.* 47 (2002) 757–762.
- [218] N. Saha, S. Dutta, A. Bhattacharjee, *Comp. Biochem. Physiol. B* 133 (2002) 235–250.
- [219] H.-S. Bae, S.-P. Hong, S.-G. Lee, M.-S. Kwak, N. Esaki, M.-H. Sung, *J. Mol. Catal. B* 17 (2002) 223–233.

- [220] T. Fujimori, H. Abe, *Comp. Biochem. Physiol. A* 131 (2002) 893–900.
- [221] Y. Somekawa, K. Kobayashi, S. Tomura, T. Aso, H. Hamaguchi, *Fertility and Sterility* 77 (2002) 481–486.
- [222] M.J. Ruiz-Angel, R.D. Caballero, E.F. Simó-Alfonso, M.C. García-Alvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 31–45.
- [223] N. Fujii, S. Matsumoto, K. Hiroki, L. Takemoto, *Biochim. Biophys. Acta* 1549 (2001) 179–187.
- [224] P. Campíns-Falcó, C. Molins-Lagua, A. Sevillano-Cabeza, L.A.T. Genaro, *J. Chromatogr. B* 759 (2001) 285–297.
- [225] A. Morikawa, K. Hamase, T. Inoue, R. Konno, A. Niwa, K. Zaitso, *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 229–125.
- [226] G. D’Aniello, A. Tolino, G. Fisher, *J. Chromatogr. B* 753 (2001) 427–431.
- [227] N. G. W. Rose, M. A. Blaskovich, A. Wong, G. A. Lajoie, *Tetrahedron* 57 (2001) 1497–1507.
- [228] D. P. Glavin, M. Schubert, O. Botta, G. Kminek, J. L. Bada, *Earth Planet. Sci. Lett.* 185 (2001) 1–5.
- [229] D.J. Ager, T. Li, D.P. Pantaleone, R.F. Senkpeil, P.P. Taylor, I.G. Fotheringham, *J. Mol. Catal. B* 11 (2001) 199–205.
- [230] G. Sierra-Paredes, J. Galán-Valiente, M.D. Vazquez-Illanes, E. Aguilar-Veiga, G. Sierra-Marcuño, *Neurochem. Int.* 37 (2000) 377–386.
- [231] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 69–80.
- [232] T. Erbe, H. Brückner, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 81–91.
- [233] À. Martínez, J. Riu, O. Busto, J. Guasch, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 257–278.
- [234] G. Ravindran, W.L. Bryden, *Food Chem.* 89 (2005) 309–314.
- [235] P. Herbert, M.J. Cabrita, N. Ratola, O. Laureano, A. Alves, *J. Food Eng.* 66 (2005) 315–322.
- [236] E.L. Schwarz, W.L. Roberts, M. Pasquan, *Clin. Chim. Acta* 2004, on line available
- [237] A.G. Dervan, C.K. Meshul, M. Beales, G.J. McBean, C. Moore, S. Totterdell, A.K. Snyder, G.E. Meredith, *Exp. Neurol.* 190 (2004) 145–156.
- [238] T.A.C. Vermeij, P.M. Edelbroek, *J. Chromatogr. B* 810 (2004) 197–303.
- [239] P. Brust, G. Vorwieger, B. Walter, F. Füchtner, H. Stark, H. Kuwabara, M. Herzau, T. Opfermann, J. Steinbach, V. Ganapathy, R. Bauer, *Dev. Brain. Res.* 152 (2004) 241–253.
- [240] R.F. Vesali, M. Klaude, L. Thunblad, O.E. Rooyackers, J. Wernerman, *Metabolism* 53 (2004) 1076–1080.
- [241] S.-W. Yang, L. Xu, R. Mierzwa, L. He, J. Terracciano, M. Patel, V. Gullo, T. Black, W. Zhao, T.-M. Chan, M. Chu, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3333–3338.
- [242] S.J.M. Mdachi, M.H.H. Nkuya, V.A. Nyigo, I.T. Urasa, *Food Chem.* 86 (2004) 179–182.
- [243] C. Peyer, P. Bonay, E. Staudacher, *Biochim. Biophys. Acta* 1672 (2004) 27–35.
- [244] W.-Z. Zhang, D.M. Kaye, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 87–92.
- [245] K. Plankensteiner, A. Righi, B.M. Rode, R. Gargallo, J. Jaumot, R. Tauler, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 649–656.
- [246] M. Nemati, M.R. Oveisi, H. Abdollahi, O. Sabzevari, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 485–492.
- [247] X. Yi, X. Sun, Y. Zhang, *Process Biochem.* 39 (2004) 1817–1823.
- [248] U. Friess, M. Waldner, H.-G. Wahl, R. Lehmann, H.-U. Haring, W. Voelter, E. Schleicher, *J. Chromatogr. B* 794 (2003) 273–280.
- [249] C. Chassagnole, A. Diano, F. Létisse, N.D. Lindley, *J. Biotechnol.* 104 (2003) 261–272.
- [250] J.K. Mugula, T. Sørhaug, L. Stepaniak, *Int. J. Food Microbiol.* 84 (2003) 1–12.

- [251] M. Jansen, J.H. Veurink, G.-J. W. Euverink, L. Dijkhuizen, *FEMS Yeast Res.* 3 (2003) 313–318.
- [252] T. Koga, S. Kozaki, M. Takahashi, *Brain Res.* 952 (2002) 282–289.
- [253] J.C. Tapia, G.Z. Mentis, R. Navarrate, F. Nualart, E. Figueroa, A. Sánchez, L.G. Aguayo, *Neuroscience* 108 (2001) 493–506.
- [254] C. Gafan, J. Wilson, L.C. Berger, B.J. Berger, *Mol. Biochem. Parasitol.* 118 (2001) 1–10.
- [255] M. Edelenbos, H. Hilmer, Sørensen, M. Cantwell, *Postharvest Biol. Technol.* 22 (2001) 227–237.
- [256] F. Mauler, T. Fahrig, E. Horváth, R. Jork, *Brain Res.* 888 (2001) 150–157.
- [257] A. Buerlert, M. Moser, A.K. Kumar, P. Fürst, K. Becker, *Field Crops Res.* 69 (2001) 1–11.
- [258] G.B. Acosta, *Comp. Biochem. Physiol.* 128 (2001) 11–17.
- [259] U. Werner, K. Brune, B. Layh, H. Guehring, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 35–40
- [260] N.B. Saulskaya, N.A. Soloviova, *J. Neurosci. Methods* 140 (2004) 15–21.
- [261] K. Ishiwari, S. Mingote, M. Correa, J.T. Trevitt, B.B. Carlson, J.D. Salamone, *J. Neurosci. Methods* 140 (2004) 39–46.
- [262] T.L. Li, F. Qadri, A. Moser, *Neurosci. Lett.* 371 (2004) 117–121.
- [263] W. Peinado, J.C. González, M.L. Leret, *Toxicology* 204 (2004) 155–160.
- [264] P. Maciejak, A.I. Członkowska, A. Bidziński, J. Walkowiak, J. Szyndler, M. Lehner, A. Skórzewska, D. Turzyńska, M. Zienowicz, A. Wisłowska, E. Taracha, P. Krzśa, A. Płaźnik, *Pharmacol., Biochem. Behav.* 78 (2004) 781–786.
- [265] P.G. Yan, C.F. Wu, M. Huang, W. Liu, *Toxicol. Lett.* 145 (2003) 69–78.
- [266] M. Correa, S. Mingote, A. Betz, A. Wisniecki, J. D. Salamone, *Neurosci.* 119 (2003) 759–766.
- [267] A. Kovács, A. Mihály, Á. Komáromi, E. Gyengési, M. Szenté, R. Weiczner, B. Krisztin-Péva, Gy. Szabó, Gy. Telegdy, *Epilepsy Res.* 55 (2003) 117–129.
- [268] M.L. Leret, F. Garcia-Uceda, M.T. Antonio, *Brain Res. Bull.* 58 (2002) 469–473.
- [269] N.B. Saulskaya, M.O. Mikhailova, *Neuroscience* 112 (2002) 791–801.
- [270] R.H. Gwiazda, D. Lee, J. Sheridan, D.R. Smith, *NeuroToxicology* 23 (2002) 69–76.
- [271] R. Bongiovanni, B.K. Yamamoto, G.E. Jaskiw, *J. Chromatogr. B* 754 (2001) 369–376.
- [272] J.C. Dodge, A.M. Illig, P.J. Snyder, L.L. Badura, *Psychoneuroendocrinology* 25 (2000) 519–534.
- [273] Z. Preston, P.J. Richardson, R.D. Pinnock, K. Lee, *Neurosci. Lett.* 284 (2000) 89–92.
- [274] G. Chwatko, H. Jakubowski, *Anal. Biochem.* 337 (2005) 271–277.
- [275] M.M. Mahfouz, F.A. Kummerow, *The Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1919–1932.
- [276] I. Donnay, I. Faerge, C. Grøndal, B. Verhaeghe, H. Sayoud, N. Ponderato, C. Galli, G. Lazzari, *Theriogenology* 62 (2004) 1093–1107.
- [277] B. Gasparrini, H. Sayoud, G. Neglia, D.G. de Matos, I. Donnay, L. Zicarelli, *Theriogenology* 60 (2003) 943–952.
- [278] C. Januel, L.B. Fay, D. Ruggiero, M. Lagarde, E. Véricel, *Biochim. Biophys. Acta* 1620 (2003) 125–132.
- [279] S.J. Shin, *Nutr. Res.* 22 (2002) 1487–1495.
- [280] M. Previati, A. Raspadori, L. Bertolaso, A. Parmeggiani, D. Bindini, C. Vitali, I. Lanzoni, E. Corbacella, M. Saviano, F. Fagioli, G. Blo, S. Capitani, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 331–339.
- [281] Y. Mukai, T. Togawa, T. Suzuki, K. Ohata, S. Tanabe, *J. Chromatogr. B* 767 (2002) 263–268.
- [282] C. Cereser, S. Boget, P. Parvaz, A. Revol, *Toxicology* 163 (2001) 153–162.
- [283] C. Cereser, J. Guichard, J. Draï, E. Bannier, I. Garcia, S. Boget, P. Parvaz, A. Revol, *J. Chromatogr. B* 752 (2001) 123–132.

- [284] E. Rodríguez-Martín, M.J. Casarejos, E. Bazán, S. Canals, A.S. Herranz, M.A. Mena, *Neuropharmacology* 39 (2000) 2090–2100.
- [285] M.L.N.E. Dapkevicius, M.J.R. Nout, F.M. Rombouts, J.H. Houben, W. Wymenga, *Int. J. Food Microbiol.* 57 (2000) 107–114.
- [286] A. Massie, L. Cnops, I. Smolders, K. van Damme, E. Vandenbussche, F. Vandesinde, U.T. Eysel, L. Arckens, *Brain Res.* 976 (2003) 100–108.
- [287] F. Dufour, K.A. Nalecz, M.J. Nalecz, A. Nehlig, *Neurosci. Res.* 40 (2001) 255–263.
- [288] Y. Qu, Y.-M. Li, E. Vandenbussche, F. Vandesinde, L. Arckens, *Brain Res. Protocols* 7 (2001) 45–51.
- [289] J. Li, J.T. Potts, G.L. Kramer, F. Petty, J.H. Mitchell, *Brain Res.* 894 (2001) 249–254.
- [290] D.C. Rigge, M.F. Jones, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 1251–1256.
- [291] H.-P. Li, J.-H. Li, G.-C. Li, J.-F. Jen, *Talanta* 63 (2004) 547–553.
- [292] R.M. Barros, C.I. Extremina, I.C. Gonçalves, B.O. Braga, V.M. Balcão, F.X. Malcata, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 908–916.
- [293] F. Xu, T. Byun, H.-J. Dussen, K.R. Duke, *J. Biotechnol.* 101 (2003) 89–96.
- [294] J. Nyberg, J. Csapó, A. Malmgren, A. Winter, *Organic. Geochem.* 32 (2002) 623–632.
- [295] I. Molnár-Perl, A. Vasanits, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 73–91.
- [296] A. Vasanits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 271–287.
- [297] D. Kutlán, I. Molnár-Perl, *Chromatographia* 53 (2001) 188–198.
- [298] D. Kutlán, P. Presits, I. Molnár-Perl, (Review) *J Chromatogr. A* 949 (2002) 235–248.
- [299] Y. Mengerink, D. Kutlán, F. Tóth, A. Csámpai, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 99–124.
- [300] R. Hanczkó, I. Molnár-Perl, *Chromatographia* 57 (2003) S103–S113.
- [301] R. Hanczkó, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 51–66.
- [302] A. Csámpai, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 67–78.
- [303] R. Hanczkó, Á. Kőrös, F. Tóth, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 210–222.
- [304] G. Lunn, L.C. Hellwig, Editors, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC* (1998) J.Wiley & Sons, Amino Acid fejezet: 625–821.
- [305] I. Molnár-Perl, Amino Acids, in *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Z. Deyl et al, editors, Elsevier Science (1998) 416–464.
- [306] I. Molnár-Perl, HPLC of Amino Acids as o-Phthalaldehyde Derivatives, in *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, I. Molnár-Perl, editor, *J. Chromatogr. Library*, Vol. 70, (2005) 163–198.
- [307] J.D.H. Cooper, G. Ogden, J. McIntosh, D.C. Turnell, *Anal. Biochem.* 142 (1984) 98–102.
- [308] G.L. Lookhart, B.L. Jones, *Cereal. Chem.* 62 (1985) 97–102.
- [309] H.W. Jarret, K.D. Cooksy, B. Ellis, J.M. Anderson, *Anal. Biochem.* 153 (1986) 189–198.
- [310] H.S. Sista, *J. Chromatogr.* 359 (1986) 231–240.
- [311] T.A. Durkin, G.M. Anderson, D.J. Cohen, *J. Chromatogr.* 428 (1988) 9–15.
- [312] J. Kehr, U. Ungerstedt, *J. Neurochem.* 51 (1988) 1308–1310.
- [313] O. Orwar, S. Folestad, S. Einarsson, P. Andiné, M. Sandberg, *J. Chromatogr.* 566 (1991) 39–55.
- [314] B.W. Boyd, R.T. Kennedy, *Analyst*, 123 (1998) 2119–2124.
- [315] A.M. Uhe, G.R. Collier, E.A. McLennan, D.J. Tucker, K. O’Dea, *J. Chromatogr.* 564 (1991) 81–91.
- [316] N.M.H. van Eijk, D.R. Rooyackers, N.E.P. Deutz, *J. Chromatogr.* 620 (1993) 143–148.
- [317] I. Molnár-Perl (Review), *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 291–309.
- [318] D. Kutlán, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 311–322.
- [319] I. Molnár-Perl, I. Bozor, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 37–46.

- [320] J. Csapó, G. Pohn, É Varga-Visi, Zs. Csapó-Kiss, É. Terlaky-Balla, *Chromatographia* 60 (2004) S231–S234.
- [321] G. Lunn, L. C. Hellwig, Editors, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC* (1998) J.Wiley & Sons, Amino Acid fejezet, 625.
- [322] S.S. Simons, D.F. Johnson, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2886–2891.
- [323] T. Törő, Cs. Ágoston, I. Molnár-Perl, *Chromatographia* 60 (2004) S153–S159.
- [324] H.M.H. van Eijk, D.R. Rooyackers, N.E.P. Deutz, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 115.
- [325] R. Schuster, *J. Chromatogr.* 431 (1988) 271.

12. Az értekezés anyagából készült közlemények, poszterek és szakmai előadások

12.1. Közlemények:

-az eddig megjelent közlemények:

- (1) R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: „Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthaldialdehyde Amino Acid and Amine Derivatives: o-Phthaldialdehyde/2-Mercaptoethanol Reagent”, Chromatographia, Supplement Vol. 57 (2003) S-103–S-113.
- (2) R. Hanczkó, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl: „Behavior and characteristics of the o-phthaldialdehyde derivatives of n-C6-C8 amines and Phenylethylamines with four additive SH-containing reagents”, R., J. Chromatogr. A, 1031 (2004) 51–66.
- (3) R. Hanczkó, Á. Körös, F. Tóth, I. Molnár-Perl: „Behavior and characteristics of biogenic amines, ornithine and lysine derivatized with the o-phthalaldehyde-ethanethiol-fluorenylmethyl chloroformate reagent”, J. Chromatogr. A, 1087 (2005) 210–222.

-a doktori értekezés beadásakor előkészületben lévő közlemény:

- (4) R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: „Characteristics and stability of amino acids and C1-C5 aliphatic amines as their o-phthalaldehyde/ethanethiol derivatives”, J. Chromatogr. A, előkészületben

12.2. Konferencia poszterek és absztraktok

- R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthaldialdehyde Amino Acid and Amine Derivatives: o-Phthaldialdehyde/2-Mercaptoethanol Reagent (**poszter**: 2002 – 24th International Symposium on Chromatography, Lipcse, Németország; Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Lillafüred)
- Hanczkó R., Perlné Dr. Molnár I.: Aminosavak és aminok o-ftálaldehid származékainak stabilitása és jellemzése: eltérő SH-csoportú segédanyagok jelenlétében (**poszter**: 2003 – Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII., Budapest)
- R. Hanczkó, D. Kutlán, Y. Mengerink, A. Csámpai, F. Tóth, T. Törő, I. Molnár-Perl: The Role of the SH-Group Containing Additive in the Stability and Characteristics of the o-Phthalaldehyde Derivatives of Amino Acids and Amines (**poszter**: 2003 – 27th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Nizza, Franciaország)
- R. Hanczkó, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl: Behavior and characteristics of the o-phthaldialdehyde derivatives of n-C6-C8 amines and Phenylethylamines with four additive SH-containing reagents (**poszter**: 2003 – 27th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Nizza, Franciaország)
- R. Hanczkó, A. Perl, I. Molnár-Perl: Optimum Conditions for the o-Phthalaldehyde Derivatization of the Primary AminoGroup-containing Compounds in Biological Tissues (**poszter**: 2003 – 5th Balaton Symposium on Hig-Performance Separation Methods, Siófok)
- R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: Comparison of the Stability and Characteristics of the o-Phthalaldehyde/Ethanethiol and o-Phthalaldehyde/2-mercaptoethanol Derivatives of

Amino Acids and Amines (**absztrakt:** 2003 – 5th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods, Siófok)

- R. Hanczkó, A. Perl, I. Molnár-Perl: *Optimum Conditions for the o-Phthalaldehyde Derivatization of the Primary Amino Group-containing Compounds in Biological Tissues*, (**poszter:** 2004 – 28th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Philadelphia, Pennsylvania, USA)
- R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: *Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthalaldehyde Amino Acid and Amine Derivatives: o-Phthalaldehyde/Ethanethiol Reagent* (**absztrakt:** 25th International Symposium on Chromatography, Párizs, Franciaország)
- R. Hanczkó, Á. Körös, I. Molnár-Perl: *Characteristics and stability of amino acids and C1-C5 aliphatic amines as their o-phthalaldehyde/ethanethiol derivatives* (**poszter:** 2005 – 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Stockholm, Svédország)

12.3. Szakmai előadások

- Hanczkó R., Perlné Dr. Molnár I.: *Primer aminocsoportot tartalmazó vegyületek o-ftálaldehyddel, 2-merkaptóetanol jelenlétében keletkező származékainak stabilitásvizsgálata: HPLC-vel, egyidejű ultraibolya és fluoreszcenciás detektálással* (2003 – OTDK, Budapest)
- Hanczkó R., Perlné Dr. Molnár I.: *Primer aminocsoportot tartalmazó vegyületek o-ftálaldehyddel, 2-merkaptóetanol és etántiol jelenlétében keletkező származékainak stabilitásvizsgálata HPLC-vel, egyidejű ultraibolya és fluoreszcenciás detektálással* (2003 – Magyar Kémikusok Egyesülete, Fiatal Analitikusok Előadási Napja)
- R. Hanczkó, Á. Körös, F. Tóth, I. Molnár-Perl: *Behavior and characteristics of biogenic amines, ornithine and lysine derivatized with the o-phthalaldehyde-ethanethiol-fluorenylmethyl chloroformate reagent* (2004 – 25th International Symposium on Chromatography, Párizs, Franciaország)