

Kutlán Diana

Az aminosavak és aminok kölcsönhatása orto-ftálaldehiddel. A termékek stabilitása, a reakció mechanizmusa és analitikája

Doktori értekezés

**ELTE-TTK Kémia Doktori Iskola
vezető: Inzelt György, D.Sc., egy. tanár**

**Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia
programvezető: Zárai Gyula D.Sc., egy. tanár**

**témavezető:
Perlné-Molnár Ibolya, D.Sc., egy. tanár**

ELTE Analitikai és Szervetlen Kémiai Tanszék

2006

ELŐSZÓ

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori értekezésemet az ELTE Analitikai és Szervetlen Kémiai Tanszékén készítettem. Témavezetőm Perlné-Molnár Ibolya egy. tanár volt, aki a HPLC-s munkákat irányította. Fogadja érte hálás köszönetemet.

Köszönettel tartozom Dr. Orbán Miklós tanszékvezető egy. tanárnak, hogy munkám számára lehetőséget biztosított, és tevékenységemet figyelemmel kísérte.

Köszönöm azt a segítséget, amelyet Dr. Tóth Ferenc (Növény és Talajvédelmi Kutatóintézet, Budapest) és Dr. Ynze Mengerink (DSM, The Netherlands, Kutatóintézet) nyújtottak a HPLC-MS vizsgálatok elvégzésében.

Köszönöm az ELTE Kémiai Doktori Iskolájának (vezető: Dr. Inzelt György, egy. tanár), hogy ösztöndíj biztosításával munkám elvégzését lehetővé tette. A kísérleti munkát az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) pályázatok odaítélése útján támogatta.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- [1] A. Vasanits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl: Retention/quantitation properties of the *o*-phthaldialdehyde-3-mercaptopropionic acid and the *o*-phthaldialdehyde-*N*-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 870, 271 (2000)
- [2] D. Kutlán, Molnár-Perl. Characteristics and stability of the OPA/3-mercaptopropionic acid and OPA/*N*-acetyl-L-cysteine derivatives of amino acids. Chromatographia, 53, 1 (2001)
- [3] Y. Mengerink, F. Tóth, D. Kutlán, I. Molnár-Perl: Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the *o*-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-L-cysteine reagents high-performance liquid chromatography-mass spectrometry study, J. Chromatogr. A, 949, 99 (2002)
- [4] D. Kutlán, P. Presits, I. Molnár-Perl: Behavior and characteristics of amine derivative obtained with *o*-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-L-cysteine reagents, J. Chromatogr. A, 949, 235 (2002)
- [5] R. Hanczkó, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl: Behavior and characteristics of *o*-phthaldialdehyde derivatives of *n*-C₆-C₈ amines and phenylethylamine with four additive SH-containing reagents, J. Chromatogr. A, 949, 235 (2002)
- [6] D. Kutlán, I. Molnár-Perl: New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar, J. Chromatogr. A, 987, 311 (2003)
- [7] A. Csámpai, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl: *o*-Phthaldialdehyde derivatization of histidine: stoichiometry, stability and reaction mechanism, J. Chromatogr. A, 1031, 67 (2004)

TARTALOMJEGYZÉK

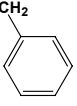
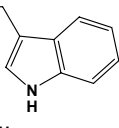
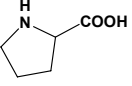
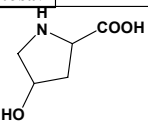
ELŐSZÓ	1
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	1
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK	2
TARTALOMJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	5
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. Az aminosavak és aminok kromatográfiás elemzései	9
3.1.1. Aminosavak és aminok meghatározása HPLC módszerrel	9
3.1.1.1. Származékképzés nélküli amin- és aminosavelemzés	10
3.1.1.2. Aminosavelemzés oszlop utáni származékképzéssel	11
3.1.1.3. Aminosavelemzés oszlop előtti származékképzéssel	13
3.1.2. Aminosavak meghatározása GC módszerrel	19
3.1.3. Aminosavak meghatározása kapilláris elektroforézissel (CE)	21
3.1.4. Aminosavak és aminok meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával (TLC)	23
3.1.5. Aminosavak és aminok meghatározása ioncserés folyadékkromatográfiával (IEC)	24
4. CÉLKITŰZÉS	25
4.1. Irodalmi adatok	25
5. A MÓDSZEREK LEÍRÁSA	26
5.1. A kísérletekhez felhasznált anyagok	26
5.2. A minták	26
5.3. Alkalmazott eszközök	26
5.3.1. A HPLC-UV-Fl rendszer	26
5.3.2. A HPLC-UV-MS rendszer	27
5.3.3. Az alkalmazott kromatográfiás oszlopok leírása	27
5.3.4. Egyéb alkalmazott készülékek	27
5.4. Standard oldatok	27
5.5. Puffer oldat	28
5.6. Reagens oldat	28
5.7. Származékkészítés	29
5.7.1. Származékképzés	29
5.7.2. A származékképző reagensok jellemzése és ellenőrzése	29
5.8. Detektálás	30
5.8.1. A HPLC-UV-Fl rendszer	30
5.8.2. A HPLC-UV-MS rendszer	30
5.9. Eluens rendszer	31
5.9.1. Az OPA/tiol-származékok bomlásának HPLC-s követésekor alkalmazott eluens rendszer	31
5.9.2. Az OPA/tiol-származékok HPLC-MS vizsgálatakor alkalmazott eluens rendszer	32

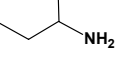
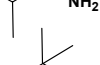
6. A KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA	35
6.1. Irodalmi előzmények	35
6.2. Modellvizsgálatok az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok képződési mechanizmusának tanulmányozására	38
6.2.1. A több származékot adó OPA/3-merkaptopropionsav (MPA) aminosavszármazék keletkezése és bomlása az idő függvényében	39
6.2.2. Az izoindol-aminosavak és az izoindol-aminok spektrális jellemzői	47
6.2.3. Az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok mennyiségi meghatározásának reprodukálhatósági vizsgálata	48
6.2.4. Az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok összehasonlító vizsgálata	50
6.2.5. Aminosavak OPA/MPA és OPA/NAC származékainak stabilitása eltérő pH értékű oldatokban	51
6.2.6. Az OPA/MPA és OPA/NAC reagensösszetétel változtatásának hatása a stabilitásra	55
6.2.7. OPA/tiol N- α -védett-L-lizin- és OPA/tiol N- ε -védett-L-lizin-származékok stabilitásának vizsgálata	60
6.3. Modellvizsgálatok az OPA/MPA~NAC/amin-származékok képződési mechanizmusának tanulmányozására	62
6.3.1. Az irodalomban leggyakrabban használt 1 : 3 OPA/tiol reagensarány alkalmazása az aminok esetében	62
6.3.2. Az általunk javasolt, megnövelt (1:10 és 1:50) OPA/tiol reagensarány alkalmazása az aminok esetében	63
6.3.3. Az általunk javasolt, megnövelt (1:50) OPA/tiol reagensarány alkalmazása a diaminok esetében	68
6.4. Az OPA/tiol/aminosav-származékok bomlástermékeinek szerkezete és keletkezésük mechanizmusa	70
6.4.1. Az aminosavak, ezek védett származékainak és az aminok HPLC vizsgálatából levonható következtetések	70
6.4.2. Az aminosavak és aminok OPA/tiol-származékainak és átalakult termékeinek HPLC-MS vizsgálata	71
6.4.3. Az NH ₂ -CH ₂ csoportot tartalmazó aminosavak és az aminok OPA/tiol-származékai átalakulásának mechanizmusa	73
6.5. Modell vizsgálatok az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok HPLC feltételeinek optimalizálására	75
6.5.1. Irodalmi előzmények	75
6.5.2. Módszerfejlesztés az optimális gradiens program kidolgozására	76
6.6. Vizsgált sör és borminták amin- és aminosavtartalmának meghatározása OPA/MPA~NAC/aminosav-származékként (3. MÓDSZER)	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	87
7.1. Célkitűzések és vizsgálati módszerek	87
7.2. Az értekezésben foglalt új tudományos eredmények	88
7.3. Az eredmények gyakorlati alkalmazása	90
8. IRODALOMJEGYZÉK	91
8.1. Az értekezés alapját képző publikációk	91
8.2. Irodalmi idézetek	91
8.3. Konferencia absztraktok	98
9. FÜGGELÉK	100

1. BEVEZETÉS

Az élő szervezet legfontosabb alkotóelemei a természetes aminosavak. Az aminosavak nemcsak a fehérjék és peptidek építőelemei, hanem az alapvető biológiai és biokémiai folyamatokban is részt vesznek [8,9]. Fontos szerepük van a nitrogén-anyagcserében és a nitrogén raktározásában. A számos aminosav közül 20 ill. 21 vegyületet tartanak számon, mint alapvető építőelemeket, de ezeken kívül még számos élő szervezetből izolált természetes aminosav létezik (béta-aminosavak, ornitin, hidroxiprolin, stb.) (**1A. ábra**). Érthető az igény az aminosavak kvalitatív és kvantitatív elemzésére, ezáltal ugyanis lehetőség nyílik a peptidek és fehérjék aminosav-összetételének megállapítására, mégpedig sósavas vagy enzimes hidrolízist követően a kromatográfiás módszer alkalmazása útján. Ezzel párhuzamosan az egyes biokémiai folyamatok vizsgálatát, illetve különféle anyagcsere-folyamatok zavarának kimutatása szintén lehetővé válik. Igen fontos szerepet játszanak még az aminosavak lebomlási termékei, az abiogén illetve biogén aminok (**1B. ábra**), amelyek elsősorban a borok, szőlők és sörök minőségét határozzák meg. Érthető tehát, hogy az aminosavak és aminok gáz- [10] és ioncsere- (IEC) [11] kromatográfiás elemzését már korán megoldották.

Kutatócsoportunkban egyaránt foglalkoznak mind a fehérjehidrolízis termékeinek, mind a szabad aminosavak és az aminok elemzésével. A származékképzés optimális feltételeinek kutatása jelenleg is folyik a Tanszéken. Doktori munkám során a folyadékkromatográfiás (HPLC) származékképzések egyik fajtájának (OPA/MPA és OPA/NAC) optimalizálásával foglalkoztam, majd az optimált módszer alkalmazhatóságát mutattam be.

A: Természetes aminosavak		
Glicin = Gly —H	Fenilalanin = Phe —CH ₂ 	Szerin = Ser —CH ₂ OH
Alanin = Ala —CH ₃		Threonin = Thr —CH(OH)CH ₃
Valin = Val —CH(CH ₃) ₂	Triptofán = Trp 	Aszparagin = Asn —CH ₂ CONH ₂
Leucin = Leu —CH ₂ CH(CH ₃) ₂		Glutamin = Gln —CH ₂ CH ₂ CONH ₂
Isoleucin = Ile —CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	Prolin = Pro 	Cisztein = Cys —CH ₂ SH
Metionin = Met —CH ₂ CH ₂ SH		Tirozin = Tyr —CH ₂ CH ₂ CH(OH)C ₆ H ₄ OH
Apoláros aminosavak		Poláros aminosavak
H₂N COOH R		Aszparaginsav = Asp —CH₂COOH Glutaminsav = Glu —CH₂CH₂COOH Savas aminosavak Lizin = Lys —CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂ Arginin = Arg —CH₂CH₂CH₂NHCONH₂ Hisztidin = His —CH₂CH₂Imidazole Bázisos aminosavak
Nem természetes aminosav		
Hydroxi-Prolin = ProOH 	γ-aminovajsav = GABA HOOCCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	Ornitin = Orn —CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
		β-alanin HOOCCH ₂ CH ₂ NH ₂

B: Biogén aminok		
n-C₁-C₅ Aminok H—(H ₂ C) _n —NH ₂ Metilamin —NH ₂ Etilamin —CH ₂ CH ₂ NH ₂ Propilamin —CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ Butilamin —CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ Pentilamin —CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	elágazó-C₁-C₅ Aminok izo-Propilamin  izo-Butilamin  szek.-Butilamin  terc.-Butilamin 	Biogén Aminok Agmatin H ₂ N—(CH ₂) ₄ —NHCONH ₂ Tiramin HO—C ₆ H ₄ —CH ₂ CH ₂ NH ₂ Spermin H ₂ N—(CH ₂) ₄ —N—(CH ₂) ₄ —N—(CH ₂) ₄ —NH ₂ Spermidin H ₂ N—(CH ₂) ₄ —N—(CH ₂) ₄ —N—(CH ₂) ₄ —N—(CH ₂) ₄ —NH ₂ Putreszcin H ₂ N—(CH ₂) ₃ —NH ₂ Kadaverin H ₂ N—(CH ₂) ₅ —NH ₂
Egyéb Aminok Etanolamin HO—CH ₂ CH ₂ NH ₂ Bisz(hexametilén)triamin H ₂ N—(CH ₂) ₆ —NH—(CH ₂) ₆ —NH ₂	Egyéb n-C₂-C₅ Diaminok H ₂ N—(H ₂ C) _n —NH ₂	

1. ábra. A: Természetes és nem természetes aminosavak csoportosítása; B: Biológiai-
lag fontos aminok csoportosítása

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

GC	gázkromatográfia
IEC	ioncserés kromatográfia
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
TLC	vékonyréteg-kromatográfia
HPTLC	nagy hatékonyságú vékonyréteg-kromatográfia
FID	lángionizációs detektor
EC	elektronbefogási detektor
TMS	trimetilszilil
TBDMS	<i>tert</i> -butil-dimetilszilil
MS	tömegspektrometria
LC	folyadékkromatográfia
RP	fordított fázis
RP-IP-HPLC	fordított fázisú ionpár-kromatográfia
NP-HPLC	normál fázisú folyadékkromatográfia
PAD	pulzáló amperometriás detektor
ELSD	gőzfázisú fényszórásdetektor
CLND	kemilumineszcens nitrogéndetektor
MS-MS	tandem tömegspektrometria
OPA	<i>orto</i> -ftáldialdehid
NBD-F	4-fluor-7-nitrobenzofurazán
UV	ultraibolya detektor
Fl	fluoreszcenciás detektor
DABZYL-Cl	[4-(dimetilamino)-azobenzol-4-szulfonil]-klorid
DANZYL-Cl	[5-(dimetil-amino)-naftalin-1-szulfonil]-klorid
AQC	[6-amino-kinolin]- <i>N</i> -(hidroxí-szukcinimidil)- karbamát
PITC	fenil-izotiocianát
FMOC-Cl	(9-fluorenil)-metil-klórformiát
γ -CD	γ -ciklodextrin
PTH	feniltiohidantoin
MCE	2-merkaptó-etanol; [2-szulfaniletán-1-ol]

MPA	3-merkaptó-propionsav [3-szulfanilpropánsav]
MAA	2-merkato ecetsav [2-szulfanilecetsav]
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cisztein
CE	kapilláris elektroforézis
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
MEKC	micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia
LIF	lézerindukált fluoreszcenciás detektor
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
GABA	γ -amino-vajsav [4-aminobutánsav]
ACPCA	1-aminociklopropán-1-karbonsav
IBLC	<i>N</i> -izobutiril-L-cisztein
IBDC	<i>N</i> -izobutiril-D-cisztein
THF	tetrahidrofurán
PDA	fotodiódasoros detektor
R.S.D.%	relatív standard deviáció %
MCP	3-merkaptó-propanol [3-szulfanilpropán-1-ol]
ET	etántiol
RR	válaszjelarány: a fluoreszcenciás intenzitás, a 334 vagy 338 nm-en mért UV tartományok aránya (Ex/Em)
TEA	trietyl-amin
LOD	kimutatási határ
BT	<i>tert</i> -butil-merkaptán [2-metilpropán-2-tiol]
AA	aminosav

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az irodalmi áttekintés során azon kromatográfiás módszereket mutatom be, amelyeket széles körben alkalmaznak aminosavak és aminok meghatározására különböző modell-oldataikban és mátrixaikban, különös tekintettel a borok és sörök szabad aminosav- és amintartalmának elemzésére.

3.1. Az aminosavak és aminok kromatográfiás elemzései

A természetes és mesterséges aminok és aminosavak kvalitatív és kvantitatív meghatározására napjainkban egyre nagyobb az igény. Egyrészt a modern biológiai és biokémiai alapkutatáshoz, másrészt az orvostudományban a pontos diagnózis felállításához nyújt nélkülözhetetlen segítséget. Újabban a környezetvédelmi és élelmiszeripari terület is előtérbe került. Külön érdemes kiemelni, hogy az aminok vizsgálatát még a bűnügyi vizsgálatok során is felhasználják a haláleset megállapítása céljából, ugyanis ezek a hullamérgeknek nevezett vegyületek a bomlás során keletkeznek. A kromatográfiás módszerek fejlődése tért nyitott a komplex, több komponensű biológiai minták aminosavai-
nak együttes és nagy pontosságú elemzésére. A királis módszerek alkalmazása továbbá lehetővé tette, hogy az aminosavak enantiomerarányát is meghatározzuk. Gyakorlatilag az összes, rutinszerűen alkalmazott kromatográfiás technikán megoldották az aminosavak és aminok elválasztását. A továbbiakban az egyes kromatográfiás módszereket és azok alkalmazását ismertetem az alkalmazás gyakoriságának sorrendjében.

3.1.1. Aminosavak és aminok meghatározása HPLC módszerrel

A folyadékkromatográfia (LC) szédületes fejlődése nagymértékben elősegítette az aminosavak és aminok minőségi és mennyiségi analizisét, mivel itt nem kell gázfázisba juttatni a vizsgálandó mintát. A nagyteljesítményű HPLC módszerek korlátlan lehetőséget adnak az analitikus kezébe, a számtalan univerzális és specifikus detektálási lehetőségekkel (VIS-UV, PDA, MS, törésmutató detektor, fényszórásos detektor, elektrokémiai detektor, stb.), az egyre bővülő kromatográfiás oszloptípusokkal, és a könnyen módosítható mozgófázis tulajdonságaival (pH, hőmérséklet, ionerősség, polaritás, stb.) szinte bármilyen feladat megoldható. A számtalan származékképzési eljárás tovább növeli a lehetőségek számát. A számítástechnika fejlődése lehetővé tette a gyors adatgyűjtést és

adatfeldolgozást, így akár a PDA detektor segítségével háromdimenziós (3D) kromatogrammok is megjeleníthetők.

Az aminosavak és aminok HPLC elemzésének három nagy területét különíthetjük el:

1. származékképzés nélküli elválasztások,
2. oszlop utáni származékképzés,
3. oszlop előtti származékképzés,

3.1.1.1. Származékképzés nélküli amin- és aminosavelemzés. Az utóbbi tizenöt évben számos olyan módszert dolgoztak ki, amelyek a sokszor bonyolult és időigényes származékképzési módszerek nélkül is működnek, ezzel elkerülve a reagens feleslege, illetve bomlása, vagy a minta egyéb komponenseivel alkotott vegyületek által okozott zavaró kromatográfias jeleket. Mivel az aminosavak nem tartalmazznak nagy hidrofób oldalláncokat, ezért fordított fázisú (RP) HPLC nem lehet hatékony, valamint további nehézséget okozhatnak az oldalláncok polaritásának és bázikusságának egymáshoz viszonyított nagymértékű eltérései. Ezen okok miatt a leggyakoribb elválasztási módszer az ioncserés folyadékkromatográfia (IEC) **(3.1.6. fejezet)** [12–14] és a fordított fázisú ionpárkromatográfia (RP-IP-HPLC) [15–23]. Normál fázisú folyadékkromatográfias (NP-HPLC) elválasztások kidolgozásában Schuster és munkatársai értek el jelentős eredményeket [24], azonban ezek a módszerek nem terjedtek el széles körben, mert az aminocsoporttal módosított szilikagél oszlopoknak kicsi szelektivitása, illetve – az oszlop öregedése során – a módosító réteg fokozatos leoldódása miatt a felbontás már nem reprodukálható.

Az aminosavak többsége – az aromás gyűrűvel rendelkező aminosavak kivételével (fenilalanin, triptofán, hisztidin, tirozin) – igen gyenge kromofor és nem fluoreszkál, ezért a származékkészítés nélküli analitikai módszerek esetében a rutin UV, illetve az FI detektálás nem megoldott. Az UV detektálás csak abban az esetben lehetséges, ha a 200 nm-es hullámhosszt használjuk, ebben az esetben azonban az alacsony hullámhossz miatt a kromatogram rendkívül zajos, a kimutatási határ alacsony, s a legnagyobb hátrány, hogy a detektálás nem szelektív. Egyes aminosavakra kidolgoztak számos, speciális detektálási módszert. A kéntartalmú vegyületek (cisztein, metionin) nagy érzékenységgű mennyiségi meghatározást lehetővé tevő, pulzáló amperometriás detektálása (PAD) kompatibilis mind az anionos [25,26] mind a kationos [27] ioncserés elválasztás után.

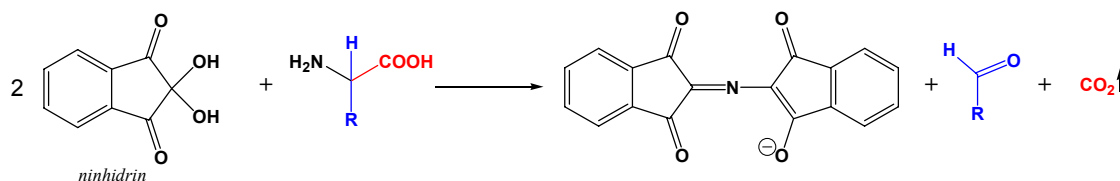
Az említetteken kívül, számos más univerzális detektort is kidolgoztak aminosavak és aminok kimutatására. A gőzfázisú fényszórási detektor (ELSD) [12–16], illetve

az MS detektor [17–20] alkalmazásával lehetőség nyílt az összes aminosav és amin érzékeny és szelektív detektálására, ebben az esetben azonban a kromatográfia során illekvény pufferek és ionpárképzőket kell alkalmazni. Ez utóbbi célra a perfluorkarbonsavak [15–21] bizonyultak a legmegfelelőbbnek, nagyobb szelektivitást biztosítanak ugyanis, mint a hagyományosan alkalmazott alkánszulfonsavak [22, 23], alacsony forráspontjuk pedig lehetővé teszi az ELSD, MS és a kemilumineszcens nitrogéndetektorok (CLND) [21] használatát is.

A származékkészítés nélküli aminosavmeghatározások nagy hátránya, hogy az RP-HPLC elválasztások nem igazán alkalmazhatóak, mert ilyen körülmények között a poláris aminosavak gyakorlatilag a t_0 -ban, azaz az oszlop holt térfogatával együtt eluálódnak. A lipofil oldalláncú aminosavak (kivéve pl. az izoleucin-leucin párt) egyszerű gradiens technikával is elválaszthatóak [13] RP-HPLC technikával. A számos próbálkozás ellenére, sem az oszlopkapcsolási technikák (RP és kationcserélő oszlop sorba kapcsolása, „column-switching” technika) [13], sem a kevert ágyas oszlopok (RP és kationcserélő töltetett tartalmazó oszlopok) [12] alkalmazása nem vezetett megoldásra. Az LC-MS technika alkalmazása esetén az MS detektor nyújtotta szelektív ionkövetés (SFI) el nem váló aminosavak esetében egyaránt lehetővé tette az a minőségi és a mennyiségi meghatározást [17]. A módszer érzékenységét tovább növelték a tandem tömegspektrometria (MS-MS) alkalmazásával [18].

3.1.1.2. Aminosavelemzés oszlop utáni származékképzéssel. Ahogy az előző fejezetben említettem, a származékképzés nélküli aminosavmeghatározás fő hátránya a detektálás érzéketlensége, ezért már viszonylag korán kidolgozták a kromatográfias elválasztás után történő származékkészítést, aminek fő célja a detektálás szelektivitásának és érzékenységének további növelése. Mint minden származékképzési módszernél, itt is a fő hátrány a kémiai reakció kivitelezéséhez szükséges speciális műszerezettség és az ehhez szükséges magasabb költségigény, a reagens oldatot ugyanis külön pumparendszerrel kell az oszlopról érkező eluenshez (eluátumhoz) reprodukálhatóan adagolni, amihez egy keverő berendezés és termosztálható reaktor is szükséges. Ezek a bonyolult szerkezetek jelentős csúcshéledést okozhatnak, ezért ezen egységek tervezésekor ügyelni kell az analitikai jel csúcshéledésének minimalizálására. E célból speciálisan csavart, csomózott (knotted) [28] vagy kötött (knitted) [29] csőreaktorokat alkalmaznak a származékképző szer, illetve az aminosav vagy az amin reakciójának megvalósítására.

Mivel az aminosavak elválasztását IEC alkalmazásával már viszonylag hamar megoldották, ezért az oszlop utáni származékképzést ennél a kromatográfiás módszer-nél alkalmazták először az aminosavak jelének intenzívebbé tétele érdekében, és ez a technika még ma is fontos szerepet játszik az elemzésekben. A **2. ábrán** látható, a Spackman és társai által kidolgozott ninhidrines módszerrel [30], illetve ennek tovább fejlesztett változataival, lényegesen nagyobb érzékenységet, gyorsabb elemzést és na-gyobb fokú automatizálást tettek lehetővé [31–33]. Növényi szövetekből 59 szabad aminosavat, illetve egyéb komponenst választottak el és határozták meg a Pickering-rendszer használatával [33]. Itt szeretném megjegyezni, hogy minden aminosav, az ol-dalláncától függetlenül, ugyanazt a terméket szolgáltatja (**2. ábra**), értelemszerűen a ninhidrin, mint reagens nem alkalmazható oszlop előtti származékképzésben.



2. ábra. A ninhidrin származékképző reagens reakciója aminosavakkal

Számos más kémiai reagenst is alkalmaztak az oszlop utáni származékképzésre, hogy tovább növeljék a detektálás érzékenységét. Először a fluoreszcens terméket szol-gáltató fluoreszkamin reagenst [34], majd az *orto*-ftáldialdehidet (OPA) és valamilyen tioltartalmú reagenst [35–37] alkalmazták a ninhidrin helyett [38] (lásd később, **3. áb-ra**). Az OPA/tiol reagens nem alkalmas az iminocsoportot tartalmazó prolin és hidroxi-prolin meghatározására. Igen érzékeny kimutatást lehet elérni a 4-fluor-7-nitrobenzofurazán (NBD-F) reagens alkalmazásával [39], amely mind az amino-, és iminosavakkal, mind az aminokkal intenzív fluoreszcens reakcióterméket szolgáltat.

3.1.1.3. Aminosavelemzés oszlop előtti származékképzéssel. Az oszlop utáni származékképzés számos, már említett hátránya miatt (rossz kromatográfiás tulajdonságok, nem teljes reakció, csúcsszélesedés, bonyolult berendezés) a HPLC módszerrel végzett aminosavelemzések körében az oszlop előtti származékképzés sokkal elterjedtebb. Alkalmazhatóságát tovább növeli a rendelkezésre álló származékképző szerek nagy száma és változatossága. A származékképző csoportok egyszerre hidrofóbok és kromoforok, így a poláris aminosavak esetében is kedvezően befolyásolják a retenciós tényezőket. Ennek következtében az elválasztáshoz fordított fázisú oszlopokat használhatunk, ami nagy hatékonyságnövekedést eredményez az elválasztásban, illetve a detektáláshoz a nagy érzékenységgű és általánosan használt, UV és Fl detektorokat alkalmazhatunk. A származékképző reagensok többnyire olyan termékekhez vezetnek, amelyek nemcsak kiváló kromoforok, hanem gyakran fluoreszcenciás tulajdonságaik is, így a kimutatási határt jelentősen csökkentik. A származékképző reagensok és módszerek nagy száma jelzi, hogy egyik származékképző reagens sem tökéletes, ezért minden feladat megoldásához tapasztalat, és megfelelő szaktudás szükséges, ami napjainkban is további kutatásokra ösztönöz.

Az ideális származékképző reagensnek a következő tulajdonságokkal kellene egyidejűleg rendelkeznie:

1. a reakció legyen gyors és kvantitatív, lehetőleg vizes közegben is alkalmazható legyen;
2. a képzett származék legyen stabil;
3. lehetőleg mind a primer, mind a szekunder aminosavakkal, illetve aminokkal reagáljon;
4. a reagens feleslege és esetleges mellékreakciói ne zavarják a kromatográfiás elválasztást;
5. lehetőleg minden aminosav-, közöttük a bázikus csoportot (lizin, hisztidin, ornitin) illetve, hidroxilcsoportot (tirozin) tartalmazó aminosavak is, csak egyféle, egy csúcsban eluálódó származéket adjon;
6. nagy érzékenységgű és szelektivitású, lehetőleg fluoreszkáló származéket képezzen;
7. a származékképzési eljárás lehetőleg automatizálható legyen;
8. a reagensoldatok és a képzett származékok sokáig stabilak maradjanak.

Az előzőlegben említett feltételek szerint elemeztük a leggyakrabban alkalmazott származékképző reagenseket (**1. táblázat** és **3. ábra**). Az irodalomban az 1992 és 2002 között megjelent összes közleményt feldolgoztuk és besoroltuk. Megállapítottuk,

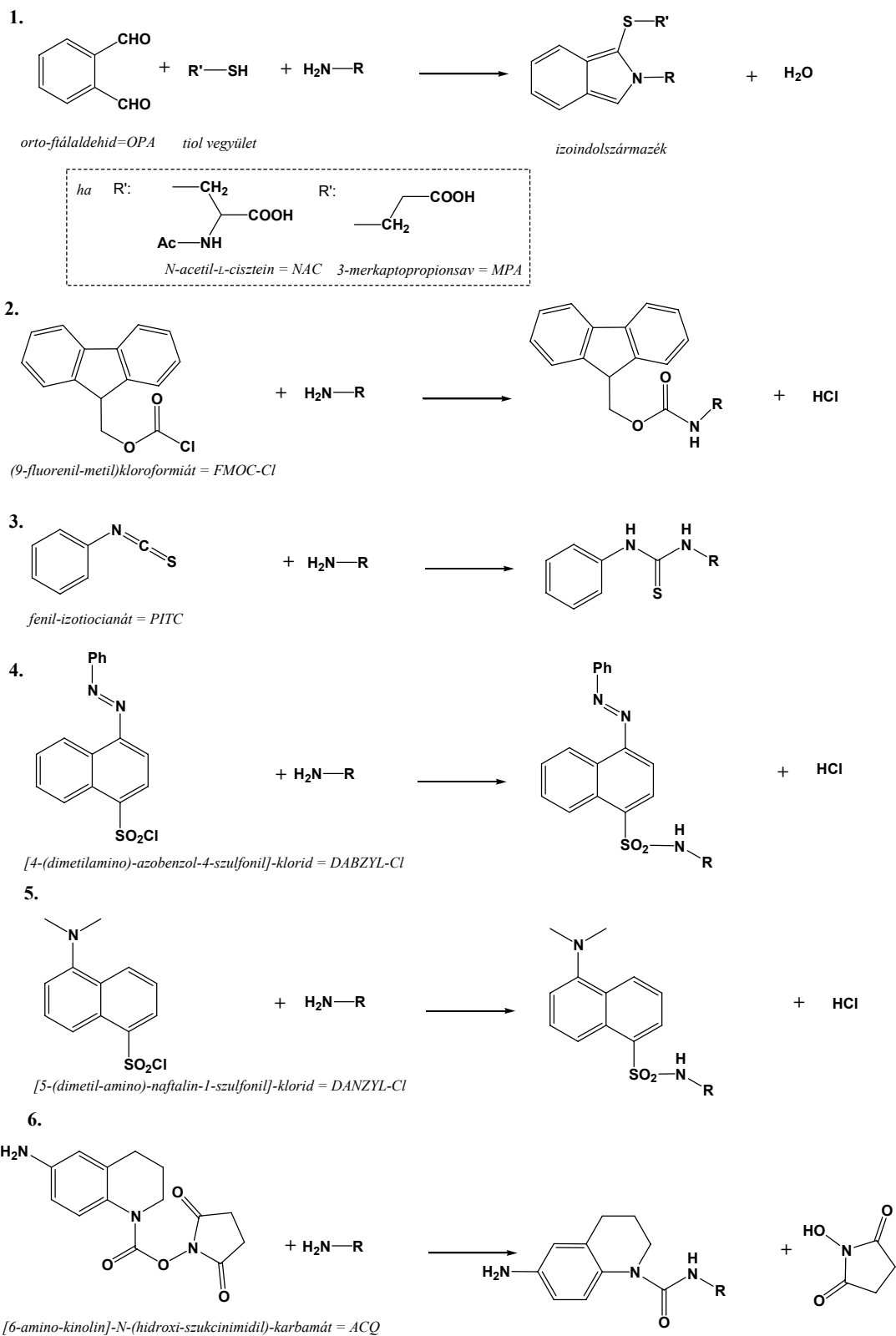
hogy a legtöbbször alkalmazott származékképző szer az OPA/tiol [40] reagens, amely a primer aminocsoporttal reagálva izoindol típusú vegyületet szolgáltat. Az OPA/tiol reagenst a felhasználás gyakorisága szerint a fenil-izotiocianát (PITC) és a (9-fluorenil)metil-kloroformiát (FMOC-Cl) követi. Viszonylag gyakran alkalmazzák még a [4-(dimetilamino)-azobenzol-4-szulfonil]-klorid (DABZYL-Cl) és az [5-(dimetilamino)-naftalin-1-szulfonil]-klorid (DANZYL-Cl) származékképzőket is [41].

1. táblázat. Származékkészítési eljárások aminok és aminosavak HPLC-s meghatározására

Származékképző	No ^a	% ^b
aktív halogenid	70	11,4
alkil-halogenid	117	19,1
alkén/anhidrid	16	2,6
naftalin-2,3-dikarbaldehyd/CN	23	3,8
dialdehyd (nem OPA)	8	1,3
OPA + SH-csoportú segédanyag	10	1,6
OPA/MCE	96	15,7
OPA/BT vagy ET	13	2,1
OPA/MCE vagy MPA	15	2,4
OPA/NAC	5	0,8
OPA/Na ₂ SO ₃	2	0,3
OPA összes	141	23,0
(PITC)	95	15,5
szubsztituált feniltiokarbamil	32	5,2
szukcinimid-észter	16	2,6
DABZYL-Cl	36	5,9
DANZYL-Cl	31	5,0
lakton/ketoaldehyd	6	0,9
hidroxilamin	7	1,1
szilárd fázisú reagens	3	0,5
kénsav/kénsav-halogenid	5	0,8
egyéb	9	1,4
Összes	613	100%

^aAz idézet cikkek száma;

^bMegoszlás%; 1992 és 2002 között az irodalomban megjelent összes cikk %-ában kifejezve.

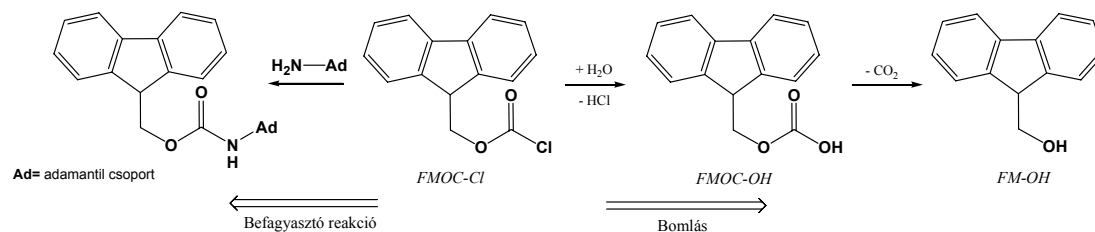


3. ábra. A leggyakrabban alkalmazott származékképző reagensek reakciója aminosavakkal illetve aminokkal

Az OPA/tiol reagenst (**3. ábra/1**) 1970-ben Roth [42] használta először aminosavak meghatározására, és ez az egyik legelterjedtebb származékképző reagenssé nőtte ki magát (**1. táblázat**). E reagens számos előnyös tulajdonsága közül kiemelhető, hogy a reakció vizes közegben is megvalósítható, gyors (1–2 perc), nem szükséges a reagens feleslegének eltávolítása, és a származék kedvező kromofortulajdonsága miatt mind az UV, mind az FI detektálás lehetséges. Kezdetben 2-merkaptó-etanolt (MCE) használtak, mint segédreagenst [43–46], a későbbiekben ezt kedvezőbb tulajdonságai miatt hamar felváltotta a 3-merkaptó-propionsav (MPA) [47–49] illetve az *N*-acetyl-L-cisztein (NAC) [50–56], amely reagensek jóval stabilabb származékokat adtak. A NAC használata továbbá lehetővé teszi az L- és D- aminosavak királis elválasztását is. Hátrányként említendő viszont, hogy az OPA/tiol reagens csak a primer aminosavak származékképzésére alkalmas, ezért a szekunder aminosavak, mint például a prolin és hidroxiprolin elemzésére párhuzamos módszereket kell alkalmazni. Ezek közül két, alapjában véve különböző módszert érdemes megemlíteni. Az első módszer szerint a prolin és a hidroxiprolin iminocsoportját nátrium-hipoklorittal [57, 58] vagy klóramin T-vel [59] oxidálják. A másik eljárásban egy kétlépcsős származékképzést alkalmaznak, az első lépésben az OPA/MPA reagenssel az összes primer aminocsoportot tartalmazó aminosavat alakítják származékká, majd FMOC-Cl reagenssel az iminocsoporttal rendelkező prolint és hidroxiprolint reagáltatják, így egy kromatográfiás felvétel során detektálják az összes aminosav megfelelő származékait [60–62]. Mivel e dolgozat fő témája az OPA/tiol vegyületekkel képzett származékok vizsgálata, ezért ennek a területnek a részletes irodalmi hátterét a kísérleti eredmények tárgyalásánál, a **6.1 fejezetben** ismertetem.

Az peptidszintézisben népszerű FMOC-Cl származékképző (**3. ábra/2**) reagens legnagyobb előnye, hogy származékai nagy érzékenységgű UV illetve FI detektálásra adnak lehetőséget (a kimutatási határ kb. száz fmol/aminosav), de a gyors reakcióidőt (1–2 perc) és a képződött származékok nagyfokú stabilitását (**1. táblázat**) is az előnyök között lehet említeni. A HPLC elválasztást nagyban nehezíti, hogy a reagens feleslege vizes közegben gyorsan hidrolizál (FMOC-OH), majd a keletkezett karbonsav dekarboxileződik, és mivel az így képződött fluoreszcens alkohol (FM-OH, **4. ábra**) a kromatogram közepén jelenik meg, zavarja az analízist [63]. Ennek kiküszöbölésére, vagy pentános extrakciót [64], vagy úgynevezett „befagyasztó” reagenst használnak (**4. ábra**). Ilyen befagyasztó reagens lehet például az 1-aminoadamantán [65], vagy a hidroxil-amin [66, 67], amelyek az FMOC-Cl reagens feleslegével reakcióba lépnek. A pentános extrakció komoly hátránya, hogy bizonyos aminosavak (hisztidin, tirozin,

lizin, ornitin) származékai szintén extrahálódnak, ami jelentős, akár 50–75%-os veszteséget is okozhat. Ráadásul sem az extrakciós sem a befagyasztó reagens módszerrel az FM-OH teljes mértékben nem extrahálható [68].



4. ábra. Az FMOC-Cl származékképző bomlása és a befagyasztó reakciója 1-amino-adamantánnal

Az FMOC-Cl reagensek a hisztidin és tirozin aminosavakkal képzett mono- és diszubsztituált származékai a körülményektől (pH, hőmérséklet, reakcióidő) függően egyszerre keletkeznek, ami komoly nehézségeket okoz az elválasztásban. Az irodalomban javasoltak egy megoldást, amely a származékképzési reakció idejének meghosszabbításán (40 perc), és pH értékének (11,4) növelésén alapul. Ennek hatására csak monosubsztituált hisztidin és diszubsztituált tirozin keletkezett [64], de ebben az esetben elveszett a reagens egyik legfontosabb előnye, mégpedig a gyors reakciósebesség.

Az egyik legkedveltebb reagenst, a PITC-t (**3. ábra/3**) kezdetben a peptidek és fehérjék Edman-féle végcsoport meghatározására használták (fehérje szekvenálás). Ebben a reakcióban a PITC az *N*-terminális aminosav szabad aminocsoportjával reagál, majd a savas közegben az első peptidkötés elhasad, amit gyűrűzáródás követ. Az aminosavból végül egy adott feniltiohidantoin (PTH) vegyület képződik, mely RP-HPLC-vel azonosítható és mennyisége meghatározható [69]. Először adszorpciós kromatográfiával történt a PTH származékok elválasztása [70, 71], ezt hamar felváltotta a Zimmerman által kifejlesztett RP-HPLC módszer, amellyel mind a 20 fehérjeépítő aminosav meghatározható [72]. A PITC reagenssel történő származékkészítést enyhén lúgos közegben kivitelezik. Ezért ez a reakció tökéletesen alkalmas bármiféle vízmentes minta aminosavainak (standard oldatok, fehérje hidrolizátumok, biológiai minták) [73–76] PTC-aminosav származékokká történő alakítására. Az így elkészített származékok vízmentes formában, mélyhűtőben korlátlan ideig eltarthatóak, és oldatban is stabilak egy napig. A nagyfokú automatizálás naponta akár több száz minta vizsgálatát is lehetővé teszi, akár a fehérjék hidrolízisének lépését is magába foglalva. A PITC reagens hátránya, hogy a reagens feleslegét vákuum segítségével el kell távolítani, mert a rea-

gens feleslege reakcióba lép és károsítja a kromatográfiás oszlopot, így a folyamat hosszadalmas. Az esszenciális aminosavszármazékok elválasztásának optimalizálását [77, 78] és a fehérjehidrolízisek részletes körülményeit [79–84] kutatócsoportunk is vizsgálta.

Az ugyancsak népszerű DABZYL-Cl-dal készült szulfonamidszármazék (**3. ábra/4**) nagy előnye, hogy 420 és 450 nm között abszorbeál, így a biológiai eredetű mintákban jelenlevő szennyezők zavaró mátrixhatása elhanyagolhatóvá válik [85–88]. A reakció optimális pH értéke a lúgos tartományban van ($\text{pH} \gg 7$), ez kedvez a metioninban található tioétercsoport oxidációjának [87], ami megnehezítheti az analízist. A módszer további hátránya, hogy vizeletminták esetében a jelenlevő ammónia is származékot képez, ami nehezíti az elválasztást, és megköveteli a minta speciális előkezelését (pl. fagyasztva szárítás azaz „liofilizálás”) [88]. Mint a legtöbb származékképző reagens, amelyeket ezen a területen alkalmaznak, a DANZYL-Cl is az első lépésben az aminosavak aminocsoportjával lép reakcióba (**3. ábra/5**). A következő lépésben, a reagens feleslege reakcióba lép a már származékká alakított aminosav karboxilcsoportjával és így egy úgynevezett vegyes anhidrid képződik (*O,N*-bisz-DANZYL-aminosav), amely szén-monoxid kilépésével bomlik, és a keletkezett fluoreszkáló melléktermékek (DANZYL-OH, DANZYL-NH₂) együtt eluálódnak az elválasztandó aminosavszármazékokkal [89]. További hátrányként említhető, hogy a reakció teljes lejátszódása viszonylag hosszú időt igényel (60 perc) más módszerekhez képest, ami szintén megnehezíti az alkalmazást [90–92]. Az utóbbi években a DANZYL- és DABZYL-származékok esetében megoldották a királis elválasztást is, ahol vagy királis szelektorkat alkalmaztak, mint pl. a γ -ciklodextrint (γ -CD) [93, 94], vagy királis oszlopokat használtak, amelyeken pl. a módosított LiChrosorb Si 100-as szilikagél oszlop, melyhez kovalensen kötöttek S-és R-fenil-alanin-amidcsoportokat [95].

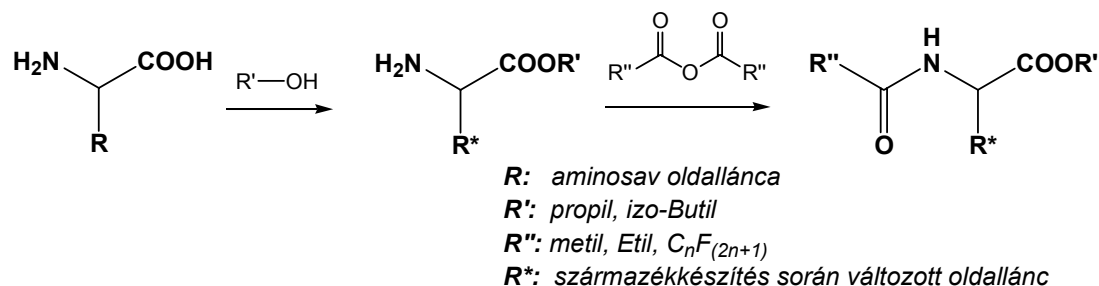
Az AQC vegyületet (**3. ábra/6**) Nimura és Cohen alkalmazta először 1993-ban [96–100], amely az aminocsoportokkal gyorsan és egy lépésben reagál, és egy jól mérhető származékká alakul. A módszer legfontosabb előnyös tulajdonsága az, hogy a reagensfelesleg hidrolíziséből származó 6-aminokinolin (AMQ) és az aminosavszármazékok emissziós spektrumainak maximumai között, csak 60 nm különbség van, ezért a kromatográfiás elválasztás során az elsőként eluálódó AMQ csúcsoknak nincs számottevő zavaró hatása. Fontos továbbá, hogy a származékképzés során a pH érték széles tartományban változhat (8,2–9,7), és csupán háromszoros reagensfelesleg is elegendő a kvantitatív reakcióhoz. A mintákban jelenlevő egyéb anyagok, mint pl. sók és detergenssek nem zavarják az elválasztást. Az AQC reagens alkalmazásával igen ala-

cseny kimutatási határokat lehet elérni (pár száz fmol, kivéve a ciszteint) [98]. A számos említett előny ellenére a módszer nem igazán elterjedt.

3.1.2. Aminosavak meghatározása GC módszerrel

A gázkromatográfia (GC) – a berendezés egyszerűsége és olcsósága folytán – az 1960-as években vált az egyik legnépszerűbb és leghatékonyabb kromatográfiás módszerre, de az alkalmazásokat tekintve, még napjainkban is a második helyen kell említeni a HPLC után. Az aminosavak az alacsony forráspontjuk miatt általában jól és könnyedén vizsgálhatók a rutin GC-s módszerekkel [101,102]. Az aminosavakból származékot kell képezni, mivel savas pH-n kationként, lúgos pH-n anionként, semleges tartományban pedig ikerionos formában vannak jelen, megakadályozva a könnyű párologtatást. Ennek ellenére az aminosavak GC-s meghatározása, a bonyolult, két lépésben történő származékképzés ellenére is, megoldott és népszerű. A megjelent számtalan közlemény és könyv idézése helyett csak egy igen alapos és sokfajta származékképzési technikát ismertető műre hivatkozom [103].

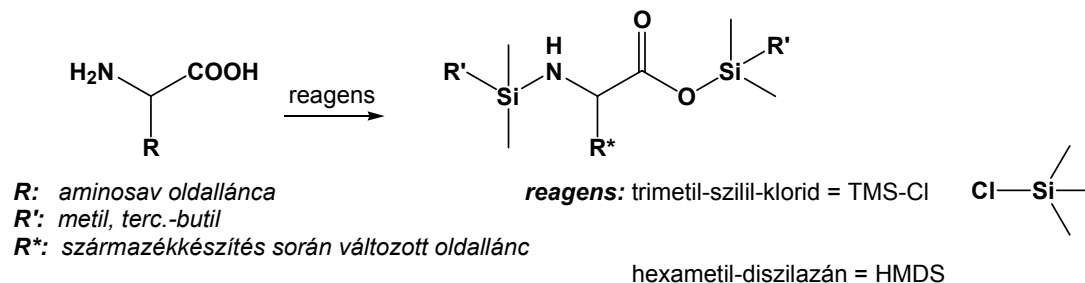
Az aminosavak esetében, mint korábban említettem, kétlépéses származékképzés szükséges, mivel legalább két funkciós csoportjuk van (egy amino és egy karboxil). Az első lépés rendszerint a karboxilcsoport észteresítése, amelyet butil [104], propil [105] vagy izobutil-alkohollal [106] kiviteleznek (**5. ábra**). A második lépésben az aminocsoport acilezésére korábban ecetsav-anhidridet [107, 108] vagy propionil-kloridot [109], újabban fluortartalmú savanhidrideket alkalmaznak (**5. ábra**). E termékek lehetővé teszik a lángionizációs detektornál (FID) nagyobb érzékenységet biztosító elektronbefogásos detektor (EC) használatát.



5. ábra. GC technikában alkalmazott kétlépéses származékképzés alkohollal, majd sav-anhidriddel.

A származékkészítés során a különböző aminosavak oldalláncának funkciós csoportjai okozzák a legnagyobb problémát, mivel az acilezési reakció optimális körülményei minden egyes aminosav esetében eltérőek. Ezért ahhoz, hogy minden aminosav reprodukálhatóan származékká alakuljon, számos paramétert (hőmérséklet, reakcióidő) pontosan be kell tartani. Példaként egy egyszerű esetet említve, az arginin és a hisztidin származékká alakulása szempontjából optimális hőmérsékleten a triptofán már bomlásnak indul. Leggyakrabban a trifluorecetsavat önmagában (butil-észterek acilezése 140 °C-on, 10 percig, [110]), vagy metilén-dikloridban (butil-észterek acilezése 150 °C-on, 5 percig, [104, 111]), illetve acetonitrilben (propil-észterek acilezése 150 °C-on, 5 percig, [112, 113]) oldva alkalmazzák.

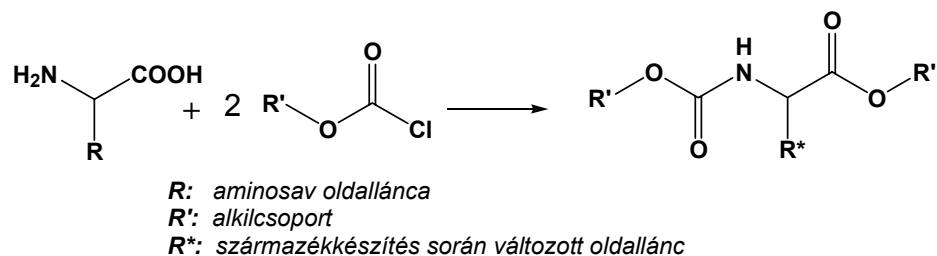
A kétlépcsős származékkészítés bonyolultsága miatt egylépcsős technikákat is kidolgoztak. Az aminosavak egylépcsős származékká alakítása trimetilszilil- (TMS) [114–116] és *terc.*-butildimetilszilil funkciós csoportú reagensekkel (TBDMS) [117–123] széles körben alkalmazott módszer (6. ábra).



6. ábra. A GC technikában alkalmazott egylépcsős származékképzés trialkilszilil reagensekkel, (szililezés)

A TMS reagenssel történő származékkészítés hátránya, hogy az arginin ornitinné, a glutamin glutaminsavvá, az aszparagin aszparaginsavvá alakul, a többi fehérjealkotó aminosavból pedig 15 perc alatt, 150°C-on, egyetlen kromatográfiás csúcsként eluálódó, *N*-TMS-TMS-észter képződik [103]. A TBDMS származékképző reagens esetében a nem kívánt mellékreakciók háttérbe szorulnak, az arginin, a glutamin és az aszparagin átalakulás nélkül reagál, ami tömegspektrometriás detektor (MS) alkalmazása esetén érzékeny meghatározást tesz lehetővé és könnyen azonosítható tömegspektrumokat szolgáltat [121–123].

A másik gyakori, egy lépcsőben történő észteresítést és alkilezést alkilklórformiát alkalmazásával oldották meg [124–128], melynek során a megfelelő *N*-(*O,S*)-alkoxikarbonil-aminosav-alkil-észterek keletkeznek (7. ábra).



7. ábra. GC technikában alkalmazott egy lépéses származékképzési alkil-klórformiát reagensekkel

A módszer hátránya, hogy a származékképzés nem egyértelműen kvantitatív, illetve bizonyos aminosavak meghatározott funkciós csoportjai (például az arginin guanidin nitrogénje, a triptofán, az indol és, a hisztidin imidazol gyűrűje, valamint a szerin, treonin és a hidroxiprolin hidroxilcsoportja) nem vesznek részt a származékképzésben [124], ezzel növelve a párologtatási hőmérsékletet.

3.1.3. Aminosavak meghatározása kapilláris elektroforézissel (CE)

A kapilláris elektroforézis (CE) az egyik legújabb elválasztástechnikai módszer, amely különösen hatékonyan alkalmazható mind a kémiai, mind a biológiai eredetű minták elemzésében [129–131]. A CE technikák hatalmas előnye, hogy a tányérszámuk egy nagyságrenddel nagyobb, mint a HPLC vagy GC technikáké (a milliós tányérszámot is elérhetik), így az elválasztás idejét akár percekre is le lehet csökkenteni. A CE módszer hátránya azonban a bonyolult műszerezettség és a viszonylag drága berendezés. Az aminosavak elválasztására a kapilláris zónaelektroforézis (CZE), valamint a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MEKC) vált be a legjobban. A CZE esetében mind a származékképzés nélküli (15 aminosav, 20 perc, UV detektálás 185 nm-en) [132], mind a származékképzéses eljárás alkalmazható. A CE módszernél az UV jelek detektálása rendszerint a kapillárisban történik, de az érzékenység tovább növelhető lézerindukált fluoreszcenciás detektorral (LIF), ha fluoreszcensen aktív származékokat használunk. Fontos megemlíteni, hogy a CE esetében is megoldották az MS technika alkalmazását, ami új távlatokat ad e módszernek.

Királis elválasztásokra a CE módszer kiválóan bevált, és mind a származékképzés nélküli, mind a származékképzési technikára kidolgozták a megfelelő eljárásokat. A származékképzés nélküli elválasztásoknál királis szelektor vegyületeket alkalmaznak [133–137], míg a másik esetben, királis származékképzéssel diasztereomer

vegyületepárokat hoznak létre, melyeket akirális körülmények között kromatografálnak [135, 138, 139].

További egyszerűsítést jelent, hogy a HPLC meghatározásoknál már megszokott, a **3. ábrán** már részletesen ismertetett származékképző reagensek általában jól használhatóak a CE technikában is, mint pl.:

1. az OPA/MCE reagens alkalmazásával [140, 141] 7 aminosavat 16 perc alatt sikerült elválasztani [141];
2. 15 DANZYL-aminosav elválasztását valósították meg nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és nátrium-kolát – mint felületaktív anyagok – alkalmazásával MEKC technika segítségével [142];
3. a vankomicin kiválóan alkalmas a királis szelektor szerepére és alkalmazásával 12 FMOC-aminosavszármazékot választottak el [143];
4. összesen 20 fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) módosított aminosav elválasztását oldották meg az elektrolitrendszerhez adagolt szerves módosítók és α -ciklodextrin segítségével [144].

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a CE technika korántsem tökéletes és még sok feladatot kell megoldani, úgymint:

1. a származékképzés helyének optimálását (oszlop előtt, oszlop után, vagy közvetlenül az oszlopon történjék);
2. a mennyiségi értékelés és a migrációs idők reprodukálhatóságának javítását;
3. az elválasztandó aminosavkomponensek számának növelését;
4. a nagyszámú, kísérleti állapotú technika gyakorlati hasznosítását mindennapos analitikai feladatok megoldására [145, 146].

3.1.4. Aminosavak és aminok meghatározása vékonyréteg-kromatográfiával (TLC)

A vékonyréteg-kromatográfia volt talán az első könnyen és rutinszerűen alkalmazható kromatográfiás módszer többkomponensű aminosavak [147,148], aminosavszármazékok és aminok [149–153] keverékének egyidejű kvalitatív és fél-quantitatív elemzésére. Gyorsasága és egyszerűsége miatt még ma is mind az egy [154,155] mind a kétdimenziós [156] módszert alkalmazzák. Mivel a szabad aminosavaknak és biogén aminoknak, pár kivételtől eltekintve, nincs UV elnyelése a vékonyréteg-kromatográfiában alkalmazott UV lámpák tartományában, ezért előhívószert kell alkalmazni.

1. A legelterjedtebb előhívószert a ninhidrin, amely lila színnel jelzi (abszorpciós maximum = 570 nm) a primer aminocsoport jelenlétét (**2. ábra**). A szekunder amino csoport, mint a prolin és a hidroxiprolin esetében, egy sokkal gyengébb sárgásbarna (abszorpciós maximum = 405–440 nm) színnel jelentkezik.

2. A másik legnépszerűbb festési eljárás a klór- illetve jódtolidin alkalmazásán alapul. Előnyük, hogy érzékenyen reagálnak a primer, szekunder és tercier aminocsoporttal egyaránt, így minden aminosav, aminosavszármazék és amin kimutatására alkalmasak. Hátrányos, hogy a reagens rákkeltő.

3. Jód reagens alkalmazásával a legtöbb kromatográfiásan futtatott anyagot meg lehet jeleníteni, ha poláros csoportokat tartalmaznak. Hátrány, hogy a festés intenzitása igen gyenge, bár a klórtolidines módszerrel az intenzitás tovább növelhető.

Az alacsony tányérszámmal függ össze, hogy a normál vékonyréteg-kromatográfia alkalmazásával csak néhány komponens választható el, így ez nem hatékony módszer. Hátrányainak kiküszöbölésére dolgozták ki a túlnyomásos vékonyréteg-kromatográfiát más néven az OPTLC-t. Nagy előnye, hogy túlnyomás alkalmazásával jelentősen megnőtt a módszer hatékonysága és reprodukálhatósága, így gyakorlatilag már az összes természetes aminosav elemzése rövid idő alatt és reprodukálhatóan elvégezhető. Az aminosavak vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatának további részletezésétől eltekintek, mivel analitikai jelentősége elhanyagolható. Sem a számos állófázis, sem az igen változatos származékképző eljárások alkalmazása nem hozott megoldást, így a módszerek már csak a szerves laboratóriumokban van nélkülözhetetlen szerepe.

3.1.5. Aminosavak és aminok meghatározása ioncserés folyadékkromatográfiával (IEC)

Az aminosavak minőségi-mennyiségi meghatározására kidolgozott automatikus aminosav-analizátorok, melyek az ioncserés kromatográfia (IEC) elvén működnek, negyven éve jelentek meg a kromatográfiában [157], és hosszú ideig az egyetlen és vezető módszernek bizonyultak ezen a területen. Az 1960-as években először a GC, majd az 1970-es évektől a HPLC vette át a vezető szerepet az aminosavak elemzésében, így napjainkban az aminosav-analizátorok használata háttérbe szorult. Ennek magyarázata a hosszas elemzési időkből (2 óra) és a készülék egyoldalú felhasználhatóságában keresendő.

4. CÉLKITŰZÉS

Kutatómunkánk elsődleges célja az volt, hogy felderítsük az OPA/tiol és a primer aminocsoport közötti reakciókban létrejövő termékek stabilitásában mutatkozó jelentős különbségek okát. Ezt követően célul tűztük ki a keletkező termékek azonosítását, az átalakulási reakciók visszaszorítását, majd lehetőség szerint egyszerű analitikai módszerek kidolgozását. A fentieknek alapján a dolgozat két nagyobb részből áll.

4.1. Irodalmi adatok

Célkitűzésünknek megfelelően, a munka megkezdése előtt feldolgoztuk az 1992-től 2002-ig tartó időszak összes, aminosavakkal foglalkozó, nemzetközi folyóiratban megjelent cikkét. Ezt a 613 cikket a származékképzés típusa szerint csoportosítottuk, osztályoztuk (**1. táblázat**). A leggyakrabban használt származékképző reagensok a savhalogenidek (Fmoc-Cl), a fenil-izotiocianát-származékok, a DANZYL és rokon vegyületeik, valamint az OPA különböző tiolokkal alkotott keverékei. Mint származékképző reagens közülük az OPA emelkedik ki, gyakorlatilag az analízisek majdnem negyedét ezzel a reagenssel végzik. Ezt a népszerűséget – amint azt a bevezetőben már említettük – az OPA-val képzett származékok számos előnyös tulajdonságával magyarázhatjuk, azaz:

- a)** a származékképző reakció egyszerű, vizes közegben is kivitelezhető, és pillanatszerű;
- b)** a reakció szelektív, ezért természetes mátrixokban is alkalmazható;
- c)** magas érzékenység érhető el, mind UV, mind fluoreszcenciás detektálással.

A módszernek két jelentős hátránya van:

- a)** az OPA/tiol csak a primer aminocsoporttal reagál a **3. ábrán** felírt egyenlet szerint, így a prolin és hidroxiprolin mérésére nem használható;
- b)** az egyes aminosavak és aminok OPA származékai a másféle származékoknál jelentősen bomlékonyabbak. Csoportunk ennek a kérdésnek megvilágítására kereste a választ.

5. A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

5.1. A kísérletekhez felhasznált anyagok

A felhasznált anyagok és reagensek mindegyike analitikai tisztaságú volt. A trietil-amint (TEA), az OPA-t, MPA-t, NAC-t a Sigmától (St. Louis, MO, USA), míg az aminosavakat és aminokat részben a Sigmától, részben a Servától (Heidelberg, Németország) vásároltuk. A szerves eluensként használt acetonnitrilt, metanolt és tetrahidrofuránt (THF) a Romil Chemicalstól (Leics., UK) szereztük be. A védett aminosavakat az MTA Peptidkémiai Tanszéki Kutatóintézetétől kaptuk, melyek tisztasága minden esetben nagyobb volt 99%-nál.

5.2. A minták

A vizsgálatainkhoz használt vörös és fehér borokat illetve a bak, láger és klasszik söröket (Dreher) és a borecetet hagyományos élelmiszerüzletekben szereztük be.

5.3. Alkalmazott eszközök

A doktori munkám során kétféle HPLC készüléket alkalmaztunk. A vizsgálatok nagyobb részét a tanszékünkön található, UV és fluoreszcens detektorral ellátott HPLC készülékkel végeztük. A tömegspektrometriás vizsgálatokhoz a Növény- és Talajvédelmi Kutatóintézetben lévő HPLC-MS készüléket használtunk, amiben Tóth Ferenc volt segítségünkre.

5.3.1. A HPLC-UV-Fl rendszer

A HPLC-UV-Fl méréseket Waters típusú készüléken végeztük, amely egy Waters 600-as vezérlőből, egy négyfejes pumparendszerből, egy termosztálható oszloptartóból, egy Waters 717 automata mintaadagolóból, egy Waters 996 fotodiódasoros (PDA) detektorból és egy ehhez sorba csatlakoztatott Waters 274 fluoreszcens detektorból áll. A rendszer működését a Millennium 2010 szoftver biztosította (1992–95, ISO 9002 szabvány).

5.3.2. A HPLC-UV-MS rendszer

A HPLC-UV-MS méréseket egy Spectra System (ThermoSeparation Products, San Jose, CA, USA) HPLC készüléken végeztük, amely egy UV 2000 (két hullámhosszon detektáló), illetve egy Finnigan Aqua (ThermoQuest, Manchester, UK) tömegspektrometriás detektorral volt sorba kapcsolva. A rendszer működését az Xcalibur, RevisionB 1997 szoftver biztosította.

5.3.3. Az alkalmazott kromatográfiás oszlopok leírása

Az elválasztásokat két különböző fordított fázisú oszlopon végeztük (a továbbiakban C-1, C-2), amelyek adatait a **2. táblázatban** foglaltunk össze.

2. táblázat. A doktori munka során alkalmazott analitikai oszlopok

jele	neve	mérete	töltet	előtét oszlop
C-1	Hypersyl	150 mm×4 mm	5 µm, C18	20 mm×4 mm
C-2	Hypersyl	200 mm×4 mm	5 µm, C18	20 mm×4 mm

A C-1 – C-2 jelű kísérleti oszlopokat a BST forgalmazza. Az előtét oszlopok minden esetben az analitikai oszloppal megegyező töltetet tartalmazták.

5.3.4. Egyéb alkalmazott készülékek

Az eluensek, reagensek és a minták oldatainak pH mérésére Radelkis OP-208/1-es típusú precíziós pH-mérőt (Radelkis, Budapest, Magyarország) használtunk.

A minták vízmentesítése vákuumleparló készüléken (Rotavapor, Büchi, Svájc) $\leq 60^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű vízfürdőből történt.

5.4. Standard oldatok

A vizsgálatokhoz, az egyes aminosavakból ($2,5 \times 10^{-4}$ mol/liter/aminosav) és aminokból ($1-2 \times 10^{-4}$ mol/liter/amin) többféle egyenkénti-, illetve összetett törzsoldatot készítettünk, desztillált vízben történő oldással.

Összetett törzsoldatok:

Az aminosavakból készített törzsoldatok-, a továbbiakban ST1–ST7- összetétele:

ST1 összetétele: aszparaginsav, glutaminsav, szerin, alanin, valin, tirozin, leucin, fenilalanin

ST2 összetétele: aszparagin, glutamin, homoszerin, treonin, arginin, homoarginin, metionin, cisztein, izoleucin, triptofán

ST3 összetétele: hisztidin, β -alanin, ornitin

ST4 összetétele: glicin, GABA, lizin

ST5 összetétele: aszparaginsav, glutaminsav, szerin, glicin, GABA, alanin, valin, tirozin, leucin, fenilalanin, lizin

ST6 összetétele: aszparagin, glutamin, β -alanin, homoszerin, hisztidin, treonin, arginin, homoarginin, metionin, cisztein, izoleucin, triptofán, ornitin

Az aminosavakból készített törzsoldat – a továbbiakban ST7 – összetétele: etanolamin, hisztamin, metil-amin, agmatin, etil-amin, izopropil-amin, propil-amin, tiramin, putreszcín, kadaverin, izobutil-amin, butil-amin, izoamil-amin, feniletil-amin, hexil-amin, heptil-amin és oktil-amin

Az OPA törzsoldat készítése: 0,256–0,512 g, analitikai pontossággal mért OPA-t feloldottunk 25,0 ml metanolban (1,024–2,048 g/L, a továbbiakban: metanolos OPA oldat).

5.5. Pufferoldat

A borát pufferoldat készítése: 0,2 M kálium-klorid és 0,2 M bórsavat tartalmazó oldatot elegyítettünk 0,2 M-os nátrium-hidroxid oldattal (pH $9,9 \pm 0,05$), 50 : 50 térfogatszázalékban.

5.6. Reagensoldat

Az OPA/MPA reagensoldat készítése: 5,0 ml metanolos OPA oldatot 20,0 ml borát pufferrel és változó mennyiségű 50–200 μ l MPA oldattal elegyítettük, majd az oldat pH-ját $9,3 \pm 0,05$ -re állítottuk.

Az OPA/NAC reagensoldatok készítése: 5,0 ml metanolos OPA oldatot változó összetételű, 20,0 ml 0,0967–0,387 g NAC-ot tartalmazó borát pufferrel elegyítettük, majd az oldat pH-ját $9,3 \pm 0,05$ -re állítottuk.

Az MPA és NAC feleslegét az OPA-hoz képest tág határok közt változtattuk $\{\text{OPA/MPA(NAC)} = 1/0,5 - 1/50\}$.

5.7. Származékkészítés

5.7.1. Származékképzés

380 µl mintaoldathoz 120 µl OPA/MPA vagy OPA/NAC reagenst adtunk. A kapott elegyet alaposan összekevertük, majd 4°C-on tartva 7 perc, 3 óra vagy 6 óra múlva az oldat 20 µl-ét injektáltuk.

5.7.2. A származékképző reagensok jellemzése és ellenőrzése

A műveleti üres mérések és a reagens oldatok stabilitásának vizsgálata során alkalmazott származékképzési reakciókhoz frissen készített reagensoldatokat használtunk, melyeket 90 percig pihentettünk az első felhasználásig [169]. A reagensoldatokat ~4 °C hőfokon, hűtőszekrényben, eltérő ideig tároltuk és automata mintaadagolóval injektáltuk (Waters 717, ~4 °C hőfokon termosztálva). Az analízisek során naponta legalább kétszer végeztünk műveleti üres mérést.

Az 5.6. fejezetben ismertetett reagensoldatokat a stabilitási vizsgálatok alapján, ≤ 9 napig használtuk származékkészítésre. Ennek során az aminosavak, és aminok egyenkénti oldataiból (ST1–ST7), illetve ezek adott keverékeinek törzsoldataiból 380 µl-es részletet 120 µl reagensoldattal elegyítettük és 7 percig reagáltattuk az injektálás előtt.

5.8. Detektálás

Doktori munkámban kétféle, különböző detektorral ellátott HPLC készüléket alkalmaztunk.

5.8.1. A HPLC-UV-Fl rendszer [1,2]

A mérések során a PDA és fluoreszcens detektorokat – ebben a sorrendben sorba kapcsolva – alkalmaztuk, így egy kromatográfiás felvételtől egyidejűleg kétféle kromatogramot, illetve szükség esetén 3D-spektrumokat is rögzíthettünk. A spektrumokat 190–400 nm hullámhosszok között vettük fel, az OPA/MPA~NAC/aminosav- ill. aminszármazékok 334 nm-en. Az izoindolvegyületek fluoreszcenciás válaszjelét 337 nm-es gerjesztési- és 454 nm-es kibocsátási hullámhosszaknál mértük.

5.8.2. A HPLC-UV-MS rendszer [3]

A HPLC-MS mérésekben az UV és tömegspektrometriás detektálás szimultán zajlott. Az UV detektálás 334 nm-en történt, ami az OPA/tiol-származékok UV abszorpciós maximumának felel meg. Az MS detektálás során úgynevezett „elektron spray” (ESI) ionizációs technikát (pozitív módban) alkalmaztunk, az 50–1600 tömegegységtartományban. Az alkalmazott ionizációs gáz hőmérséklete az áramlási sebességtől függően 200 °C (200 µl/perc), illetve 380 °C (1 ml/perc), az alkalmazott ionizáló feszültség 3,5 kV volt.

5.9. Eluens rendszer

A doktori munkám során háromféle eluens rendszert alkalmaztunk, amelyeket az adott vizsgálatokhoz és feladatokhoz optimáltunk.

5.9.1. Az OPA/MPA- és OPA/NAC-származékok bomlásának HPLC követése során alkalmazott eluens rendszer [1,2]

A reagens oldatok és az OPA/tiol/aminosav-, illetve aminszármazékok oldatainak stabilitás- és reprodukálhatósági vizsgálataihoz, a következő eluenseket használtuk:

(A) eluens: 0,05 M-os nátrium-acetát oldat, melyet 7,2 pH értékre állítottunk.

(B) eluens: 0,10 M-os nátrium-acetát–acetonitril–metanol elegy (46:44:10), melynek pH-ját szintén 7,2 értékre állítottuk.

A megfelelő pH-értékű oldatokat jégecet, illetve 50%-os nátrium-hidroxid, valamint ezek hígított oldatainak cseppenkénti adagolásával nyertük.

Az elválasztások során egy egyszerű, 10 perces lineáris gradiens programot alkalmaztunk (**3. táblázat**), az áramlási sebesség 1,8 ml/perc, az oszlop hőmérséklete 30°C volt.

3. táblázat. Gradiens program az OPA/tiol/aminosav-származékok elválasztásához

Lépcső	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)
1	0,00	1,80	100	0,0
2	10,00	1,80	0,0	100,0
3	13,00	1,80	0,0	100,0
4	15,00	1,80	100,0	0,0
5	23,00	1,80	100,0	0,0

5.9.2. Az OPA/MPA- és OPA/NAC-származékok HPLC-MS vizsgálata során alkalmazott eluens rendszer [3]

Az OPA/tiol/aminosav- illetve amins származékok oldatainak HPLC-MS vizsgálataihoz, a következő eluenseket használtuk:

(A) eluens: 0,0025 M-os ammónium-acetát oldat, melyet 7,2 pH értékre állítottunk.

(B) eluens: 0,0050 M-os ammónium-acetát–acetonitril–metanol elegy (46:44:10) volt, melynek pH-ját szintén 7,2 értékre állítottuk.

A megfelelő pH-értékű oldatokat 1M-os ecetsav, illetve 1M-os ammónium-hidroxid oldat cseppenkénti adagolásával nyertük.

Az elválasztások során egy egyszerű, 10 perces lineáris gradiens programot alkalmaztunk (**4. táblázat**), az áramlási sebesség az ionizáció hőmérsékletétől függően 200 µl/perc (200°C) illetve 1,0 ml/perc (380°C), az oszlop hőmérséklete 30 °C volt.

4. táblázat. Gradiens program az OPA/tiol/aminosav-származékok elválasztásához HPLC-MS készüléken

Lépcső	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)
1	0,00	1,00	100	0,0
2	10,00	1,00	0,0	100,0
3	13,00	1,00	0,0	100,0
4	15,00	1,00	100,0	0,0
5	23,00	1,00	100,0	0,0

5.9.3. 20 aminosav és 17 aminosav OPA/tiol-származékának együttes elválasztására alkalmazott eluens rendszerek [5,6]

Az aminosavak és aminosavak OPA/MPA- és OPA/NAC-származékainak tulajdonságait eltérő HPLC módszerek felhasználásával jellemeztük.

1. Az első módszert (1. MÓDSZER) 21 aminosav elválasztására dolgoztuk ki és a következő eluenskombinációt használtuk, ami az MPA- és a NAC- tiol segédreagens alkalmazásától függően kétféle volt (**5. táblázat.**)

5. táblázat. Optimális gradiens program az OPA/tiol/aminosav-származékok elválasztásához

OPA/NAC program (1A. MÓDSZER)					OPA/MPA program (1B. MÓDSZER)				
Lépés	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)	Lépés	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)
1	0,00	2,1	99,5	0,5	1	0,00	1,3	99,5	0,5
2	4,00	2,1	99,0	1,0	2	6,00	1,3	99,0	1,0
3	8,00	2,1	90,0	10,0	3	8,00	1,3	97,0	3,0
4	10,00	2,1	75,0	25,0	4	9,00	1,3	93,0	7,0
5	15,00	2,1	65,0	35,0	5	11,00	2,3	85,0	15,0
6	19,00	2,1	55,0	45,0	6	12,00	2,3	81,0	19,0
7	21,00	2,1	0,0	100,0	7	16,00	2,3	72,0	28,0
8	24,00	2,1	0,0	100,0	8	19,00	2,3	72,0	28,0
9	26,00	2,1	99,5	0,5	9	22,00	2,3	65,5	35,0
10	37,00	2,1	99,5	0,5	10	26,00	2,3	0,0	100,0
					11	28,00	2,3	0,0	100,0
					12	29,00	2,3	99,5	0,5
					13	40,00	2,3	99,5	0,5

2. A 17 aminosav elválasztására kétféle módszert dolgoztunk ki (2A és 2B MÓDSZER), attól függően, hogy NAC vagy MPA tiol segédreagenst alkalmaztunk. A következő eluenskombinációt használtuk (6. táblázat.):

6. táblázat. Gradiens program az OPA/tiol/aminosav-származékok elválasztásához HPLC-MS készüléken

OPA/NAC program (2A. MÓDSZER)					OPA/MPA program (2B. MÓDSZER)				
Lépcső	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)	Lépcső	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)
1	0,00	1,0	60,0	40,0	1	0,00	1,3	60,0	40,0
2	24,00	1,0	25,0	75,0	2	20,00	1,3	30,0	70,0
3	27,00	1,0	0,0	100,0	3	24,00	1,3	10,0	90,0
4	27,10	1,4	0,0	100,0	4	29,00	1,3	0,0	100,0
5	30,00	1,4	0,0	100,0	5	30,00	1,8	0,0	100,0
6	31,00	1,4	60,0	40,0	6	31,00	1,8	60,0	40,0
7	35,00	1,4	60,0	40,0	7	35,00	1,8	60,0	40,0

3. Végül 20 aminosav és 17 aminosav elválasztására a 3. MÓDSZERT alkalmaztuk:

(A) eluens: 0,05 M-os nátrium-acetát oldat, melyet 7,2 pH értékre állítottunk.

(B) eluens: 0,10 M-os nátrium-acetát–acetonitril–metanol elegy (46:44:10) volt, melynek pH-ját szintén 7,2 értékre állítottuk.

(C) eluens: metanol

(D) eluens: acetonitril

A megfelelő pH-értékű oldatokat jégcet, illetve 50%-os nátrium-hidroxid cseppenkénti adagolásával nyertük. Az elválasztások során egy meglehetősen bonyolult, 53 perces

többlépcsős gradiens programot alkalmaztunk (**7. táblázat**), ahol mind az áramlási sebességet, mind az oszlop hőmérsékletét változtattuk.

7. táblázat. Optimális gradiens program az OPA/MPA/aminosav- (Prg-1, T-3 jelű oszlop, 50°C) és az OPA/tiol/aminosav-származékok elválasztásához (Prg-2, T-2 jelű oszlop, 30°C)

Lépcső	Idő (perc)	Áramlás (ml/perc)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	0,00	1,3	97,0	3,0	0,0	0,0
2	8,00	1,3	97,0	3,0	0,0	0,0
3	9,00	1,3	93,0	7,0	0,0	0,0
4	11,00	1,7	85,0	15,0	0,0	0,0
5	12,00	1,7	81,0	16,0	3,0	0,0
6	16,00	1,7	72,0	18,0	8,0	2,0
7	19,00	1,5	72,0	8,0	16,0	4,0
8	29,00	1,5	60,0	26,0	10,0	4,0
9	42,00	1,3	60,0	25,0	15,0	0,0
10	45,00	1,3	22,0	71,0	0,0	7,0
11	48,00	1,3	0,0	86,0	7,0	7,0
12	48,10	1,7	0,0	86,0	7,0	7,0
13	40,00	1,7	97,0	3,0	0,0	0,0
14	53,00	1,3	97,0	3,0	0,0	0,0

6. A KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA

6.1. Irodalmi előzmények

Ahogy a bevezetőben ismertettem (3.1.1.3. fejezet), az aminosavak esetében alkalmazott, oszlop előtti származékképzési módszerek közül az OPA/tiol reagensek alkalmazása az egyik legkedveltebb és legelterjedtebb. A származékképzés során több bomlási vagy átalakulási termék jelenik meg és zavarja a mérést, amit számos pulikációban e módszer komoly hátrányaként említenek [42]. A reakcióban keletkező 1-alkiltio-2-alkil-szubsztituált izoindolszármazékok (röviden izoindol-aminosav vagy izoindol-amin, **3. ábra**) stabilitását a tiol segédreagens összetétele és kémiai szerkezete nagymértékben befolyásolja [158]. Korábban az egyszerűbb MCE-t alkalmazták (az összes meghatározás több mint 60%-ában [158]), és ez számos hátránya ellenére napjainkban is igen népszerű.

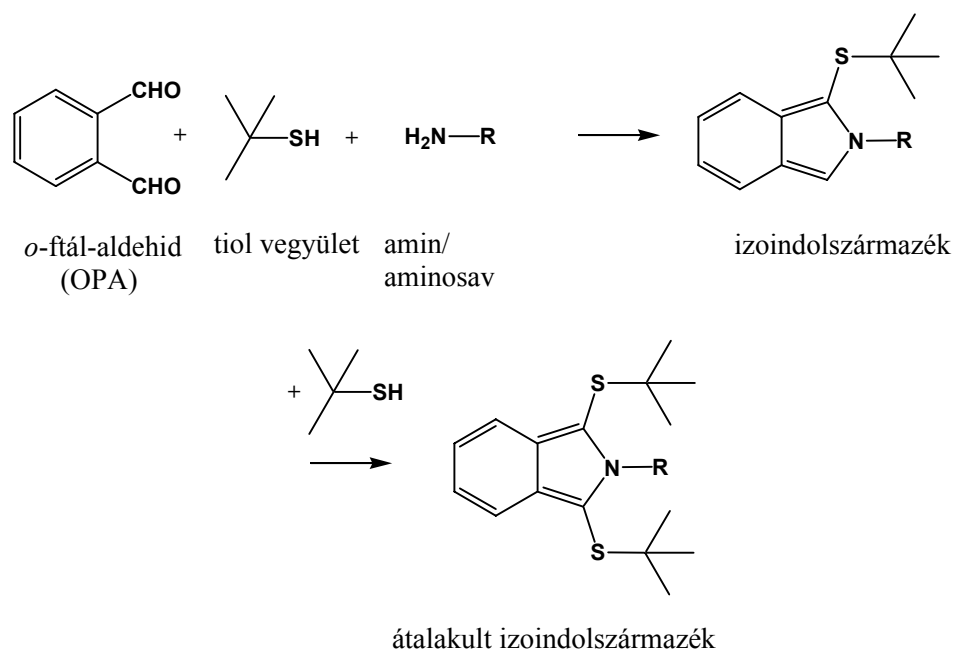
Az 1980-as években tudományos alapossággal összehasonlították a 2-merkapt-etanol (MCE), a 3-merkaptopropanol (MCP) és az etántiol (ET) segédreagenssel készült izoindolszármazékok stabilitását [159,160], hat modellvegyület (propil-amin, GABA, β -alanin, glicin, β -aminovajsav és alanin) esetében. A β -alaninszármazék stabilitása a következő sorrend szerint változott: OPA-MCP > OPA-ET > OPA-MCE [159,160]. Megállapították továbbá, hogy az OPA-ET reagenssel képzett származékok átlagos fluoreszcenciás intenzitása mintegy hétszerese az OPA-MCE reagens származékaihoz képest. További vizsgálatok kimutatták, hogy az OPA/ β -alanin arány növelése (azaz az OPA feleslegének növelése) katalizálja ezen származékok bomlását vagy átalakulását, vagyis csökkenti azok stabilitását [159]. Más vizsgálatok szerint, az MPA segédreagens alkalmazásával – mind az alanin [161], mind a 17 aminosav esetében [162] – stabil származékok keletkeztek [158]. A NAC segédreagenssel nagyobb stabilitású származékok keletkeznek [163-165], és ez a módszer alkalmas a D- és L-enantiomer aminosavpárok elválasztására, mivel a származékképzés során diasztereomerek jönnek létre.

A következő fejezetben az irodalomban eddig közölt ellentmondó adatokat foglalom össze. Széles tartományban változtatták az OPA-, MPA- és NAC-oldatok koncentrációját (0,18–5,0 mg/ml; 0,18–5,0 μ l/ml; 0,33–3,3 mg/ml), valamint az A

reagensoldatként használt borát puffer koncentrációját (0,03–0,45 M). Az eddigi vizsgálatok során az OPA/tiol-tartalmú reagens molarányait csak szűk régióban változtatták ($[OPA]/[MPA] = 0,32\text{--}0,65$ és $[OPA]/[NAC] = 0,32\text{--}2,0$), az OPA/aminosav molarányok esetében nagy tartományban vizsgálták ($[OPA]/[\text{aminosav}] = 1\text{--}3 \times 10^4$). A hatalmas OPA felesleg a származék stabilitásának jelentős csökkenését eredményezte [50, 159], és talán ennek is köszönhető az az általánosan elterjedt nézet, hogy a származékok rendkívül bomlékonyak. Az MPA- és NAC-származékok stabilitását és spektrális jellemzőit (UV és FI) kutatócsoportunk széles körben vizsgálta [166].

A reagensoldatok élettartamára vonatkozó adatok még inkább ellentmondásosak. Egyes kutatók szerint a szobahőmérsékleten tárolt oldatok 1–3 napig [56, 167, 49], egy hétig [195], vagy akár egy hónapig is használhatóak [164]. Mások a hűtőszekrényben tárolt oldatokkal egy hétig [47, 60, 162, 163] vagy akár három hétig [51] is dolgoztak. A felhasználás időtartalmával kapcsolatos kutatásokat Vasánits Anikó doktori dolgozata tartalmazta.

Munkám egyik fő célja a származékképzési reakció során keletkező elsődleges termék további átalakulásából származó vegyületek szerkezetének felderítése. Korábbi ismert irodalmi adatok alapján Simons és munkatársai [168–171] részletesen tanulmányozták az OPA és a propil-amin reakcióját tiolcsoportot tartalmazó különböző segédreagensek jelenlétében. ^1H NMR módszerrel igazolták [170], hogy az OPA, Pr-NH₂ és tBu-SH reakciójában elsődlegesen keletkező származék (1-*terc*-butiltio-2-propil izoindol) szobahőmérsékleten átalakul egy nagyobb stabilitású vegyületté (1,3 di-*terc*-butiltio-2-propilizoindol) (**9. ábra**). A keletkező vegyület UV spektrumában egy gyenge “vörös eltolódás” észlelhető (333 nm-ről 344 nm-re) [170], miközben a moláris abszorpciója majdnem kétszeresére nőtt az elsődlegesen keletkező izoindolszármazékhoz képest ($9,3 \times 10^3$ -ról $17,0 \times 10^3$ -ra) [170]. Ezen eredmények alapján először azt feltételeztük, hogy az általunk vizsgált átalakulási termékek valószínűleg a megfelelő aminosavak 1,3-ditioszármazékaivá alakulnak, mert a reakcióidő előrehaladtával mennyiségük nagymértékben nőtt, a keletkező átalakulási termékek abszorpciós maximum értékei pedig ugyancsak hasonló “vörös eltolódást” mutattak (334 → 339 nm, lásd később), jól lehet eltérő mértékűt.



9. ábra. Egy amin OPA/*terc.*-butil-amin származékának irodalomban tanulmányozott átalakulása izoindolszármazékokká [205–208]

Saját kutatási eredményeink és az irodalomban talált eltérések és ellentmondások állítások, [172–179], valamint a fluoreszcens származék tulajdonságaival foglalkozó tanulmányok [62, 168–171] alapján, a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Mi az oka a hat aminosav (glicin, β -alanin, GABA, lizin, ornitin, hisztidin) OPA/MPA és OPA/NAC-származékai gyors átalakulásának, míg a többi aminosavszármazék viszonylag stabil?
2. Milyen kísérleti feltételek befolyásolják az átalakulást és hogyan?
3. Milyen mellékreakció eredményezi az OPA/MPA és OPA/NAC reagenssel képzett izoindolszármazékok átalakulását?
4. Hogyan lehet visszaszorítani ezen átalakulási reakció sebességét, azaz növelni az izoindolszármazékok stabilitását?
5. Hogyan aránylanak egymáshoz az OPA/MPA- és OPA/NAC-izoindolszármazékok fluoreszcenciás és UV válaszjelei, és hogyan változnak az OPA és a tiolvegyület molarányának változtatásakor?

6.2. Modellvizsgálatok az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok képződési mechanizmusának tanulmányozására

Az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok stabilitási vizsgálata szigorúan betartott körülmények között sok új és alapvető eredményhez vezetett. Ezen eredmények alapján a származékok stabilitásától függően két fő csoportot különböztethetünk meg (**8. táblázat**). Az első csoporthoz tartozó aminosavak OPA/tiol-származékai a HPLC felvételek alatt egy csúcsban eluálódnak és stabilak (1A. csoport), illetve viszonylag stabilak (1B. csoport), míg a második csoportba tartozó aminosavak azonos származékai a HPLC felvétel alatt két vagy több csúcsban eluálódnak, ezért bomlékonynak tekinthetők.

8. táblázat. Az általunk tanulmányozott aminosavak csoportosítása származékaik bomlékonysága alapján

1. csoport Stabil OPA/tiol-származékot adó aminosavak Egy csúcsban eluálódó származékok		2. csoport Bomlékony OPA/tiol-származékot adó aminosavak Több csúcsban eluálódó származékok	
1A. csoport Nagyon stabil	1B. csoport Enyhén bomlékony	2A. csoport A keletkező csúcsok területének összege állandó	2B. csoport A keletkező csúcsok területének összege csökken
alanin arginin aszparagin aszparaginsav cisztein fenilalanin glutamin glutaminsav izoleucin leucin metionin valin	szerin tirozin treonin triptofán	β -alanin GABA glicin lizin ornitin	hisztidin

A könnyebb érthetőség és áttekinthetőség érdekében az elsődlegesen keletkező, valódi OPA/tiol/aminosav-származék csúcsát AMINOSAV1 (pl: GLY1), míg a főcsúcs után eluálódó átalakulási termékeket a retenciós idejük függvényében AMINOSAV2, AMINOSAV3 stb. (pl: LYS2, LYS3 stb.) névvel jelöljük. Abban az esetben, ha a főcsúcs előtt is megjelenik egy átalakulási termék csúcsa, akkor az AMINOSAV0 névvel jelöljük. Az AMINOSAVX1 jelölés olyan ismeretlen eredetű, nagyon ritkán megjelenő csúcsokra utal, amelyek a főcsúcs előtt jelentkeznek, de nem egyeznek meg az AMINOSAV0 jelű csúccsal.

6.2.1. A többcsúcsot adó OPA/MPA/aminosav-származékok keletkezése és bomlása az idő függvényében

Az irodalmi adatok és vizsgálataink szerint a legbomlékonyabb hat aminosav (**8. táblázat**, 2. csoport), azaz a glicin, GABA, β -alanin, hisztidin, ornitin és lizin, már 7 perc reakcióidő után is, egynél több OPA/tiol-származékot szolgáltatnak. Az irodalomban ilyen átfogó, szisztematikus és sztöchiometrán alapuló vizsgálatokat eddig még nem végeztek, jóllehet a lizin OPA/ET [180] és OPA/MPA reagensekkel [60, 181, 182], a hidroxilizin OPA/MPA reagenssel [180], az ornitin OPA/ET [180] és OPA/MPA [60] reagensekkel, valamint korábban a GABA OPA/IBLC~IBDC [180] reagensekkel készített származékok egynél több csúcsban történő elúcióját már leírták.

Mindezek ismeretében valamennyi fontos aminosavra kiterjedő sztöchiometriai vizsgálatokat terveztünk. Az elővizsgálatok alapján négyféle törzsoldatot készítettünk (**5.4. fejezet**).

1. Az egyetlen OPA/tiol-származékot adó aminosavakat két csoportba osztottuk és így kétféle standard oldatot (ST1 és ST2) készítettünk.
2. Az egynél több OPA/tiol-származékot adó 6 aminosavból, a termékek retenciós idejét és mennyiségi értékelését szem előtt tartva – hármat-hármat (ST3 és ST4) egy-egy csoportban elemeztünk.

Ilyen módon, mindösszesen 24 aminosav stabilitását vizsgáltuk, négy törzsolatban, OPA/MPA és OPA/NAC reagensekkel. A reakcióelegyet 4 °C-on tartottuk és majd 7 perc, 3 óra és 6 óra reakcióidők után, szigorúan betartott kísérleti körülmények között vizsgáltuk. A HPLC rendszerbe 10 μ l oldatot injektáltunk és a termékek mennyiségét UV abszorbanciájuk és fluoreszcenciás intenzitásuk alapján egyidejűleg mértük (**9–10. táblázat**, **10. ábra**).

9. táblázat. Az OPA/NAC/aminosav-származékok stabilitása a reakcióidő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra)

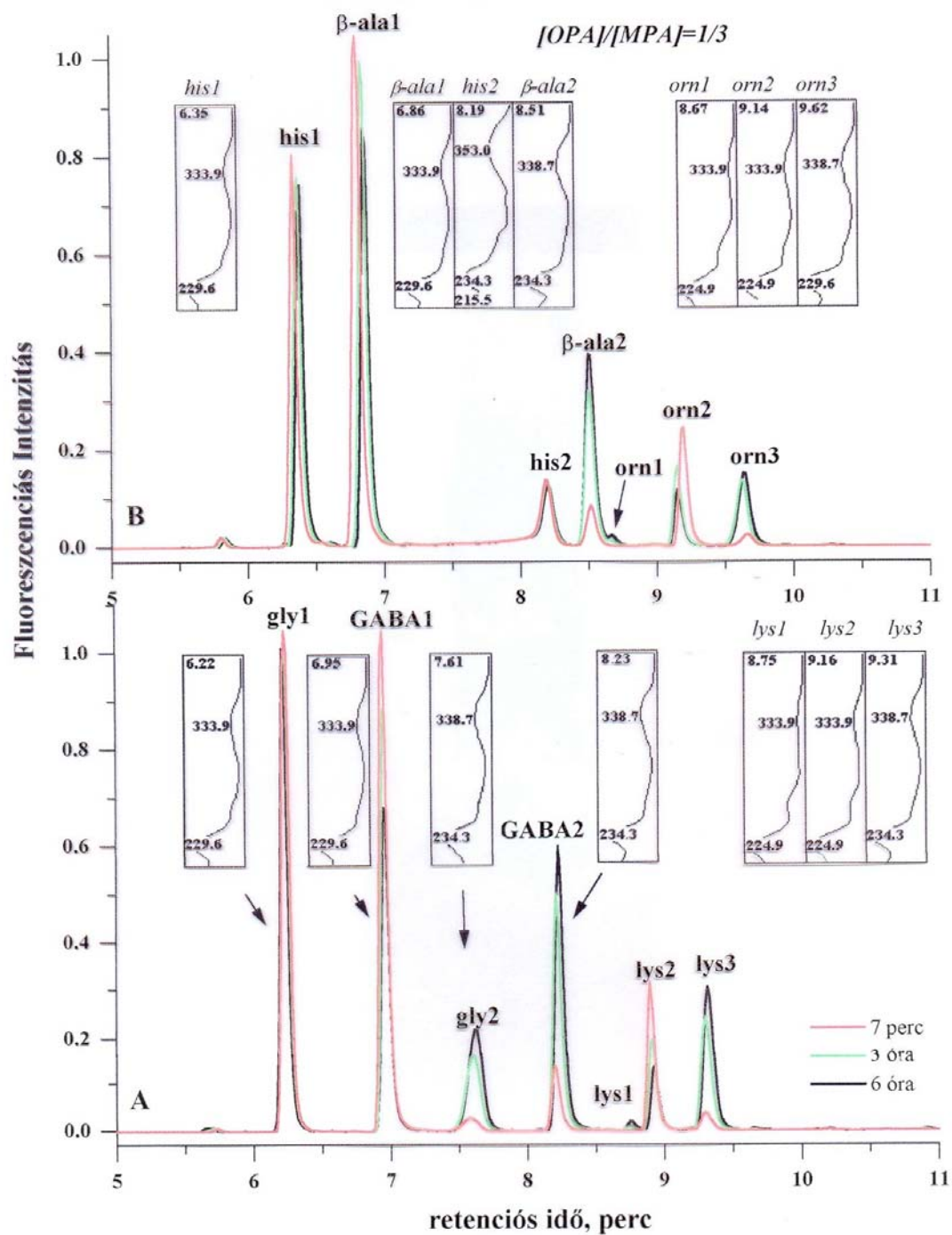
Aminosav	Retenc. Idő* (perc)	UV Max (nm)	Fl detektálás			UV detektálás		
			OPA/NAC = 1/3**					
			Válaszjel (%)****			Válaszjel (%)***		
			7 perc	3 óra	6 óra	7 perc	3 óra	6 óra
GLY0	5,88	334	0,1	0,1	0,1	0,6	0,8	0,8
GLY1	6,43	334	95,7	82,3	75,4	97,0	84,4	74,9
GLY2	7,88	339	4,2	17,6	24,5	2,4	14,8	24,3
Int. Egy./pM			5,43	5,68	5,74	0,4	0,45	0,45
GABA0	6,13	334	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
GABA1	6,93	334	96,6	80,3	68,9	96,3	80,5	68,9
GABA2	7,88	339	3,3	19,4	30,6	3,6	19,2	30,4
Int. Egy./pM			5,01	5,19	5,23	0,4	0,43	0,43
β-ALA0	7,62	334	–	–	–	–	–	–
β-ALA1	8,68	334	96,0	84,2	78,5	94,9	85,7	78,5
β-ALA2	12,32	339	4,0	15,8	21,5	5,1	14,3	21,5
Int. Egy./pM			4,57	4,69	4,79	0,4	0,42	0,42
HIS0	5,70	334	4,3	4,7	4,8	5,0	5,7	5,7
HIS1	8,12	334	40,5	41,5	44,1	64,0	65,0	64,1
HIS2	12,07	353	55,2	53,8	51,1	31,0	29,3	30,2
Int. Egy./pM			3,86	3,65	3,48	0,3	0,33	0,33
ORN0	9,80	334	–	–	–	–	–	–
ORN1	13,08	334	88,5	66,1	53,9	96,2	80,1	69,3
ORN2	13,40	339	11,5	33,9	46,1	3,8	19,9	30,7
ORN3	14,98	334	–	–	–	–	–	–
Int. Egy./pM			1,06	1,21	1,35	0,5	0,59	0,59
LYS0	7,58	334	–	–	–	–	–	–
LYS1	8,92	334	93,3	62,6	46,6	96,5	75,8	61,7
LYS2	9,48	339	6,7	37,4	53,4	3,5	24,2	38,3
LYS3	11,63	334	0,0	–	–	–	–	–
Int. Egy./pM			2,03	2,4	2,66	0,8	0,82	0,81

Jelölések: * = Az OPA/NAC származék retenciós ideje (a megfelelő OPA/MPA származék pár másodperccel később eluálódik); ** = [OPA]/[NAC]/[aminosav] = 20/60/1 (ahol 1 = 10⁻⁹); *** = %, a teljes válaszjelben kifejezve.

10. táblázat. Az OPA/MPA/aminosav-származékok stabilitása a reakcióidő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra).

Aminosav	Retenc. Idő (perc)	Fl detektálás		
		OPA/MPA = 1/3*		
		Válaszjel (%)**		
		7 perc	3 óra	6 óra
GLY1	6,47	94,6	54,8	52,3
GLY2	8,06	5,4	45,2	48,7
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		4,92	3,71	1,73
UV		0,39	0,24	0,12
GABA1	7,36	83,7	31,9	26,6
GABA2	8,98	16,3	68,1	73,4
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		5,84	3,45	1,24
UV		0,40	0,20	0,07
β-ALA1	6,95	91,0	45,5	40,7
β-ALA2	8,75	9,0	54,5	59,3
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		5,14	3,65	1,50
UV		0,62	–	0,09
HIS1	6,45	70,2	61,9	67,5
HIS2	8,23	29,8	38,1	32,5
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		4,91	3,17	2,95
UV		0,33	0,27	0,20
ORN0,1	8,15	–	1,0	1,9
ORN0	8,50	–	3,2	5,3
ORN1	8,78	–	11,3	21,9
ORN2	9,48	77,8	10,6	4,7
ORN3	10,02	22,2	62,3	28,6
ORN4	10,88	–	11,6	37,6
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		1,44	1,35	1,07
UV		0,57	0,42	0,34
LYS0,2	8,33	–	4,7	9,5
LYS0,1	8,73	–	2,3	5,5
LYS0	8,87	–	2,3	5,2
LYS1	9,38	–	11,6	25,2
LYS2	9,80	78,5	10,8	4,3
LYS3	10,28	21,5	68,8	50,3
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		2,57	2,84	1,82
UV		0,70	0,53	0,41
ε-amino-kapronsav0	8,65	82,8	20,9	15,1
ε-amino-kapronsav1	9,52	17,2	79,1	84,9
<i>Int. Egy./pM:Fl</i>		5,62	2,60	0,70
UV		0,36	0,10	0,04

Jelölések: * = [OPA]/[NAC]/[aminosav] = 20/60/1 (ahol 1 = 10⁻⁹); ** = %, a teljes válaszjelben kifejezve.



10. ábra. A 2. csoportba tartozó aminosavak (ST3: hisztidin, β -alanin, ornitin, ST4: glicin, GABA és lizin) OPA/MPA-származékainak fluoreszcenciás detektálási kromatogramjai, a kölcsönhatás idejének függvényében és a származékok PDA spektromjai

E vizsgálatok eredményei alapján megállapítható:

1. Az egyetlen OPA/tiol/aminosav-származékot szolgáltató aminosavszármazékok stabilitása nagy, mivel a mért válaszjel csökkenése <3% (**11. táblázat**; 1A. és 1B. csoport).
2. Vannak olyan aminosavak, amelyek származékai egy csúcsban eluálódnak ugyan, de intenzitásuk hosszabb reakcióidők után 3%-kal csökken (1B. csoport, l. később a **11. táblázat** és **11. ábra**). Amint az adatok mutatják, 6 óra elteltével a stabilitáscsökkenés mértéke az OPA/NAC-származékok esetében 88–94%, az OPA/MPA-származékok esetében 93–97% között változott, ami arra utal, hogy rövidebb várakozási idővel ezek az aminosavak biztonságosan, reprodukálhatóan és pontosan mérhetők.
3. Az egynél több terméket adó, azaz a 2. csoportba tartozó glicin, GABA, β -alanin, hisztidin, ornitin és lizin (**9. és 10. táblázat**) OPA/tiol-származékainak stabilitásvizsgálata azt mutatta, hogy ezek az aminosavak gyorsan, akár 1 óra alatt is jelentős bomlást szenvednek, a főcsúcs intenzitása csökken, míg az átalakulási termékek csúcsai nőnek.
4. Eredményeinkből levonható az az újszerű és egyértelmű következtetés, hogy a hisztidin kivételével (2B. csoport), az elsődlegesen és az átalakuláskor keletkező csúcsok UV abszorbanciájának és/vagy fluoreszcenciás intenzitásának összege időben állandó (**12. táblázat**).

11. Táblázat. Az egy átalakulási terméket adó aminosavak, valamint az α -aminovajsav és a β -aminovajsav OPA/MPA-származékainak stabilitása a reakcióidő függvényében, UV és FI detektálással vizsgálva

	FI detektálás					UV detektálás					RR
	Int. egység/pM				RSD	Int. egység/pM				RSD	
	7 perc	3 óra	6 óra	átlag		7 perc	3 óra	6 óra	átlag		
α-aminovajsav	5,26	5,27	5,24	5,26	0,29	0,38	0,38	0,38	0,38	0	13,9
β-aminovajsav	5,34	5,41	5,41	5,39	0,75	0,37	0,37	0,36	0,37	1,6	14,7
GLU	4,57	4,57	4,57	4,57	0	0,36	0,39	0,39	0,38	4,6	12,0
ASP	4,53	4,52	4,50	4,52	0,34	0,39	0,37	0,38	0,38	2,6	11,9
ASN	4,74	4,74	4,73	4,74	0,12	0,36	0,36	0,36	0,36	0	13,2
GLN	4,58	4,57	4,57	4,57	0,13	0,36	0,36	0,35	0,36	1,6	12,7
SER	5,36	5,27	5,17	5,27	1,8	0,42	0,41	0,40	0,41	2,4	13,1
ALA	5,15	5,22	5,21	5,19	0,73	0,39	0,39	0,38	0,39	1,5	13,4
THR	4,24	4,17	4,14	4,18	1,2	0,35	0,35	0,35	0,35	0	11,9
TYR	5,32	5,28	5,28	5,29	0,44	0,38	0,36	0,36	0,36	1,6	14,7
VAL	5,71	5,78	5,80	5,76	0,82	0,41	0,41	0,41	0,41	0	14,0
PHE	5,73	5,85	5,90	5,82	1,5	0,42	0,42	0,43	0,42	1,4	13,9
LEU	5,73	5,85	5,90	5,83	1,5	0,42	0,42	0,43	0,42	1,4	13,9
ARG	5,21	5,21	5,18	5,20	0,33	0,37	0,37	0,37	0,37	0	14,1
MET	5,31	5,25	5,22	5,26	0,87	0,37	0,37	0,37	0,37	0	14,1
TRP	3,95	3,93	3,84	3,90	1,5	0,31	0,31	0,31	0,31	0	12,6
ILE	6,52	6,38	6,48	6,46	1,1	0,42	0,40	0,41	0,41	2,4	12,7

RR = FI/UV válaszjel alapján; [OPA]/[MPA]/[AA] = 20/60/1; 1 = 10⁻⁹

12. Táblázat. A 2. csoportba tartozó OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok és átalakult termékeik összegének reprodukálhatósága (*Összeadásos módszer*, lásd később) az aminosavak eltérő mennyiségében mérve (A, B = A/2, C = A/4, D = A/8), állandó OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok = 20/60/1 mólarányok mellett

Aminosavak↓ Reakcióidő⇒	A			B			C			D			A-D Átlag	RSD %
	7p	3ó	6ó	7p	3ó	6ó	7p	3ó	6ó	7p	3ó	6ó		
OPA/MPA/aminosav-származékok: Int egység /pM														
GLY0,1,2	0,41	0,37	0,27	0,39	0,39	0,36	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	3,3
GABA0,1,2	0,39	0,33	0,20	0,39	0,38	0,38	0,41	0,41	0,39	0,38	0,41	0,40	0,39	5,6
β-ALA0,1,2	0,41	0,34	0,20	0,39	0,38	0,35	0,38	0,41	0,38	0,38	0,38	0,37	0,38	4,6
ORN1-4	0,62	0,56	0,46	0,60	0,56	0,49	0,59	0,56	0,57	0,60	0,55	0,46	0,58	4,2
LYS1-4	0,71	0,71	0,61	0,71	0,71	0,66	0,72	0,71	0,70	0,70	0,41	0,38	0,70	2,3
OPA/NAC/aminosav-származékok: 0,71 Int egység /pM														
GLY0,1,2	0,44	0,45	0,42	0,42	0,43	0,42	0,42	0,42	0,42	0,41	0,40	0,40	0,42	3,4
GABA0,1,2	0,42	0,44	0,39	0,42	0,42	0,42	0,42	0,43	0,42	0,39	0,41	0,39	0,41	3,9
β-ALA0,1,2	0,42	0,42	0,38	0,42	0,43	0,42	0,41	0,43	0,43	0,38	0,38	0,37	0,41	5,6
ORN1-4	0,62	0,62	0,58	0,60	0,60	0,60	0,62	0,63	0,63	0,60	0,61	0,61	0,61	2,4
LYS1-4	0,77	0,73	0,70	0,74	0,74	0,75	0,73	0,71	0,72	0,73	0,73	0,74	0,73	2,5

Jelölések: Átlag=az A-D értékek átlaga, kivéve a dőlt betűkkel jelölt értékeket; Koncentrációk: A:[OPA]/[MPA]([NAC]) = $7,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ / $22,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ / $3,9 \times 10^{-8} \text{ M}$;

Ezzel egyértelműen igazolható volt az a következtetés, hogy a 2. csoportba tartozó, egynél több terméket szolgáltató összes aminosavszármazék esetében, az elsődlegesen keletkező izoindoltermékek (GLY1, GABA1, β -ALA1, HIS1, ORN2, LYS2) továbbalakulásáról van szó, azaz, az átalakulási termékek (GLY2, GABA2, β -ALA2, HIS2, ORN1,3 és LYS1,3) az elsődlegesen keletkező termékek mennyiségének csökkenése árán kvantitativ keletkeznek (9. és 10. táblázat, 10. ábra).

Az ismertetett, újszerű tapasztalatból kiindulva, az egynél több csúcsot szolgáltató aminosavak elemzésére is mennyiségi módszert javasoltunk: a származékképzés termékeit a keletkező csúcsok összege alapján értékeltük ($\Sigma \text{AMINOSAV} = \text{AMINOSAV1} + \text{AMINOSAV2} \dots$), amit a későbbiekben az *összegzésen alapuló módszernek* nevezzük.

Eredményeink az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Bár az alkalmazott körülmények között a glicin és lizin elsődleges OPA/MPA- és OPA/NAC-terméke (GLY1, LYS1) jelentősen csökkent, de származékainak összege (GLY1+GLY2, LYS1+LYS2+...) 6 óra elteltével is állandónak bizonyult, ezáltal az *összegzésen alapuló módszerrel* biztonsággal mérhetőek.
2. A GABA, β -alanin és ornitin esetében a származékok összegének csökkenése 2-10% között változott, ami már az *összegzésen alapuló módszer* alkalmazása esetében is jelentős hibát jelent, de a termékek legalább mérhetővé válnak.
3. A 2B. csoportba tartozó hisztidin esetében a többi öt aminosavhoz viszonyítva eltérő viselkedést tapasztalhatunk. A HIS1 és HIS2 csúcsok csaknem egyidejűleg keletkeznek, s a reakcióidő előrehaladtával csaknem egyidejűleg csökkennek. Az alkalmazott körülmények között, 6 óra elteltével az OPA/MPA reagenssel képzett származékok csúcsainak összege 37%-ra, míg az OPA/NAC- reagenssel képzett származékok csúcsainak összege 18%-ra csökkent.

Mindezek alapján kitűnik, hogy 7 perc reakcióidő után a termékek összegének mennyiségi értékelés céljából történő meghatározása valamennyi vizsgált esetben megfelelően kivitelezhető. Mivel az átalakult termékeket már reprodukálhatóan tudtuk előállítani, lehetőség nyílt arra, hogy felderítsük ezek szerkezetét.

6.2.2. Az izoindol-aminosavak és az izoindol-aminok spektrális jellemzői

Az aminosavszármazékok spektrumait a 200 nm-től 400 nm-ig tartó tartományban vizsgáltuk. A HIS2 csúcs kivételével, mind a tioltartalmú segédreagens anyagi minőségétől, mind az aminosav fajtájától függetlenül, a spektrum minden esetben azonos. A mért spektrumban két elnyelési maximumot (229–234 nm és 334–339 nm) észlelhetünk (**10. táblázat**). A több csúcsban eluálódó aminosavszármazékok második és harmadik csúcsainak spektrumában a maximumok kis mértékű batokróm (“vörös”) eltolódást szenvednek (334 nm-ről 339 nm-re). A másodlagosan átalakult termékek szinte teljesen megegyező UV spektrumai arra utalnak, hogy az így keletkező termékek szerkezete – a hisztidinszármazék kivételével minden aminosavnál azonos. A HIS2 csúcs esetében az eltolódás még nagyobb mértékű (334 nm-ről 353 nm-re), jelezve, hogy itt az elsődlegesen képződő származék átalakulási termékeik a többiekől eltérő szerkezetűek, ami az imidazolgyűrű jelenlétével magyarázható.

Az UV és a fluoreszcenciás detektorok együttes használatának köszönhetően, egy kromatográfiás felvétel alatt a fluoreszcenciás intenzitást és az UV elnyelést egyidejűleg mérhettük, ami lehetőséget teremtett arra, hogy a kapott UV és fluoreszcenciás jelek hányadosaként egy válaszfájlárányt állapítsunk meg („response ratio”, továbbiakban $RR = FI/UV$, 334 nm-en mérve). Az RR érték jobban kihangsúlyozza a származékok spektrális tulajdonságainak eltéréseit, utalva a szerkezeti különbségekre. Általában az aminosavak OPA/MPA reagenssel alkotott származékainak RR értéke 14,0 és 19,2 között változott, és ebben a tartományban található a GLY1 (15,9), HIS1 (15,8), β ALA1 (17,2) és GABA1 (18,1) RR értékei is. Az OPA/NAC reagens alkalmazásakor alacsonyabb RR értékeket kaptunk (9,0–14,7), de míg a HIS1 (10,8) és GABA1 (14,6) itt is ezen értékek között található, addig a GLY1 (15,5) és β ALA1 (15,1) kis mértékben meghaladja azokat.

Az ornitinnél és a lizinnél az elsődlegesen és másodlagosan keletkező termékek (ORN2: 2,4 és 2,2, LYS2: 3,8 és 2,8) RR adatai meglepően alacsonyak, mind az OPA/MPA, mind az OPA/NAC származékképző reagensek alkalmazása esetében. Itt meg kell jegyezni, hogy az elsődlegesen keletkező származékok a két primer aminocsoportnak köszönhetően két izoindol egységet tartalmaznak. A itt tapasztalt alacsony RR értékek azzal magyarázhatóak, hogy míg a fluoreszcenciás intenzitás az izoindolcsoportok belső elektroneloszlási viszonyainak a függvénye [183], addig az UV abszorbanancia az izoindolcsoportok számával arányos [170]. Analóg módon alacsony RR értékeket mértek a diszubsztituált DABZYL- [183] és AQC-aminosavszármazékoknál [97] is; az $(AQC)_2$ -lizin relatív fluoreszcenciája 31% a fenilalaninhoz képest, míg moláris abszorpciója 1,6-szerese a többi aminosavénak [97].

6.2.3. Az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok mennyiségi meghatározásának reprodukálhatósági vizsgálata

Először állandó OPA/MPA, illetve OPA/NAC = 1 : 3 arány és állandó reagenskoncentráció mellett az OPA/aminosav arányt változtattuk 6,89–110,4 értékek között, ahol az aminosavkoncentráció alatt az összes jelenlévő aminosav koncentrációjának összegét értjük. A reprodukálhatósági eredményeket a **13. táblázat** tartalmazza. A mérések során az OPA/MPA, és az OPA/NAC oldatok koncentrációját nem változtattuk, így az OPA felesleg az aminosavaknál összegéhez képest 6,89–110,4-szoros volt. A különböző aminosavak esetében a linearitás más-más OPA/aminosav arány esetében szűnik meg. Az aszparaginsav és a szerin esetében a 6,89-szeres OPA felesleg még nem bizonyult elegendőnek (**13. táblázat**) a linearitáshoz, ezért a kvantitatív meghatározás érdekében legalább 20-szoros felesleggel kell dolgozni. A minták stabilitásából megállapítható, hogy önmagában a magas reagenskoncentráció (a magas OPA/aminosav arány) nem csökkenti a bomlás sebességét, azaz nem növeli a stabilitást. A szennyező csúcsok értékeinek levonásával, és a több csúcsban eluálódó aminosav származékoknál az *összegzésen alapuló módszert* alkalmazva, a mennyiségi meghatározás reprodukálhatósága az OPA/MPA-származékok esetében kitűnő (R.S.D.% $\leq 2,8$), az OPA/NAC esetén ugyancsak elfogadható (R.S.D.% $\leq 4,4$) eredményeket hozott.

13. táblázat. Különböző aminosavak OPA/MPA-származékainak fluoreszcens válaszjele és reprodukálhatósága különböző aminosav/reagens arány mellett.

Aminosav	Önkényes egység / 1 pM aminosav					Átlag	RSD %	
	pM	[OPA]/[MPA]/[AA]						
	injektált	6,89:1 ^a	13,8:1 ^a	27,6:1 ^a	110,4:1 ^a			
1	aszparaginsav	5960	2,94	3,07	3,13	3,09	3,05	2,8
2	glutaminsav	2630	3,78	3,84	3,79	3,93	3,80	1,8
3	aszparagin	12012	3,15	3,34	3,42	3,56	3,30	5,2
4	szerin-*1	1724	3,96	4,02	3,83	3,84	3,94	2,4
5	glutamin	262,1	4,15	4,08	3,96	4,00	4,06	2,1
6	hisztidin	286,6	1,33	2,04	1,95	2,16	2,05	5,1
7	+16 (GLY1-*2)+GLY2	351,8	2,83	2,86	2,86	2,77	2,85	1,5
8	homoszerin	219,7	4,13	4,11	4,20	3,95	4,15	2,5
9	treonin	241,8	2,45	2,39	2,30	2,51	2,38	3,8
10	+20 β-ALA1+β-ALA2	370,6	2,12	2,05	1,82	1,45	2,00	7,9
11	arginin	278,6	2,40	2,29	2,12	2,09	2,27	6,4
12	alanin-*3	408,3	2,35	2,32	2,35	2,33	2,34	0,64
13	+21 GABA1+ GABA2	360,3	2,47	2,44	2,36	2,08	2,42	2,3
14	homoarginin	95,5	2,51	2,51	2,49	2,58	2,50	1,6
15	tirozin-*4	227,0	2,68	2,76	2,81	2,88	2,75	3,1
16	valin-*5	234,7	2,59	2,60	2,57	2,58	2,59	0,50
18	metionin	230,4	2,40	2,30	2,09	1,51	2,26	7,0
19	cisztein	237,9	0,050	0,048	0,047	0,055	0,050	7,1
22	triptofán	229,5	2,05	1,97	1,87	1,84	1,96	4,9
23	fenilalanin-*6	266,1	2,57	2,63	2,63	2,48	2,61	2,7
24	izoleucin	195,9	2,85	2,83	2,83	2,77	2,84	1,2
25	leucin	317,4	2,73	2,76	2,85	2,93	2,78	3,3
26	+28 ORN2+ORN3	329,3	0,695	0,701	0,666	0,680	0,687	2,3
27	+29 (LYS2-*7)+LYS3	248,9	0,960	0,980	0,959	1,012	0,966	2,6

Legalább három független kísérletből számolva; A dőlt értékeket kihagytuk az átlagból, ^a[OPA] = 5,73 x 10⁻⁶;

6.2.4. Az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok összehasonlító vizsgálata

Érdemes megvizsgálni, hogy az irodalomban a két leggyakrabban alkalmazott, eltérő kémiai tulajdonságú segédreagens, az MPA és a NAC, hogyan befolyásolja a keletkező aminosavszármazékokat. Az összehasonlításkor a következőket tapasztaltuk.

1. Az aszparaginsav és glutaminsav kivételével, az adott OPA/NAC/aminosav-származékok retenciós ideje körülbelül 0,05–0,90 perccel rövidebb, mint az OPA/MPA társaiké, ami a NAC molekulában lévő poláris hidrofíl *N*-acetyl és COOH csoportokkal magyarázható.
2. Az OPA/MPA-származékok esetében átlagosan mintegy 20%-al nagyobb fluoreszcenciás intenzitásokat detektáltunk, mint az OPA/NAC-származékokénál (átlagos integrátor-egység/1 pmol aminosav: 3,48 és 2,82).
3. A származékok UV spektrumai teljesen függetlenek voltak a segédreagens anyagi minőségétől (**10. táblázat**).
4. A 6 órás eredményeket tekintve, az OPA/MPA-származékoknál az egy csúcsban eluálódó származékok stabilitása kicsit nagyobb, mint az OPA/NAC-analógoknál. A több csúcsban eluálódó aminosavak esetében, az OPA/NAC-származékok bizonyultak stabilabbaknak, ahol az elsődlegesen keletkező csúcsok kisebb mértékben alakulnak át. Ráadásul, a NAC segédreagenst alkalmazva az ornitinnél és lizinnél csak egy másodlagos csúcs jelentkezik.

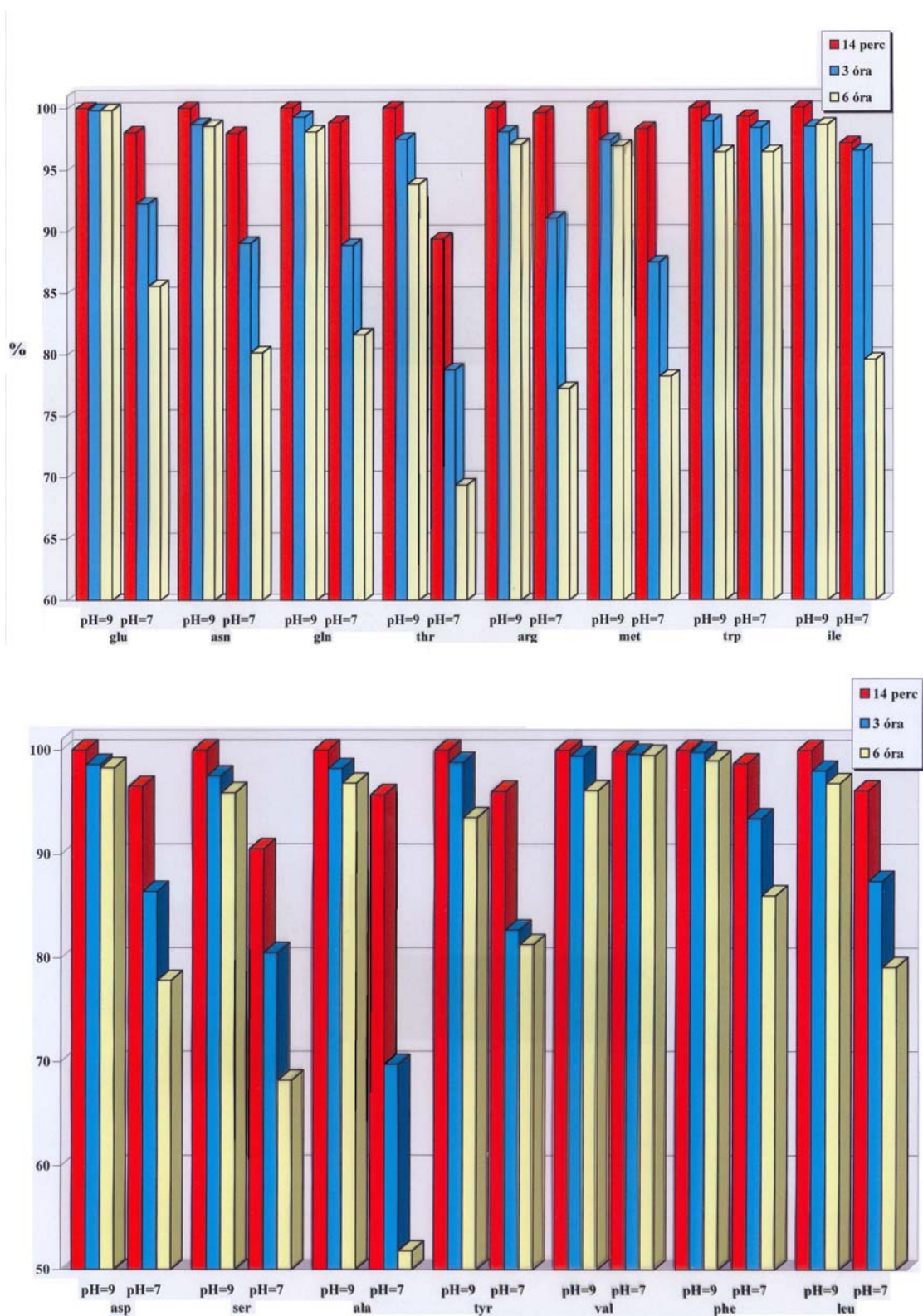
Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a az OPA/NAC- és OPA/MPA-származékok kromatográfiás tulajdonságai nagyon hasonlóak. Megfelelő körülmények között stabil származékokat képeznek {a reakcióelegy $\sim 4^\circ\text{C}$ hőfokú termosztálása, 7 perces reakcióidő, 90 perces, 9 napos reagens oldatok, közelítőleg 20-szoros OPA felesleg és megfelelő pH érték ($\approx 9,3$) származékkészítéskor}. Az egyetlen lényeges különbség, hogy az OPA/NAC reagenssel a D- és L-aminosavak különálló csúcsot képeznek, ami megkétszerezheti az elválasztandó csúcsok mennyiségét a kromatogramban, de lehetőséget nyújt az enantiomerek kvantitatív meghatározására.

6.2.5. Aminosavak OPA/MPA- és OPA/NAC-származékainak stabilitása eltérő pH értékű oldatokban

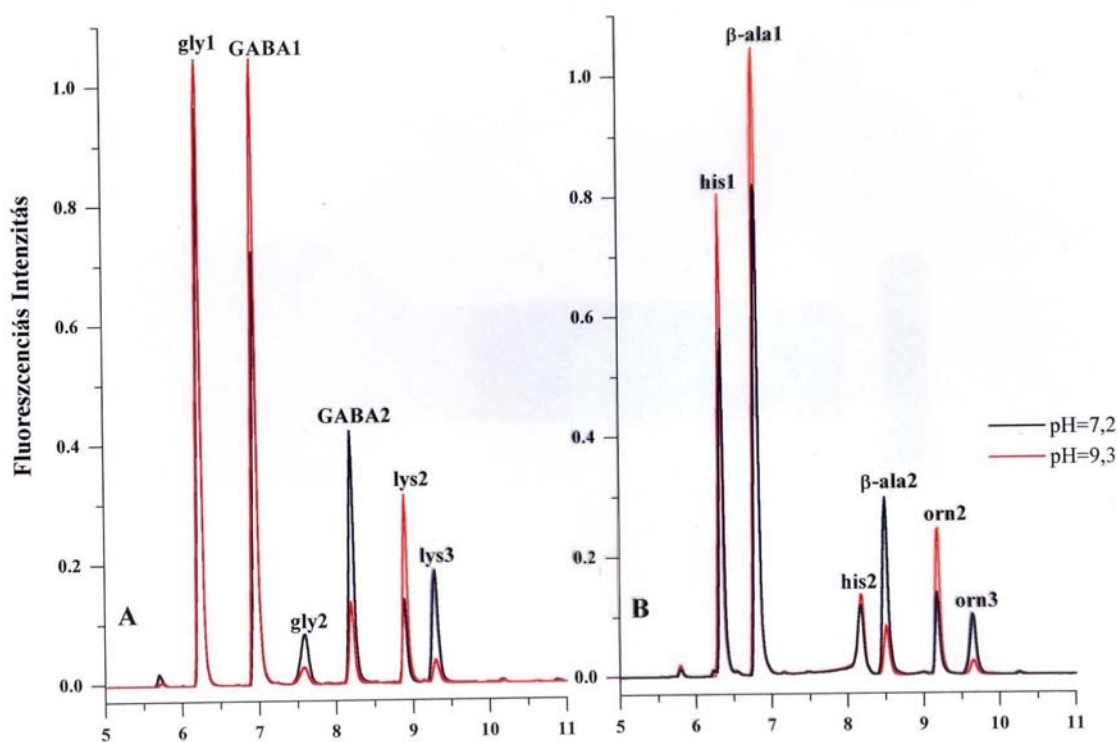
Mivel az irodalomban a származékképzés során különböző pH-jú közeget alkalmaztak, ezért mi is fontosnak tartottuk az aminosavak OPA/tiol-származékainak pH függését a reakcióidő függvényében tanulmányozni (**11. ábra**), különösképpen a több csúcsot adó aminosavak esetében (**14. ábra**). Itt ugyanazt az HPLC körülményt alkalmaztuk, amit az eddigi stabilitásvizsgálatokban. Két különböző pH-jú reakcióközegben tanulmányoztuk az aminosavszármazékok bomlásának sebességét, amire a 0, 7 perces illetve 3 óra és 6 óra reakcióidőknél vett mintavételek összehasonlításából következtettünk.

14. táblázat. Különböző aminosavak OPA/MPA-származékainak fluoreszcens válaszele és reprodukálhatósága különböző pH-jú reakcióelegyek.

Aminosav		A termékek %-a, az arány %-ában kifejezve																D%
Reakcióidő	Termék	14 p		1,5 ó		3 ó		6 ó		14 p		1,5 ó		3 ó		6 ó		14p/6h
pH		9,3	7,2	9,3	7,2	9,3	7,2	9,3	7,2	9,3	7,2	9,3	7,2	9,3	7,2	9,3	7,2	
GLY0	1	0,2	1,0	0,4	9,6	0,4	17,4	0,6	30,8	0,1	1,0	0,1	5,7	0,1	11,4	0,1	24,6	
GLY1	2	94,5	84,3	83,3	67,8	77,0	60,0	69,9	50,8	95,7	91,5	87,5	78,8	82,3	68,8	75,4	51,4	
GLY2	4	5,3	15,0	16,3	22,6	22,6	22,6	29,5	18,4	4,2	7,5	12,4	15,5	17,6	20,0	24,5	24,0	
Int. egység/pM	Fl	5,26	4,67	5,68	3,85	5,86	3,08	5,95	2,12	5,43	4,65	5,55	4,29	5,68	3,87	5,74	3,06	
	UV	0,42	0,34	0,43	0,31	0,43	0,27	0,41	0,21	19/49	0,43	0,36	0,44	0,35	0,45	0,34	0,45	0,30
HIS0	1	1,3	1,1	1,3	1,6	1,3	2,0	1,3	2,6	4,3	1,5	4,6	4,4	4,7	7,0	4,8	13,2	
HIS1	2	68,8	66,2	68,5	66,0	68,6	65,4	68,7	64,5	40,5	49,0	39,8	48,1	41,5	47,0	44,1	46,0	
HIS2	4	29,9	32,7	30,2	32,4	30,1	32,6	30,0	32,9	55,2	49,5	55,6	47,5	53,8	46,0	51,1	40,8	
Int. egység/pM	Fl	5,41	4,22	5,36	3,66	5,31	3,19	5,11	2,44	3,86	2,95	3,80	2,10	3,65	1,71	3,48	1,11	
	UV	0,37	0,30	0,37	0,28	0,37	0,25	0,37	0,21	19/43	0,35	0,25	0,34	0,20	0,33	0,16	0,33	0,10
β-ALA0	1	–	0,1	–	0,3	–	0,5	–	1,2	–	1,7	–	5,4	–	8,3	–	14,2	
β-ALA1	2	92,2	70,0	80,2	40,2	73,2	27,8	63,4	17,0	96,1	88,3	90,1	67,8	84,7	54,3	79,2	38,6	
β-ALA2	4	7,8	29,9	19,8	59,5	26,8	71,1	34,6	81,8	3,9	10,0	9,9	26,8	15,3	37,4	20,8	47,2	
Int. egység/pM	Fl	5,52	5,18	5,96	5,19	6,08	4,55	5,81	3,10	4,57	4,18	4,58	3,89	4,69	4,25	4,79	4,04	
	UV	0,42	0,35	0,42	0,33	0,41	0,28	0,38	0,19	17/50	0,40	0,35	0,40	0,34	0,42	0,33	0,40	0,30
GABA0	n.d.	–	–	–	0,1	–	0,3	–	0,4	0,1	0,6	0,2	4,8	0,3	9,1	0,5	17,6	
GABA1	3	88,0	60,3	70,9	27,0	61,9	14,1	52,3	3,3	96,6	87,8	97,7	68,4	80,3	53,6	68,9	33,8	
GABA2	5	12,0	39,7	29,1	12,9	38,1	85,6	47,7	96,3	3,3	11,6	12,1	26,8	19,4	37,7	30,6	48,6	
Int. egység/pM	Fl	5,78	5,04	6,44	5,05	6,49	4,53	6,19	3,40	5,01	4,24	5,11	4,27	5,19	4,25	5,23	4,03	
	UV	0,40	0,33	0,41	0,31	0,41	0,27	0,38	0,21	18/46	0,41	0,34	0,42	0,35	0,43	0,36	0,43	0,34
LYS1	n.d.	–	0,8	0,7	3,9	1,6	6,6	3,7	11,3	–	–	–	–	–	–	–	–	
LYS2	6	85,1	36,7	51,7	5,2	37,7	2,1	25,0	1,5	93,3	77,5	75,2	42,6	62,6	26,0	46,6	11,6	
LYS3	7	14,8	65,5	47,6	90,9	60,7	90,3	71,3	87,2	6,7	22,5	24,8	57,4	37,1	74,0	53,4	88,4	
Int. egység/pM	Fl	2,32	2,58	2,99	2,99	3,32	3,61	3,57	1,97	2,03	1,72	2,27	1,94	2,43	1,98	2,66	1,75	
	UV	0,77	0,57	0,78	0,49	0,77	0,42	0,77	0,32	26/58	0,82	0,64	0,83	0,59	0,82	0,55	0,81	0,44
ORN1	n.d.	–	2,0	1,6	6,3	3,8	11,0	6,9	20,2	–	–	–	–	–	–	–	–	
ORN2	6	13,0	48,4	57,8	14,1	44,5	7,2	32,4	4,6	88,5	79,9	72,5	58,8	66,1	43,4	53,9	28,6	
ORN3	7	13,0	49,6	40,6	79,6	51,7	81,8	60,7	75,2	11,5	20,1	27,5	41,2	33,9	56,5	41,2	71,4	
Int. egység/pM	Fl	1,52	1,57	1,82	1,82	1,96	1,68	1,92	1,25	1,06	1,08	1,14	1,00	1,21	1,05	1,35	0,80	
	UV	0,65	0,50	0,66	0,47	0,64	0,43	0,59	0,34	23/42	0,59	0,50	0,59	0,47	0,59	0,43	0,59	0,37



11. ábra. Az 1. csoportba tartozó OPA/MPA/aminosav-származékok válaszjelváltozása a reakcióidő és az oldat pH értékének függvényében

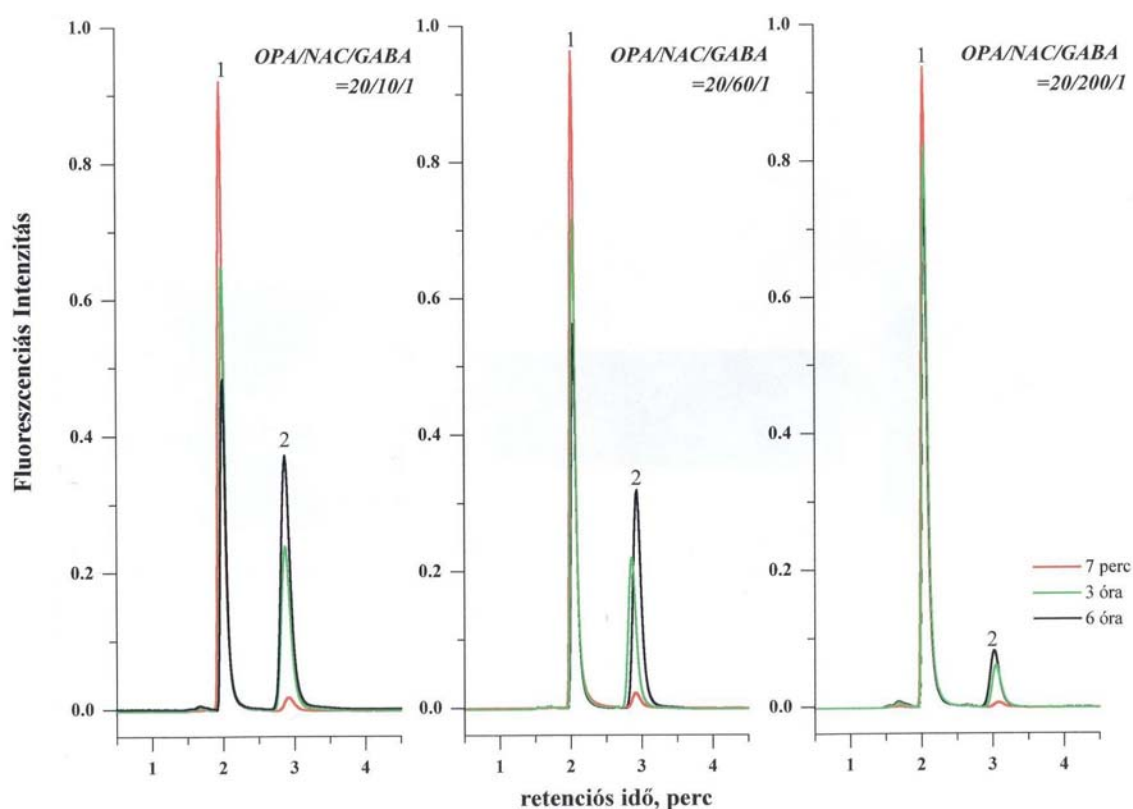


12. ábra. A 2. csoportba tartozó aminosavak (hisztidin, β -alanin, ornitin, glicin, GABA és lizin) OPA/MPA-származékainak fluoreszcenciás detektálású kromatogramjai az oldat pH értékének függvényében (Fekete: pH = 7,2; Piros: pH = 9,3).

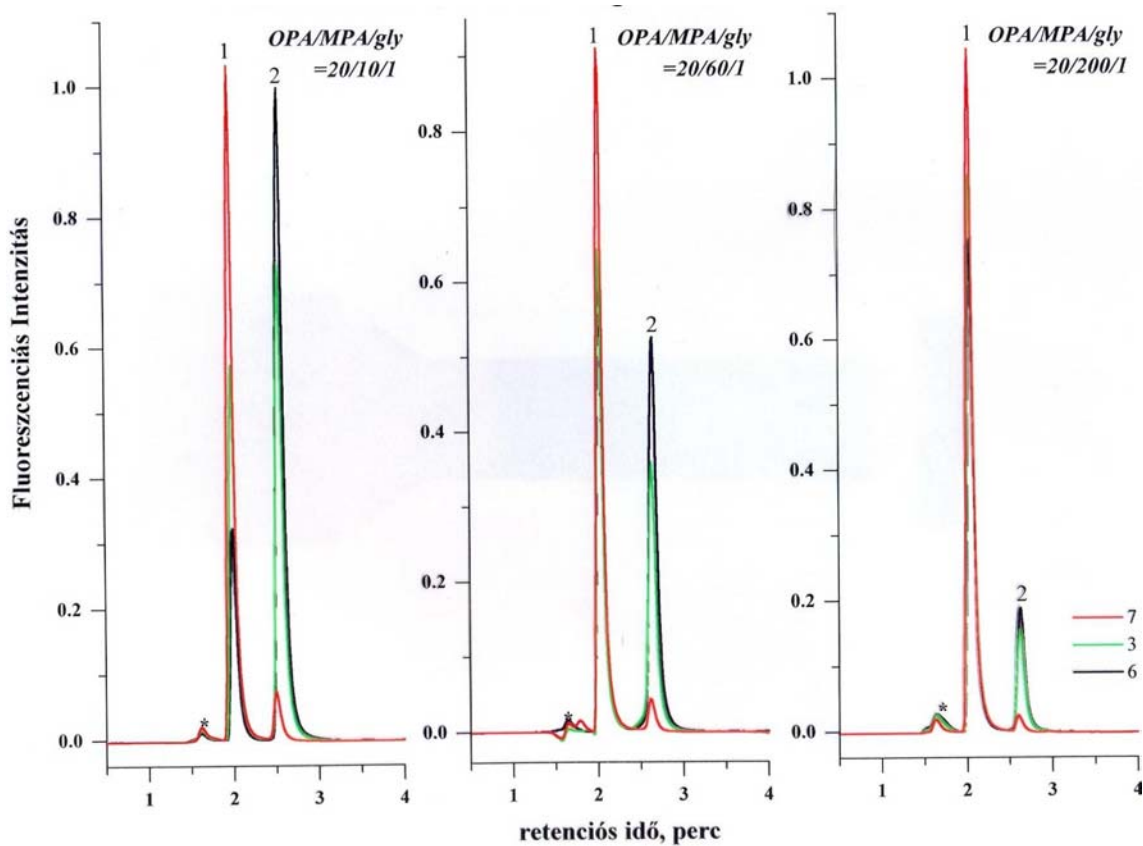
A vizsgálat középpontjában lévő, a 2. csoportba tartozó aminosavak esetében már 7 perces reakcióidő mellett is szignifikáns különbségeket lehetett észlelni és megállapítható, hogy a pH = 7,2-es reakcióközegben a bomlás sebessége sokkal nagyobb, mint pH = 9,3-nál. A többi, egy csúcsot adó aminosavat is ugyanazon körülmények között vizsgáltuk. Az adatok jól mutatják, hogy a származékok stabilitása sokkal nagyobb pH = 9,3-nál. Érdekes módon, az 1. csoportba tartozó aminosavak közül kivételt csak az alanin és a threonin képez, amelyek UV válaszjelei szokatlanul gyorsan csökkentek pH = 7,2-nél. Az alanin pH = 7,2-nél 6 óra múlva a felére csökken, miközben pH = 9,3-nál a stabilitás csak a hibahatáron belül változik. A threonin, amely pH = 7,2-nél 60%-os bomlást szenved el, míg pH = 9,3-on gyakorlatilag stabilnak tekinthető. Fontos megjegyezni, hogy az irodalomban találtunk olyan cikkeket, amelyekben pH = 7-nél, sőt pH = 5-nél dolgoztak, és csak a mi munkánk világít rá arra, hogy az optimális pH = 9,3.

6.2.6. Az OPA/MPA és OPA/NAC reagensösszetétel változtatásának hatása a stabilitásra.

Munkám következő lépéseként az OPA és a tiolvegyület arányát változtattuk, miközben az OPA és az aminosavak arányát állandó, 1:20 értéken tartottuk. Itt is az idő függvényében vizsgáltuk a 2. csoportba tartozó aminosavak átalakulását. Az OPA/tiol arányt az 1 : 0,5, az 1 : 3 és az 1 : 10 széles tartományban változtattuk (13. és 14. ábra). A kapott eredmények egyöntetűen azt mutatták, hogy a termékstabilitás a nagyobb NAC koncentrációnál jelentős mértékben nőtt. Míg az alacsony 1:0,5 OPA/tiol aránynál a bomlás gyors és az átalakult származékok jelentős mértékben keletkeznek, addig az 1:10 OPA/tiol arány mellett csak pár százalékos csökkenést mértünk.

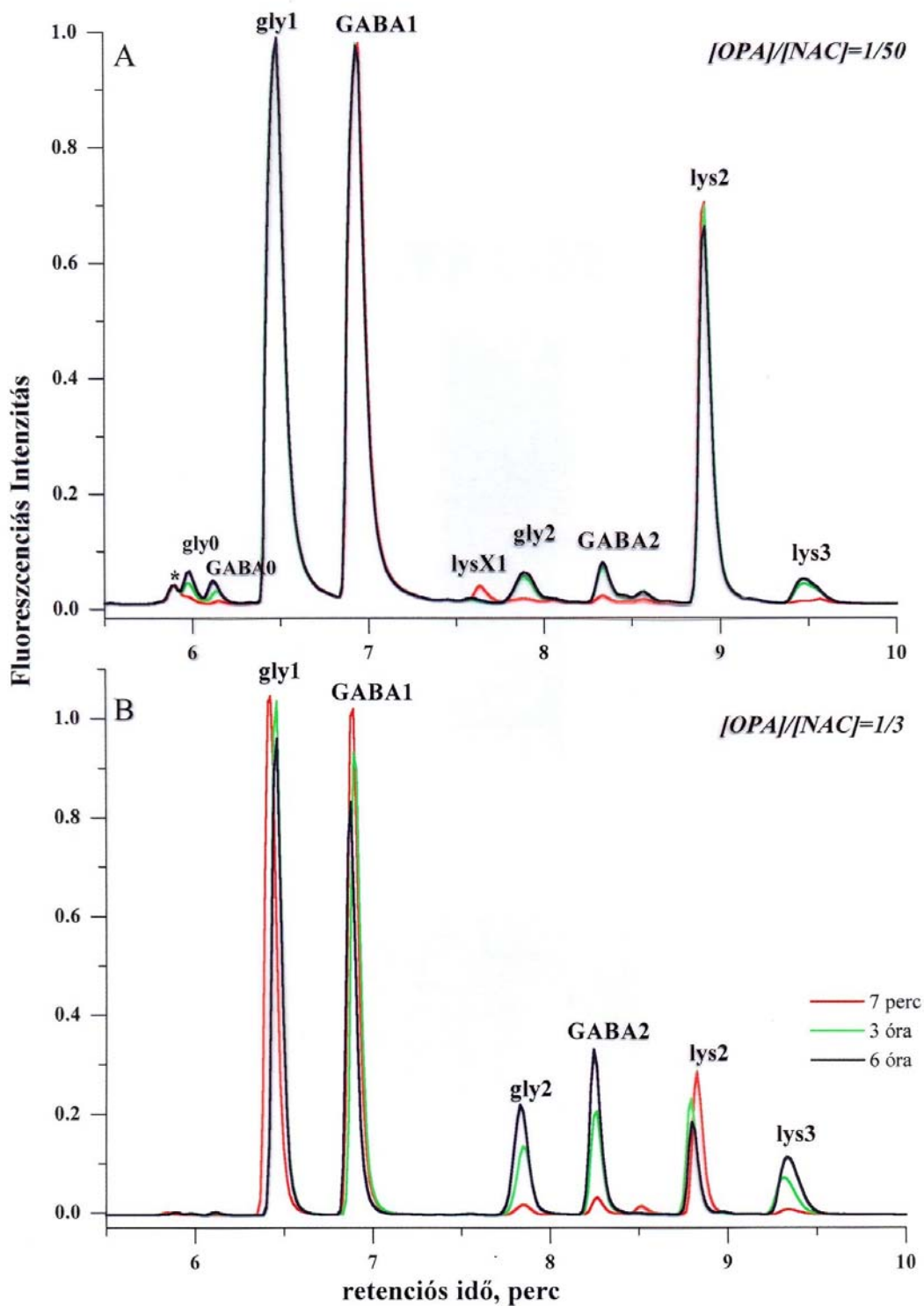


13. ábra. A 2. csoportba tartozó γ -aminovajsav (GABA) OPA/NAC-származékának fluoreszcenciás detektálású kromatogramjai a reagens összetételének és a kölcsönhatás idejének függvényében



14. ábra. A 2. csoportba tartozó glicin OPA/MPA-származékának fluoreszcenciás detektálású kromatogramjai a reagens összetételének és a kölcsönhatás idejének függvényében

Mivel még az 1:10 OPA/tiol arány sem szorította vissza az elsődleges termék átalakulását, az OPA/tiol arányt az 1:50 értékig növeltük (**15. és 16. ábra**). Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy az OPA/tiol arány további növelésétől jelentős változás nem várható (**15. és 16. táblázat**).



15. ábra. A 2. csoportba tartozó aminosavak (hisztidin, β -alanin, ornitin, glicin, GABA és lizin) OPA/NAC-származékainak fluoreszcenciás detektálású kromatogramjai a reagens összetételének függvényében

15. táblázat. Az OPA/MPA–NAC/aminosav-származékok stabilitása és kromatográfiás paraméterei a reakció-idő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra).

aminosav	Ret Idő	OPA/MPA/AA = 20/10/1				OPA/MPA/AA = 20/60/1				OPA/MPA/AA = 20/200/1			
		Válaszjel (%)			RR	Válaszjel (%)			RR	Válaszjel (%)			RR
		7perc	3 óra	6 óra		7perc	3 óra	6 óra		7perc	3 óra	6 óra	
GLY0	1,65	2,5	1,5	1,1	11,4	4,2	2,4	2,1	10,5	2,4	4,1	5,2	10,9
GLY1	2,05	89,6	39,2	20,8	13,6	90,2	60,1	46,9	13,5	94,7	79,4	73,7	13,5
GLY2	2,63	7,9	59,3	78,1	18,4	5,6	37,5	51,0	18,9	2,9	16,5	21,1	17,0
Int. egység/pM F1		5,41	5,86	5,58		5,37	6,06	5,94		5,02	5,40	5,27	
UV		0,40	0,40	0,37		0,39	0,41	0,40		0,36	0,39	0,39	
GABA0	1,95	0,3	0,3	0,4	–	0,1	0,2	0,4	5,9	0,2	0,7	1,1	–
GABA1	2,05	87,2	27,0	12,5	15,1	92,5	46,2	31,6	12,8	95,3	74,8	69,5	13,2
GABA2	3,62	12,5	72,7	87,1	18,8	7,4	53,6	68,0	18,5	4,5	24,5	29,4	19,4
Int. egység/pM F1		5,29	7,19	6,96		5,14	6,16	5,62		4,99	5,04	4,38	
UV		0,37	0,41	0,38		0,38	0,40	0,36		0,38	0,37	0,30	
β-ALA0	1,88	–	0,1	0,3	5,0	0,1	0,3	0,4	6,4	0,1	0,7	1,6	7,7
β-ALA1	2,01	90,4	34,4	17,5	13,1	92,3	55,8	42,8	13,0	96,5	82,3	79,5	13,3
β-ALA2	3,43	9,5	65,5	82,2	18,3	7,6	43,9	56,8	18,5	3,4	17,0	18,9	17,5
Int. egység/pM F1		5,06	6,65	6,69		5,17	5,82	5,30		5,09	4,93	4,20	
UV		0,38	0,41	0,39		0,39	0,38	0,35		0,38	0,36	0,31	
ORN0	1,60	–	–	0,5	–	2,0	1,3	0,8	–	0,4	0,7	1,0	5,3
ORN1	2,00	–	–	2,9	–	6,1	5,0	5,8	5,8	3,4	6,9	10,5	2,0
ORN2	2,55	77,5	13,5	8,5	1,7	61,9	23,7	14,6	1,6	66,6	18,5	18,2	1,7
ORN3	3,27	21,7	85,6	87,9	4,1	14,7	69,4	77,3	3,8	7,1	40,8	47,5	3,9
ORN4	2,32	0,8	0,9	0,2	–	15,3	0,6	1,5	1,6	22,5	33,1	22,8	1,7
Int. egység/pM F1		1,12	1,98	1,17		1,21	1,90	1,76		1,18	1,43	1,35	
UV		0,56	0,59	0,53		0,64	0,65	0,59		0,64	0,62	0,57	
LYS1	2,02	–	0,2	0,5	–	1,4	5,4	7,8	–	0,8	7,3	15,1	–
LYS2	2,63	76,2	9,3	2,4	2,0	81,6	17,9	8,2	2,0	87,3	39,6	27,8	2,0
LYS3	4,88	23,8	88,2	92,4	5,1	17,0	74,1	79,5	5,0	11,9	52,3	55,8	4,6
LYS4	3,03	–	2,3	4,7	–	–	2,6	4,5	–	–	0,8	1,3	–
Int. egység/pM F1		1,59	3,20	3,25		1,64	2,98	3,11		1,62	2,16	2,17	
UV		0,70	0,73	0,68		0,72	0,75	0,71		0,70	0,69	0,63	
		OPA/NAC/AA = 20/10/1				OPA/NAC/AA = 20/60/1				OPA/NAC/AA = 20/200/1			
		Válaszjel (%)			RR	Válaszjel (%)			RR	Válaszjel (%)			RR
		7perc	3 óra	6 óra		7perc	3 óra	6 óra		7perc	3 óra	6 óra	
GLY0	1,61	5,6	4,2	3,5	11,3	4,6	4,7	4,0	12,6	3,2	3,8	3,9	10,7
GLY1	1,99	91,3	66,6	51,4	12,4	92,4	67,9	54,7	12,8	95,5	86,4	81,8	12,9
GLY2	2,61	3,1	29,2	45,1	14,4	3,0	27,4	41,3	14,7	1,4	9,8	14,3	12,9
Int. egység/pM F1		4,65	5,57	5,80		5,54	5,45	5,10		5,14	5,25	5,17	
UV		0,44	0,43	0,40		0,41	0,41	0,40		0,40	0,41	0,40	
GABA0	1,68	0,4	0,8	0,9	10,1	0,3	0,6	0,6	9,3	0,5	1,3	1,7	7,0
GABA1	2,03	95,6	61,5	43,6	12,0	95,8	68,0	53,5	11,9	97,8	88,3	83,3	–
GABA2	3,02	4,0	37,7	55,5	13,3	3,0	27,4	45,9	12,4	1,7	10,4	15,0	–
Int. egység/pM F1		4,69	5,33	5,55		4,63	5,03	5,11		4,70	4,83	4,73	
UV		0,40	0,43	0,44		0,39	0,42	0,41		0,39	0,39	0,38	
β-ALA0	1,65	3,2	3,1	3,0	10,0	3,4	3,4	3,2	10,5	1,8	2,8	3,3	10,2
β-ALA1	1,99	94,3	67,4	51,8	11,7	93,7	70,0	57,6	11,6	96,6	87,9	84,3	11,7
β-ALA2	2,61	2,5	29,5	45,2	12,6	2,9	26,6	39,2	12,2	1,6	9,3	12,4	13,6
Int. egység/pM F1		4,72	5,28	5,43		4,58	4,92	4,79		4,70	4,78	4,60	
UV		0,42	0,44	0,45		0,39	0,42	0,41		0,40	0,41	0,39	
ORN0	1,25	1,3	1,1	0,9	5,3	0,4	0,3	0,5	3,7	4,6	4,8	4,7	7,6
ORN1+2	1,67	89,9	47,6	30,3	1,8	91,5	51,6	35,3	1,7	90,6	77,9	71,3	2,0
ORN3	2,34	8,8	51,3	68,8	2,8	8,1	48,1	64,2	2,9	4,8	17,3	24,0	2,8
Int. egység/pM F1		1,04	1,36	1,51		1,06	1,37	1,47		1,45	1,54	1,57	
UV		0,58	0,60	0,61		0,63	0,64	0,63		0,69	0,70	0,69	
LYS1	2,00	–	–	–	–	–	0,5	1,7	–	–	1,8	4,2	–
LYS2	2,99	92,9	44,3	26,4	1,9	92,2	42,8	26,0	1,8	95,9	70,0	56,8	1,9
LYS3	6,68	7,1	55,7	73,6	3,9	7,8	56,7	72,3	3,8	4,1	28,2	39,0	4,0
Int. egység/pM F1		1,36	2,01	2,29		1,37	1,96	2,25		1,52	1,74	2,33	
UV		0,72	0,75	0,76		0,74	0,81	0,78		0,76	0,76	0,75	

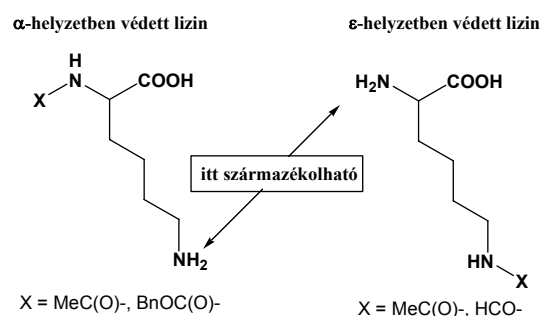
16. táblázat. Az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok stabilitása és kromatográfiás paraméterei a reakcióidő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra).

Aminosav	Retenc. Idő* (perc)	UV Max (nm)	FI detektálás			UV detektálás			FI detektálás			UV detektálás			FI detektálás			UV detektálás		
			OPA/NAC = 1/3**			OPA/NAC = 1/3**			OPA/NAC = 1/50***			OPA/NAC = 1/50***			OPA/MPA = 1/50***			OPA/MPA = 1/50***		
			Válaszjel (%)****			Válaszjel (%)****			Válaszjel (%)****			Válaszjel (%)****			Válaszjel (%)****			Válaszjel (%)****		
			7 prec	3 óra	6 óra	7 prec	3 óra	6 óra	7 prec	3 óra	6 óra	7 prec	3 óra	6 óra	7 prec	3 óra	6 óra	7 prec	3 óra	6 óra
GLY0	5,88	334	0,1	0,1	0,1	0,6	0,8	0,8	1,0	2,3	3,3	0,2	0,8	1,4	–	–	–	–	–	–
GLY1	6,43	334	95,7	82,3	75,4	97,0	84,4	74,9	97,7	92,7	90,7	99,3	96,2	95,0	93,5	97,1	96,4	94,0	96,5	94,9
GLY2	7,88	339	4,2	17,6	24,5	2,4	14,8	24,3	1,3	5,0	6,1	0,5	3,0	3,6	6,5	2,9	3,6	6,0	3,5	5,1
Int. Egy./pM			5,4	5,6	5,74	0,4	0,45	0,45	5,30	5,54	5,68	0,42	0,42	0,42	5,13	4,58	4,27	0,41	0,39	0,37
GABA0	6,13	334	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5	0,4	1,6	2,8	0,2	0,7	1,2	–	–	–	–	–	–
GABA1	6,93	334	96,6	80,3	68,9	96,3	80,5	68,9	98,2	92,3	90,3	99,3	96,7	95,9	83,4	79,5	77,3	87,5	78,0	70,6
GABA2	7,88	339	3,3	19,4	30,6	3,6	19,2	30,4	1,4	6,1	6,9	0,5	2,6	2,9	16,6	20,5	22,7	12,5	22,0	29,4
Int. Egy./pM			5,01	5,1	5,23	0,4	0,43	0,43	4,89	5,14	5,22	0,40	0,40	0,40	5,78	5,34	4,83	0,40	0,39	0,38
β-ALA0	7,62	334	–	–	–	–	–	–	0,2	1,8	3,0	0,5	1,6	2,4	0,8	1,1	0,3	–	1,5	3,4
β-ALA1	8,68	334	96,6	84,2	78,5	94,9	85,7	78,5	97,0	94,2	92,5	97,3	95,6	95,6	93,8	95,6	93,8	99,5	95,7	93,5
β-ALA2	12,32	339	4,0	15,8	21,5	5,1	14,3	21,5	2,8	4,0	4,5	1,9	3,3	3,3	3,2	3,3	3,2	0,5	2,8	3,1
Int. Egy./pM			4,4	4,69	4,79	0,4	0,42	0,42	4,68	4,77	4,83	5,13	4,49	4,49	3,91	4,49	3,91	0,39	0,35	0,31
HIS0	5,70	334	4,3	4,7	4,8	5,0	5,7	5,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HIS1	8,12	334	40,5	41,5	44,1	64,0	65,0	64,1	46,1	47,7	49,4	77,4	75,9	75,9	75,1	75,9	75,1	86,3	84,3	81,1
HIS2	12,07	353	55,2	53,8	51,1	31,0	29,3	30,2	53,9	52,3	74,2	22,6	24,1	24,1	24,9	24,1	24,9	13,7	15,8	18,8
Int. Egy./pM			3,8	3,65	3,48	0,3	0,33	0,33	1,94	3,33	25,8	2,78	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	0,19	0,33	0,34
ORNX1	9,80	334	–	–	–	–	–	–	24,4	–	0,18	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ORN1	13,08	334	88,5	66,1	53,9	96,2	80,1	69,3	75,6	93,7	5,5	67,8	91,2	91,2	89,5	91,2	89,5	73,1	94,8	94,2
ORN2	13,40	339	11,5	33,9	46,1	3,8	19,9	30,7	–	6,3	94,5	0,6	7,5	7,5	9,0	7,5	9,0	1,0	3,9	4,7
ORN3	14,98	334	–	–	–	–	–	–	–	–	–	31,4	1,3	1,3	1,5	1,3	1,5	25,9	1,3	1,1
Int. Egy./pM			1,6	1,2	1,35	0,5	0,59	0,59	1,10	1,37	–	1,45	1,23	1,23	1,07	1,23	1,07	0,62	0,56	0,46
LYSX1	7,58	334	–	–	–	–	–	–	4,6	2,0	0,60	–	–	–	–	–	–	–	–	–
LYS1	8,92	334	93,3	62,6	46,6	96,5	75,8	61,7	94,5	90,8	1,2	83,0	84,4	84,4	82,7	84,4	82,7	86,4	91,8	90,9
LYS2	9,48	339	6,7	37,4	53,4	3,5	24,2	38,3	0,9	7,2	99,6	2,6	14,0	14,0	15,6	14,0	15,6	1,3	7,0	7,9
LYS3	11,63	334	0,0	–	–	–	–	–	–	–	0,4	14,4	1,6	1,7	1,7	1,6	1,7	12,3	1,2	1,2
Int. Egy./pM			2,03	2,4	2,66	0,8	0,82	0,81	2,19	2,26	0,76	1,9	1,79	1,44	1,44	1,79	1,44	0,63	0,59	0,47

Jelölések: * = Az OPA/NAC-származék retenciós ideje (a megfelelő OPA/MPA-származék pár másodperccel később eluálódik); ** = [OPA]/[NAC]/[AA] = 20/60/1 (ahol 1 = 10⁻⁹); *** = [OPA]/[NAC]/[AA] = [OPA]/[MPA]/[AA] = 20/1000/1 (ahol 1 = 10⁻⁹); **** = %, a teljes válaszjelben kifejezve.

6.2.7. OPA/tiol/*N*- α -védett-L-lizin- és OPA/tiol/*N*- ϵ -védett-L-lizin-származékok stabilitásának vizsgálata

A kutatásainkban jelentős előrehaladást hozott az *N*- α -védett-L-lizin és az *N*- ϵ -védett-L-lizin OPA/tiol-származékainak vizsgálata. Az alábbi két α -védett és két ϵ -védett lizinvegyületet vizsgáltuk: *N*- α -acetyl-L-lizin és *N*- ϵ -acetyl-L-lizin, *N*- α -benziloxykarbonil-L-lizin és *N*- ϵ -formil-L-lizin (**16. Ábra**).



16. ábra. *N*- α és *N*- ϵ -védett-L-lizin

Hasonlóságuk ellenére, a két különböző helyen védett OPA/tiol/lizin-származékok teljesen eltérő stabilitást mutattak. A kísérletekből egyértelműen látszik (**17. Táblázat.**), hogy az ϵ -védett lizinek az 1. csoportba tartozó (egy csúcsot adó) aminosavakhoz hasonlóan egy stabil származékot adnak, míg az α -védett lizinek már a 2. csoportba tartozó (két csúcsot adó) aminosavakhoz hasonlóan viselkednek, azaz az elsőként keletkező OPA/tiol-származékok átalakulnak a védőcsoport minőségétől függetlenül.

17. táblázat. Szubsztituált lizinek OPA/MPA-származékainak stabilitása és tulajdonságai a reakcióidő függvényében, F1 és UV detektálások alapján

Aminosavak↓ Reakció idő⇒	Ret. Idő, Perc↓	Válaszjel %, F1			Válaszjel %, UV		
		7p	3ó	6ó	7p	3ó	6ó
<i>N</i> - α -Ac-L-LYS1	7,92	87,4	39,3	26,3	86,2	43,1	29,4
<i>N</i> - α -Ac-L- LYS2	9,00	12,6	60,7	73,7	13,8	56,9	70,6
Int Egység/pM:		5,89	6,01	4,59	0,40	0,36	0,27
<i>N</i> - α -Z-L- LYS1	10,42	91,2	44,7	33,6	90,6	46,5	35,9
<i>N</i> - α -Z-L- LYS1	11,02	8,8	55,3	66,4	9,4	53,5	64,1
Int Egység/pM:		4,57	4,42	3,36	0,28	0,26	0,19
<i>N</i> - ϵ -Ac-L- LYS1	7,38	100	100	100	100	100	100
Int Egység/pM:		5,12	5,15	5,13	0,37	0,37	0,36
<i>N</i> - ϵ -formil-L- LYS1	7,23	100	100	100	100	100	100
Int Egység/pM:		5,12	5,13	5,10	0,36	0,37	0,37

Jelölések: Ac = acetyl, Z = benziloxi-karbonil

Hasonló kísérletet végeztünk szubsztituált glicinekkel is (glicilalanil, glicilglicin, glicin-benzil-észter), ahol – az aktuális szubsztituenstől függetlenül – a glicinnél tapasztalt bomlással megegyező képet kaptunk, azaz a reakcióidő előrehaladtával ugyanannyi másodlagos termék jelenik meg (**18. táblázat**). Az egyetlen különbség csak abban mutatkozik, hogy míg a glicilalanil és a glicilglicin lassabban, a glicin-benzilészter viszont gyorsabban bomlik, mint a szubsztituátlan glicin.

18. táblázat. Szubsztituált glicinek OPA/MPA-származékainak stabilitása és tulajdonságai a reakcióidő függvényében, F1 és UV detektálások alapján.

Aminosavak↓ Reakcióidő⇒	Ret. idő, perc↓	Válaszjel %, F1			Válaszjel %, UV			RR
		7p	3ó	6ó	7p	3ó	6ó	
GLY0		4,2	2,4	2,1	4,7	3,5	3,6	10,5
GLY 1	6,23	90,2	60,1	46,9	90,8	65,6	54,8	13,3
GLY 2	7,58	5,6	37,5	51,0	4,5	30,9	41,6	18,9
Int Egység/pM:		5,37	6,06	5,94	0,39	0,41	0,40	
Glicilalanil0	6,02	0,2	2,8	4,6	0,2	2,9	4,9	12,1
Glicilalanil1	6,83	93,2	71,7	61,1	96,8	83,7	75,7	4,6
Glicilalanil2	8,13	6,6	25,5	34,3	3,0	13,4	19,4	10,4
Int Egység/pM:		1,92	2,26	2,24	0,40	0,41	0,39	
Glicilglicin0	5,83	0,4	3,3	5,0	–	3,2	5,0	5,6
Glicilglicin1	6,33	95,0	71,3	62,0	98,0	84,3	77,4	4,5
Glicilglicin2	8,15	4,6	25,4	33,0	2,0	12,5	17,6	10,8
Int Egység/pM:		1,80	2,14	2,20	0,40	0,41	0,39	
Glicin-benzilészter1	6,37	88,8	63,2	55,6	27,8	29,6	29,6	13,7
Glicin-benzilészter2	7,97	4,2	28,4	35,8	0,81	10,4	15,4	16,7
Glicin-benzilészter3	9,55	2,0	4,4	4,3	6,9	37,1	39,4	0,96
Glicin-benzilészter4	10,40	–	1,9	3,3	–	4,8	8,4	2,7
Glicin-benzilészter5	12,30	5,0	2,1	1,0	64,5	18,1	7,2	1,03
Int Egység/pM:		1,79	2,52	2,58	0,40	0,39	0,36	

Ezekkel a kísérlettel egyértelműen igazoltuk, hogy az egy és két vagy több terméket adó aminosavak és aminok viselkedések közötti különbséget az aminocsoporthoz kapcsolódó alkilcsoport rendűségével magyarázhatjuk. Ha az aminocsoport egy metilencsoporthoz kapcsolódik ($-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), akkor a vegyületet *prim.*-alkilaminnak, ha pedig az aminocsoport egy metincsoporthoz kapcsolódik ($>\text{CH}-\text{NH}_2$), akkor *szek.*-alkilaminnak nevezzük.

A védett lizinnel kapott eredményeket általánosíthatjuk a többi aminosavra és aminra. A kísérletek szerint egy *prim.*-alkilamin típusú vegyület (2A. csoportba tartozó aminosavak: glicin, β -alanin, GABA, lizin, ornitin) OPA/tiol-származéka időben bomlik, míg egy *szek.*-alkilamin (1. csoportba tartozó aminosav) stabil származékot ad, tehát nem vesz részt bomlási reakcióban. A 2B. csoportba tartozó hisztidin esetében feltehetően más típusú bomlási reakcióról beszélhetünk.

6.3. Modellvizsgálatok az OPA/MPA~NAC/amin-származékok képződési mechanizmusának tanulmányozására

Az aminosavak és diaminok fontos szerepet játszanak a biológiai szervezetekben, számos ilyen vegyület biológiai jelzőként viselkedik. Amin és diamin típusú vegyületek, mint hullamérgek is ismertek, ezért megbízható minőségi és mennyiségi analízisükre az orvostudományban és a törvénytudományi kutatásokban is szükség van. Ezen túlmenően, e vegyületek mérésével, a borok és sörök minőségére és származására is lehet következtetni.

Az irodalmat áttekintve megállapítottuk, hogy sokan foglalkoznak az aminosavak biológiai mátrixokból történő analízisével, ahol aminosavak és diaminok egyaránt előfordulnak. Az itt alkalmazott analitikai módszerek nagyjából megegyeznek az aminosavak esetében használtakkal. Mivel sok aminosavnak, többek között a biogén aminosavaknak, nincs kromofor csoportja, tehát az UV detektor számára láthatatlanok, ezért az aminosavak HPLC-s analízisében is a származékképzési módszerek terjedtek el. Ezen a területen is alkalmazták, az általunk tanulmányozott OPA/tiol reagenst, jóllehet az aminosavakhoz viszonyítva kisebb mértékben.

6.3.1. Az irodalomban leggyakrabban használt 1 : 3 OPA/tiol reagensarány alkalmazása az aminosavak esetében

A kutatásainkat először az 1 : 3 OPA/tiol reagensarányal kezdtük el az aminosavak és diaminok homológ sorának vizsgálata során. Elsődlegesen megállapítható, hogy az OPA/tiol származékképzési módszer az aminosavak esetében is jól alkalmazható, bár a kapott kísérleti adatok szerint ebben az esetben is ugyanolyan átalakulási folyamatok játszódnak le, mint a $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ molekulaegységet tartalmazó aminosavak esetében, azaz a *prim.*-alkilamin-csoportot tartalmazó vegyületek elsődleges OPA/tiol-származéka tovább reagál és a kromatogramban több termék észlelhető.

Tapasztalataink szerint az elsődlegesen keletkező OPA/tiol-származék bomlási sebessége nagymértékben függ az alkillánc hosszától, azaz minél hosszabb a szénlánc, annál lassabb az elsődleges termék átalakulása. Ezt jól szemlélteti, hogy az OPA/tiol = 1:3 reagensarány mellett a metil-aminból képződő esetben az elsődleges származék azonnal tovább alakul és 3 óra alatt teljesen eltűnik, míg a butil-amin elsődleges terméke, illetve az ennek átalakulásból eredő másodlagos termék 6 óra reakcióidő után is mérhető. Az aminosavaknál már megfigyelt átalakulás tehát a butil-amin esetében is jelentkezik, de ellentétben a

metil-aminnal, a másodlagos termék és a főcsúcs összege időben állandó, tehát a *összegzésen alapuló módszer* a butil-aminnál alkalmazható, míg a metil-aminnál nem.

6.3.2. Az általunk javasolt, megnövelt (1:10 és 1:50) OPA/tiol reagensarány alkalmazása az aminok esetében

Az aminok átalakulási sebessége még gyorsabb, mint az aminosavaké, sőt még az összeadá-sos módszer sem alkalmazható minden esetben. Az aminok mérése ezért a hagyományos 1:3 OPA/tiol reagensaránnal még nehezebb (**19. táblázat**). Az aminosavakra kidolgoztunk egy olyan reagensösszetételű OPA/tiol származékképző reagenst (6.2.6. fejezet), ahol 1:3 helyett 1:10, illetve 1:50 reagensarányt alkalmazunk 1:20 aminocsoport/OPA reagensfelesleg mellett. Ezt a módszert alkalmazva gyakorlatilag teljesen vissza tudtuk szorítani az elsődleges OPA/tiol-származékok bomlását. Úgy terveztük, hogy ezt a már jól bevált módszert kipróbáljuk az aminok mérésére is.

Az 1:10 reagensarányt alkalmazva, az aminok OPA/tiol-származékainak átalakulását csak kis mértékben tudtuk csökkenteni. Ezért vizsgálatainkat a megnövelt 1:50 OPA/tiol reagensarányt alkalmazva folytattuk (**18. táblázat**, **17. és 18. ábra**). Ez az 1:50 reagensarány jelentős stabilitásnövekedést eredményezett. Az adatok azt mutatták, hogy az 1:3 illetve az 1:10 arány helyett az 1:50 reagensarány az aminok meghatározására, 7 perces reakcióidő mellett kiválóan alkalmazható.

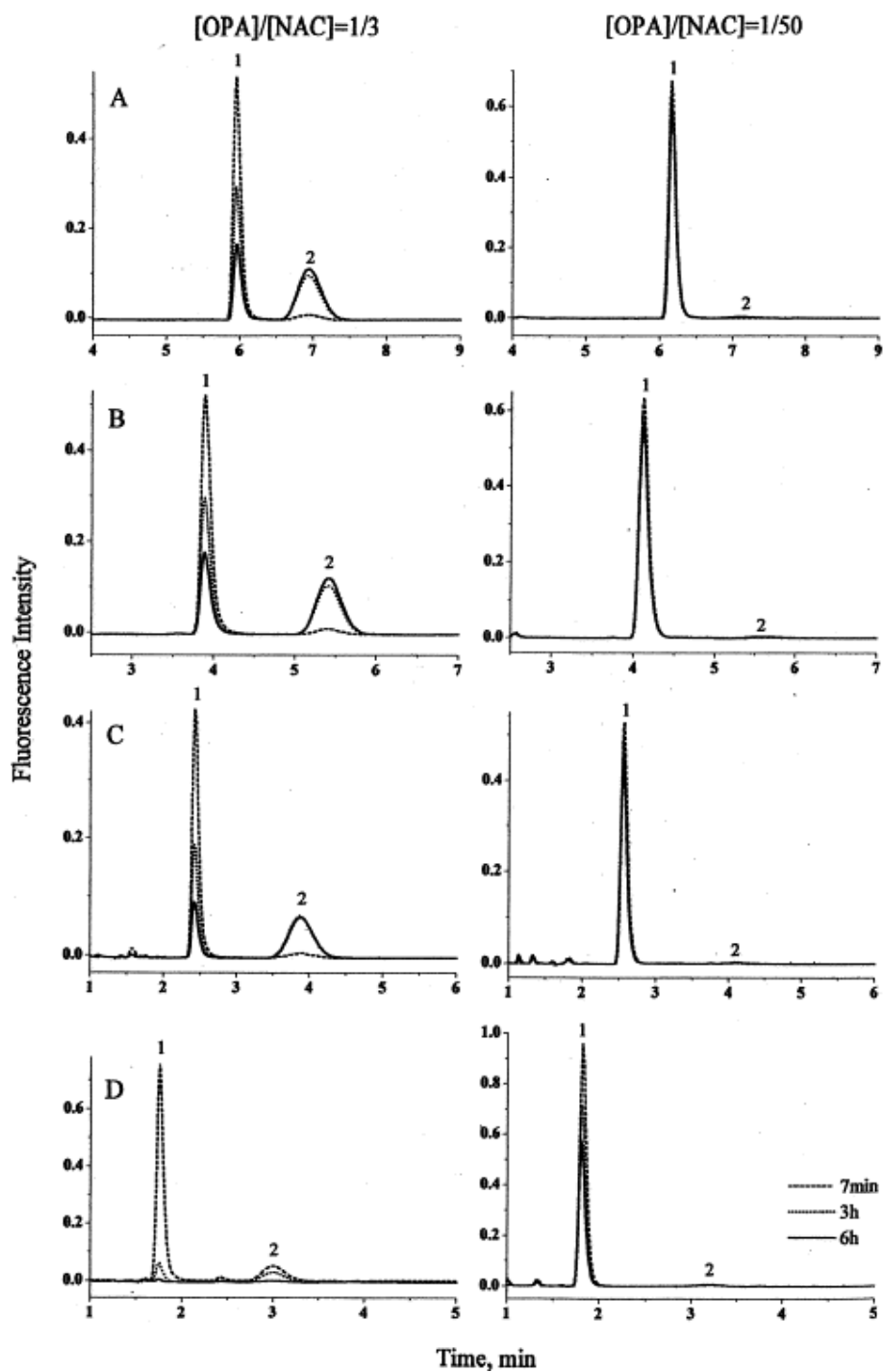
19. táblázat. Az alifás aminok és az etanolamin OPA/NAC- és OPA/MPA-származékainak stabilitása és kromatográfias paraméterei a reakcióidő és a reagensösszetétel függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra)

Amin	Ret idő (perc)	Fluoreszcens detektálás										
		[OPA]:[NAC] = 1:3				[OPA]:[NAC] = 1:50				[OPA]:[MPA] = 1:50		
		Válaszjel (%)*				Válaszjel (%)*				Válaszjel (%)*		
		90 mp	7 perc	3 óra	6 óra	90 mp	7 perc	3 óra	6 óra	7 perc	3 óra	6 óra
Etanolamin1	1,35	98,9	98,6	97,7	97,9	100	100	100	100	100	100	100
Etanolamin2	1,65	1,1	1,4	2,3	2,1	–	–	–	–	–	–	–
Fl		4,07	3,79	2,99	2,20	3,96	3,71	3,62	3,54	3,90	3,36	2,98
UV		0,37	0,35	0,25	0,19	0,36	0,35	0,34	0,32	0,37	0,32	0,29
Metil-amin1	1,85	93,8	82,0	38,5	42,4	99,1	97,9	96,4	96,4	98,2	96,5	97,2
Metil-amin2	3,26	6,2	18,0	61,5	57,6	0,9	2,1	3,6	3,6	1,8	3,5	2,8
Fl		4,68	4,50	0,86	0,11	4,55	4,35	3,39	2,76	4,51	2,84	1,89
UV		0,42	0,41	0,079	0,014	0,40	0,38	0,28	0,21	0,39	0,25	0,17
Etil-amin1	2,58	94,5	93,1	43,5	28,1	100	99,7	99,4	99,3	94,8	92,7	91,3
Etil-amin2	3,87	5,5	6,9	56,5	71,9	–	0,3	0,6	0,7	5,2	7,3	8,7
Fl		4,42	4,44	4,33	3,37	4,41	4,40	4,04	3,76	4,48	3,68	3,09
UV		0,39	0,40	0,38	0,29	0,38	0,42	0,38	0,35	0,40	0,33	0,28
Izopropil-amin	3,83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Fl		4,25	4,82	4,74	4,67	2,73	4,81	4,69	4,89	3,90	4,83	4,77
UV		0,37	0,44	0,43	0,42	0,25	0,42	0,42	0,42	0,34	0,42	0,42
Propil-amin1	4,17	98,2	95,0	53,3	37,6	100	99,5	98,2	98,1	98,5	97,7	97,7
Propil-amin2	5,71	1,8	5,0	46,7	62,4	–	0,5	1,8	1,9	1,5	2,3	2,3
Fl		4,69	4,71	4,82	4,18	4,57	4,56	4,34	4,19	5,04	4,32	3,72
UV		0,41	0,43	0,43	0,37	0,39	0,40	0,38	0,36	0,44	0,37	0,32

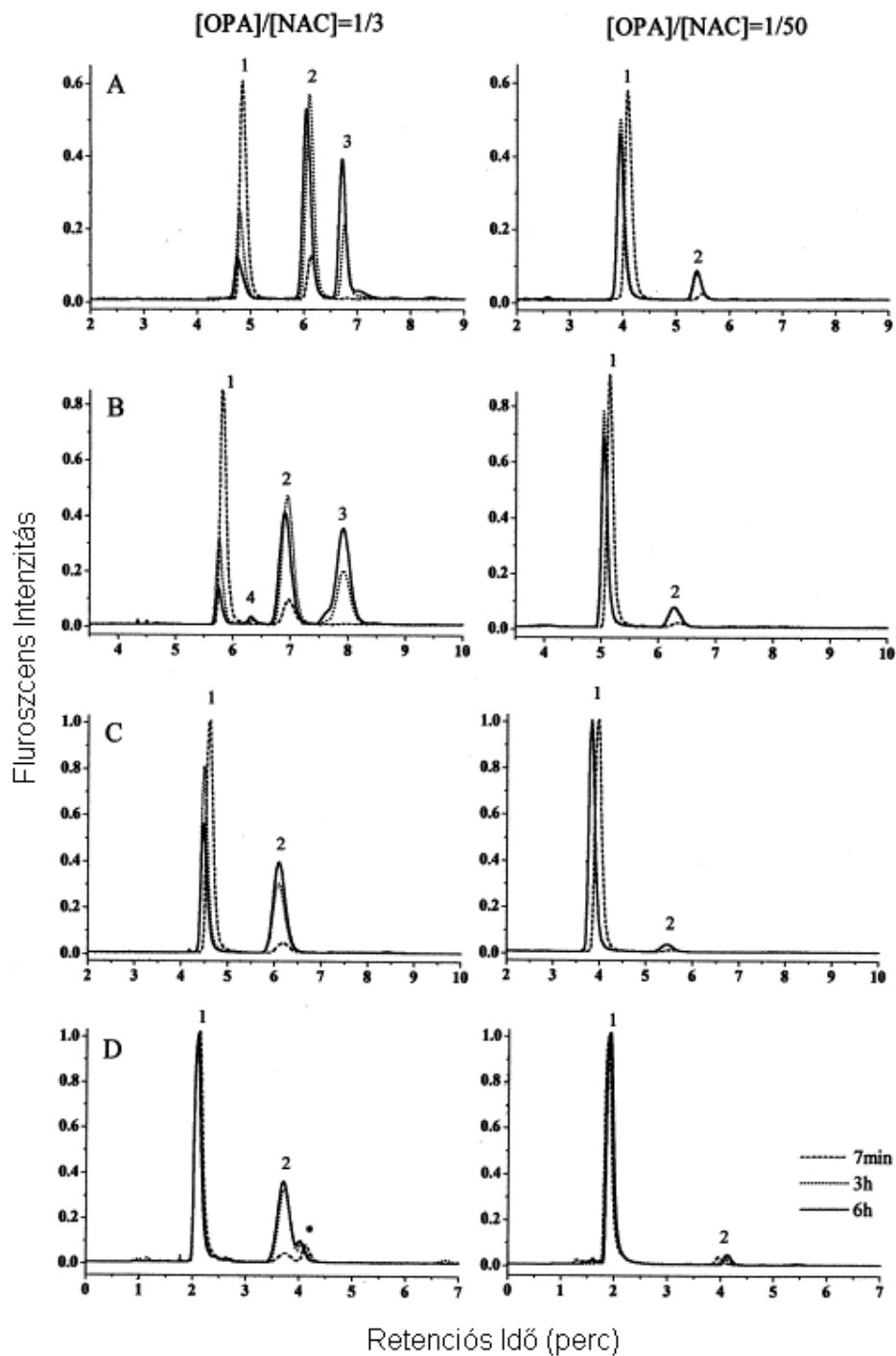
19. táblázat. Folytatás

Amin	Ret Idő (perc)	Fluoreszcens detektálás										
		[OPA]:[NAC] = 1:3				[OPA]:[NAC] = 1:50				[OPA]:[MPA] = 1:50		
		Válaszjel (%)*				Válaszjel (%)*				Válaszjel (%)*		
		90 mp	7 perc	3 óra	6 óra	90 mp	7 perc	3 óra	6 óra	7 perc	3 óra	6 óra
<i>terc</i> -butil-amin	4,85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Fl		0,58	0,71	1,33	1,29	0,029	0,050	0,45	0,68	0,055	0,46	0,69
UV		0,17	0,23	0,42	0,41	0,007	0,014	0,14	0,21	0,016	0,14	0,21
<i>szek</i> -butil-amin	5,47	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Fl		4,34	4,23	4,19	4,15	1,74	2,63	4,18	4,22	2,27	3,34	3,18
UV		0,39	0,38	0,38	0,39	0,16	0,33	0,38	0,38	0,28	0,41	–
izobutil-amin1	5,88	98,9	98,5	83,9	74,1	100	99,7	97,8	97,6	98,8	96,1	96,0
izobutil-amin2	6,88	1,1	1,5	16,1	25,9	–	0,3	2,2	2,4	1,2	3,9	4,0
Fl		4,01	4,06	4,31	4,48	4,37	4,30	4,21	4,13	4,31	3,85	3,38
UV		0,34	0,39	0,40	0,41	0,38	0,39	0,38	0,37	0,39	0,34	0,30
butil-amin1	6,23	98,3	94,2	50,3	33,9	100	99,4	97,7	97,6	98,7	97,1	97,1
butil-amin2	7,15	1,7	5,8	49,7	66,1	–	0,6	2,3	2,4	1,3	2,9	2,9
Fl		4,07	4,04	4,18	3,62	4,02	4,06	3,88	3,68	3,96	3,24	2,71
UV		0,37	0,38	0,38	0,32	0,36	0,38	0,36	0,34	0,37	0,30	0,25
izoamil-amin1	7,71	99,8	96,3	72,1	58,5	100	99,2	97,5	97,6	nd	nd	nd
izoamil-amin2	8,06	0,2	3,7	27,9	41,5	–	0,8	2,5	2,4	nd	nd	nd
Fl		4,46	4,28	4,41	4,30	4,30	4,24	4,07	3,84			
UV		0,40	0,42	0,43	0,42	0,41	0,42	0,40	0,38			

Jelölések: [OPA]:[MPA~NAC]:[AA] = 20:60:1 vagy 20:1000:1 (10^{-9}); * = az összes származék válaszjele, nd = nincs meghatározva



17. ábra. A butil-amin (A), a propil-amin (B), az etil-amin (C) és a metil-amin (D) bomlása az idő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra), különböző OPA/NAC reagensarány mellett. [OPA]:[NAC]:[AA] = 20:60:1 és [OPA]:[NAC]:[AA] = 20:1000:1 (ahol 1 = 10^{-9}) reagensarány mellett

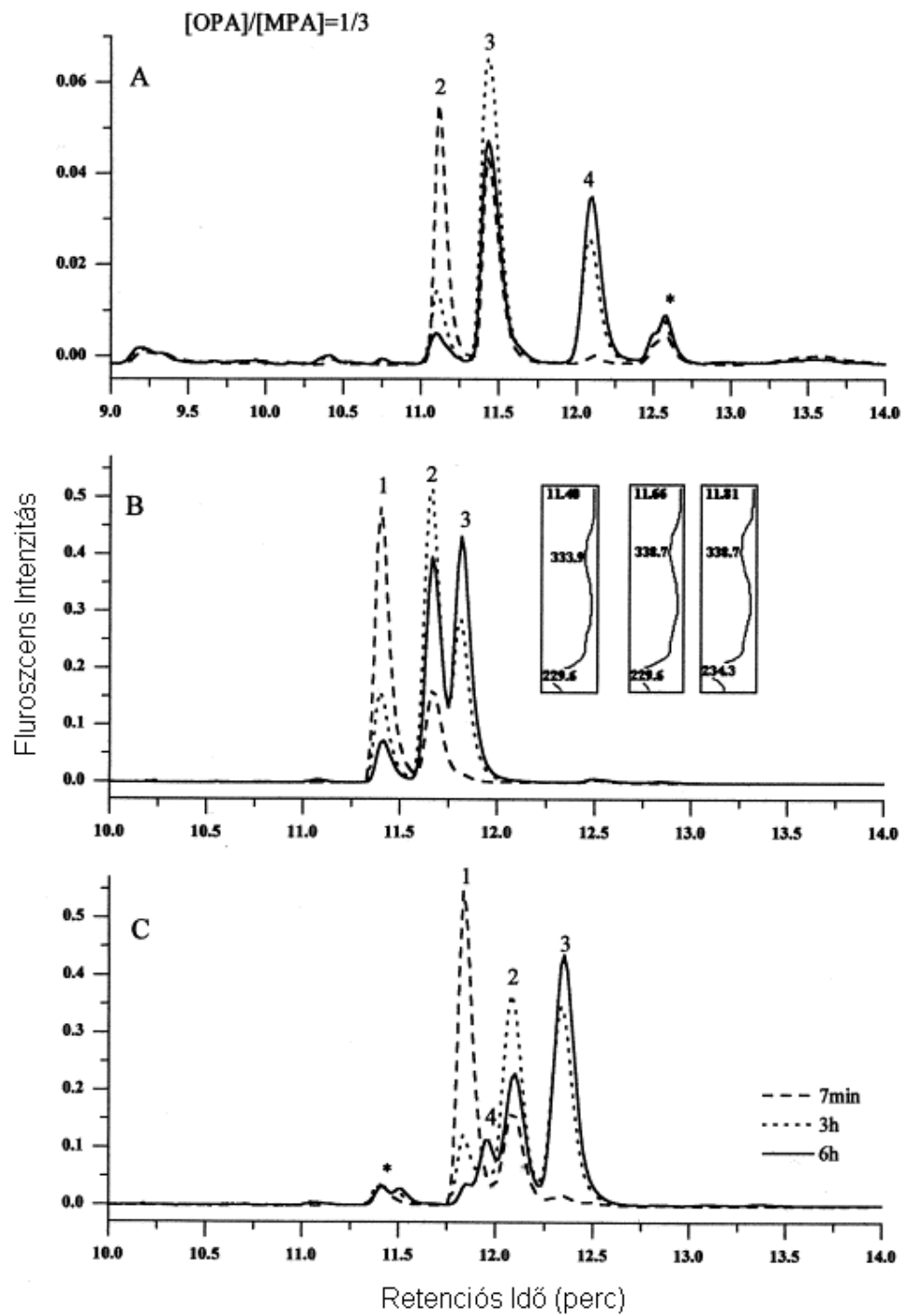


18. ábra. A putreszcín (A), a kadaverin (B), a tiramin (C) és az agmatin (D) bomlása az idő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra), különböző OPA/NAC reagensarányok mellett; [OPA]:[NAC]:[diamin] = 20:60:1 és [OPA]:[NAC]:[diamin] = 20:1000:1 (ahol 1 = 10⁻⁹)

6.3.3. Az általunk javasolt megnövelt (1 : 50) OPA/tiol reagensarány alkalmazása a diaminok esetében

Az aminok és a diaminok OPA/tiol-származékainak stabilitása között viszonylag nagy különbség van, a diaminok származékai még gyorsabban alakulnak át másodlagos termékeké, mint az aminok, és esetenként négy átalakulási terméket adnak.

A diaminoknál is megvizsgáltuk a különböző reagensarányoknak az átalakulás sebességére gyakorolt hatását. A kapott eredmények nagyon hasonlóak voltak azokhoz, amelyeket az aminok vizsgálata során kaptunk. Míg az 1:3 reagensarány mellett az elsődlegesen keletkező OPA/tiol-származék gyorsan tovább alakul (**19. ábra**), addig az 1:50 reagensarány alkalmazásával jelentősen vissza tudtuk szorítani az átalakulási reakciók sebességét, nagymértékben javítva ezzel az analitikai módszert (**19. ábra**). Az 1:50 arány sem biztosította azonban az elsődleges termékek stabilitását, de 7 perces reakcióidők esetén a módszer analitikailag használhatónak bizonyult.



19. ábra. Az 1,3-propilén-diamin (A), putreszcin (B) és kadaverin (C) bomlása az idő függvényében (7 perc, 3 óra, 6 óra). [OPA]:[MPA]:[diamin] = 20:60:1 (ahol 1 = 10^{-9}) reagensarány mellett. *szennyező

6.4. Az OPA/tiol/aminosavak-származékok átalakulási termékeinek szerkezete és keletkezésük mechanizmusa

6.4.1. Az aminosavak, védett aminosavak és aminok OPA/tiol-származékainak HPLC vizsgálatából levonható következtetések

Doktori dolgozatom célja nem csupán az OPA/tiol származékképző módszer paramétereinek tanulmányozása és a módszer javítása volt, hanem a 2. csoportba tartozó aminosavak kémiai átalakulásának részletes feltérképezése is. Láttuk, hogy számos kísérleti paraméter, mint pl. az OPA/tiol reagensarány, a pH és a reakcióidő nagymértékben befolyásolják az átalakulási reakció sebességét. Ebben a fejezetben foglalom össze az átalakulás mechanizmusának részletes ismertetését, illetve azt, hogy az általunk alkalmazott származékolási körülmények és paraméterek miként és miért szorítják vissza a nem kívánt reakciót.

Egyértelműnek tűnt, hogy az átalakulási termékek szerkezetét HPLC-MS módszerrel határozzuk meg. Sajnos első kutatási partnerünkkel nem sikerült használható eredményeket elérni, ezért a kutatásainkat párhuzamosan folytattuk saját laboratóriumunkban. Először úgy gondoltuk, hogy az aminosav C-terminális karboxilcsoportja játszik fontos szerepet a 2. csoportba tartozó aminosavak kémiai átalakulásában. Annak érdekében, hogy ezen elgondolásunkat igazoljuk, C-terminálison védett aminosavakat vizsgáltunk a már ismertetett reakciókörülmények között: $[OPA]/[tiol] = 1 : 3$. Két C-terminálison védett aminosavat, a glicin-benzil-észtert és a lizin-benzil-észtert OPA/tiol reagenssel származékokká alakítottuk és vizsgáltuk ezen származékainak átalakulását. Ezekben az esetekben is a főkomponens mellett legalább egy átalakult terméket mértünk. Annak érdekében, hogy a karbonilcsoport hatását teljesen kizárjuk, még egyszerűbb vegyületekhez nyúltunk, amelyek semmilyen formában nem tartalmaznak C=O szerkezeti elemet. Így kerültek érdeklődésünk középpontjába az aminok, ami más szempontból is szerencsés választásnak bizonyult, ugyanis az aminok, mint azt az előző fejezetekben tárgyaltuk, igen fontos célpontjai az analitikai vizsgálatoknak. Amint a **6.3 fejezetben** már bemutattuk, az aminok származékai szintén több csúcsban eluálódnak, hasonló átalakulási reakciót mutatva, mint a 2. csoportba tartozó aminosavak.

A fent említett eredményekből kitűnt, hogy a 2. csoportba tartozó (több csúcsot adó) aminosavak, illetve az aminok esetében a reagáló NH_2 csoport mellett α -helyzetben mindig CH_2 csoport van (NH_2-CH_2-), vagyis a glicin (NH_2-CH_2-COOH), a β -alanin ($NH_2-CH_2-CH_2-COOH$) és a GABA ($NH_2-CH_2-(CH_2)_2-COOH$), a diaminocsoporttal rendelkező ornitin ($NH_2-CH_2-(CH_2)_2-CHNH_2-COOH$) és lizin ($NH_2-CH_2-(CH_2)_3-CHNH_2-COOH$), illetve az aminok

esetében a $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-R}$ vegyületek OPA/tiol-származékai mind több csúcsban eluálódnak. Ezt az igen fontos megfigyelést mi közöltük először az irodalomban, és ez a felismerés végül elvezetett az OPA/tiol-származékok átalakulásának mechanizmusához.

6.4.2. Az aminosavak és aminok OPA/tiol-származékainak és átalakult termékeinek HPLC-MS vizsgálata [3]

Mivel mind az elsődlegesen képződő származékok, mind az ezekből képződött átalakult termékek bomlékonyak bizonyultak, nem volt esély arra, hogy ezeket az átalakulási termékeket izolálni tudjuk, ezért a szerkezetfelderítéshez újra HPLC-MS vizsgálatokat kezdeményeztünk külső laboratóriumok bevonásával. Először az OPA/MPA reagenssel készített származékok HPLC-MS analízisére került sor a hollandiai DSM laboratóriumában, Ynze Mengerink révén. Sikert az összes, elsődlegesen keletkező és az azokból képződő átalakulási termékek molekulaionjait, illetőleg azok jellemző fragmentumionjait meghatározni (**20. táblázat**). A kapott eredmények mindkét segédreagens (MPA és NAC) alkalmazása mellett azonos következtetésekhez vezettek. Az elsődlegesen keletkező OPA/tiol-származék m/z értéke a várt OPA + tiolvegyület + aminosav(amin) – 2 molekula víz összetételre, azaz a megfelelő izoindolszármazék képződésére utal, amelyet Simons és Johnsons a 1970-es évek végén NMR-rel azonosítottak. Az áttörő újdonság a 2. csoportba tartozó aminosavakból és aminokból keletkező, átalakulási termékek molekulatömegének azonosítása volt. Az első eredményeket egy holland kollégával együttműködve sikerült elérnünk, az OPA/NAC reagenssel átalakított modellvegyületek HPLC-MS vizsgálatait már itthon végeztük [3].

Az átalakult termékek m/z értéke kivétel nélkül minden esetben azt mutatta, hogy az elsődlegesen képződő izoindolszármazék egy további OPA molekulával reagált. A HPLC-MS felvételekből egyértelműen kiderült, hogy az átalakulási termékként jelentkező GLY2, β ALA2, HIS2, GABA2, ORN3 és LYS3 molekulatömege minden esetben egy OPA molekula molekulatömegével több [3], mint a kisebb retenciós idővel érkező kiindulási származékaik (AMINOSAV1), melyek a már jól ismert és várt 1-(R¹-tio)-2-(R-metil)izoindol szerkezetet mutatták (**20. táblázat** és **Függelék**).

20. táblázat. Az aminosavak és aminok OPA/MPA- és OPA/NAC-származékainak fragmentációja: HPLC/MS(ESI) vizsgálatok alapján ($M_{\text{OPA}} = 134,1$; $M_{\text{MPA}} = 106,1$; $M_{\text{NAC}} = 163,2$)

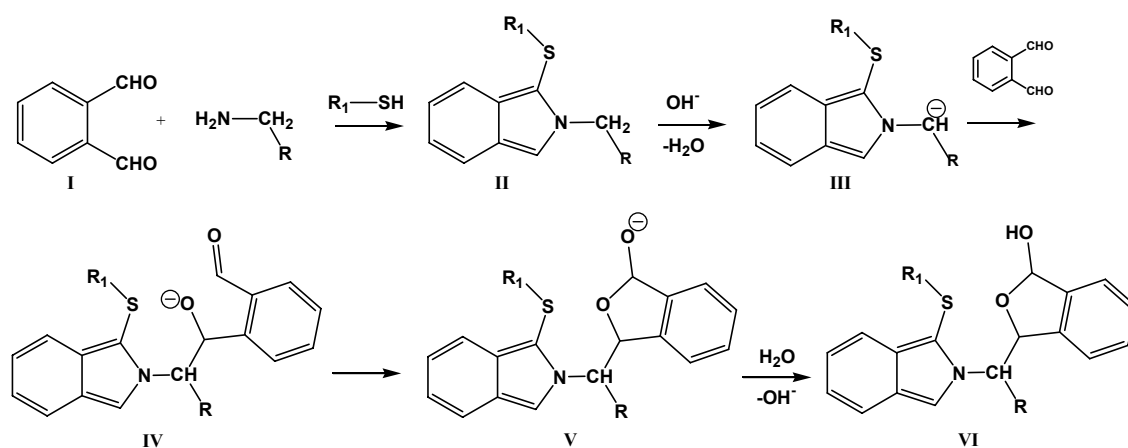
Aminok↓ Aminosavak↓	Mw	Elsődleges OPA/MPA származékok ionjai				Átalakult OPA/MPA származékok ionjai						Speciális fragmens **
		MH ⁺ számolt	MH ⁺ talált	MH ⁺ – COO	MH ⁺ m/z = 105	MH ⁺ +OPA	MH ⁺ +OPA –H ₂ O	MH ⁺	2OPA +MPA –2H ₂ O	OPA +H ⁺		
glicin	75,1	280,3	280,0		175,0	414,0	396,0	280,0		135,1		278,2
β-alanin	89,1	294,3	294,0		189,1	428,0	410,0	294,0	338,0			
lizin	146,2	555,6	555,2	511,0	405,1#	689,0	671,0	555,0	338,0			
ε-amino- kapronsav	131,2	336,4	336,1	292,0	231,1	470,1	452,2	336,1		135,1		

Aminok↓ Aminosavak↓	M	Elsődleges OPA/NAC származékok ionjai				Átalakult OPA/NAC származékok ionjai						Speciális fragmens **	
		MH ⁺ számolt	MH ⁺ talált	MNa ⁺	MH ⁺ m/z = 129	MH ⁺ +OPA	MNa ⁺ +OPA	MH ⁺ +OPA –H ₂ O	MNa ⁺ +OPA +Na	MNa ⁺ +OPA +2Na	MH ⁺ +2OPA		MNa ⁺ +OPA
glicin	75,1	337,4	337,1	359,0	208,0	471,2	493,1	453,0				278,9	
β-alanin	89,1	351,4	351,1	373,0	222,0	485,1	507,2	467,2				279,1	
GABA	103,1	365,4	365,1	387,1	236,1	528,6	521,2	481,2	543,1	564,8		279,1	
hisztidin	155,2	417,5	417,3	461,4&	310,3								
ornitin	132,1	655,7	655,3	677,2	–	789,2	811,2	771,3	833,2	855,2			
lizin	146,2	669,8	669,3	691,4	–	803,3	825,3	785,3	847,3	869,3			
ε-amino- kapronsav	131,2	393,5	393,3	415,3	264,3	527,6	527,4	509,4	549,4	571,4			
n-propil-amin	59,1	321,4	321,3	343,3	192,2	455,5	477,4	437,4	499,4				
putreszcin	88,2	611,5	611,5	633,5	–	745,6	767,6	727,6	789,6	811,5	879,5	901,6	600,6*
kadaverin	102,2	625,5	625,5	647,5	–	759,6	781,6	741,6	803,6	825,6	893,7	915,6	614,6*
agmatin	130,2	392,5	392,4	414,4	263,3	526,5							
tiramin	137,2	399,5	399,4	421,3	270,3	533,5	555,4	515,4	577,5				
spermidin	145,2	407,5	–	–	–	–	–	505,6#					

Jelölések: Mw = molekulatömeg; [OPA]/[MPA~NAC]/[AA~amin]=20/60/1, 1 = ~1x10⁻⁹; vastagon jelölt=jellemző ionok; * = a putreszcin és kadaverin átalakult termékei-hez tartozó fragmens ionok; **=Speciális fragmens ionok = MH⁺ + OPA(–H₂O–R₁–R₂); 600,6*=m/z = 879,5–279,1; 614,6*=m/z=893,7–279,1; 405,1# = MH⁺–(COO+MPA); **461,4&**= MNa⁺ + Na; **505,6#**=MH⁺ + OPA–2H₂O

6.4.3. Az $\text{NH}_2\text{-CH}_2$ csoportot tartalmazó aminosavak és aminok OPA/tiol-származékai átalakulásának mechanizmusa

Az előzőekben vázolt eredmények alapján javasoltuk az OPA/tiol-származékok átalakulásának mechanizmusára. Feltételezésünk szerint (**21. ábra**) az OPA/tiol-származék (**II**) izoindolváz nitrogénjével szomszédos CH_2 csoport (az aminosav α szénatomja) lazított vagy 'savas' hidrogénje révén bázisos közeg ($\text{pH} = 9,3$) hatására könnyen deprotonálódhat (**II** $\rightarrow$ **III**). A keletkező **III** karbanion a továbbiakban nukleofilként reakcióba tud lépni egy újabb OPA molekulával, ami végül egy izobenzofuránváz kialakulásához vezet (**IV** $\rightarrow$ **V** $\rightarrow$ **VI**).

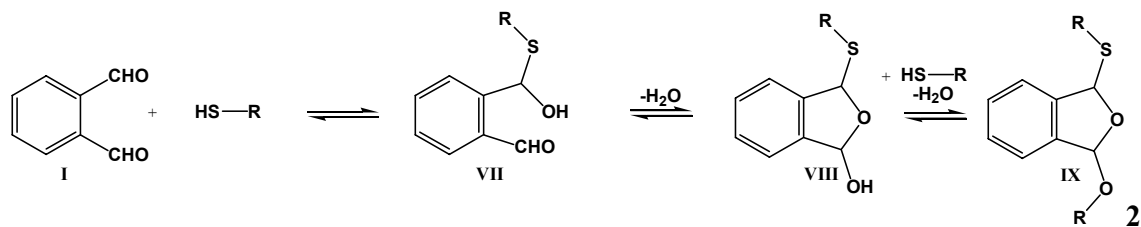


21. ábra. A 2. csoportba tartozó aminosavak és $\text{NH}_2\text{-CH}_2$ csoportot tartalmazó az aminok OPA/tiol-származékai átalakulásának mechanizmusa

Mivel a CH csoportot tartalmazó származékoknál nem tapasztaltunk mellékreakciót, ezért feltételezhető, hogy itt a tercier szénatom térbeli gátlása miatt egy újabb OPA molekula már nem fér el, így csak a N-CH_3 vagy az N-CH_2 csoport jelenlétében indulhat el a tárgyalt mellékreakció. Az OPA/MPA~NAC/hisztidin-származékban az aminocsoporttal szomszédosan α szénatom tercier jellegű (CH), ezért ebben az esetben az átalakulás más mechanizmus szerint játszódik le.

Miután HPLC-MS vizsgálatokkal meghatároztuk a másodlagos átalakulási termékek szerkezetét és képződésük mechanizmusát, a továbbiakban az átalakulás sebességét, így a keletkező másodlagos átalakulási termékek koncentrációját kívántuk szignifikánsan lecsökkenteni. Ebben az esetben ugyanis a kromatogram egyszerűsödik, és a 2. csoportba tartozó aminosavak, valamint az aminok is mennyiségileg meghatározhatóvá válnak. A megoldást a reagens összetételének és a származékképzés körülményeinek változtatásában kerestük, ezért szisztematikusan vizsgáltuk az OPA/tiol/aminosav, illetve OPA/tiol/amin arányokat, majd a

reakció pH-jának hatását. Ezen eredményeket a 6.3 fejezetben már tárgyaltuk, ahol megállapítottuk, hogy a reakcióelegy nagy tiolkoncentrációja jelentősen csökkenti az elsődlegesen keletkező OPA/tiol-származék átalakulását. Feltételezhető, hogy az OPA a nagy feleslegben lévő tiolvegyülettel a **22. ábrán** vázolt előegyensúlyban van.



22. ábra. Feltételezett előegyensúly az OPA és a tiolvegyületek között.

Az egyensúlyi törvény szerint a módosított módszerünkben az [OPA] : [tiol] = 1 : 50 arányú tiolfelesleg az egyensúlyt jobbra tolja el, így csökkentve a szabad OPA molekulák, azaz az aktív aldehidcsoportok koncentrációját az oldatban. A kisebb OPA koncentráció csökkenti az OPA/tiol-származékokkal való reakció sebességét, így az elució ideje alatt az elsődlegesen keletkezett származékok stabilnak mutatkoznak.

6.5. Modellvizsgálatok az OPA/MPA~NAC/aminosav~amin-származékok HPLC feltételeinek optimalizálására

Az előző fejezetben bemutatott kutatási eredmények lehetővé tették, hogy minél több aminosavat és amint egymás mellett, egyszerre határozzunk meg. Mint a bevezetőben említettük, mind az aminosavak, mind az aminok igen fontos és változatos markerekként szerepelnek a biológiai szervezetekben, mivel az aminosavak a különböző technológiai műveletek során, biológiai úton dekarboxileződhetnek aminokká. Számos szakterületen igény van megbízható analitikai módszerre az alábbiak szerint:

1. élelmiszerminőség-biztosítás (borok, sörök, sajtok, gyümölcsök, aminosav- és amintartalma);
2. bűnügyi korbonctan (hullamérgek mérése);
3. környezetvédelem (iparban alkalmazott aminok vizsgálata);
4. kozmetikaipar (adalékanyagok);

Munkám során a borok, sörök és a borecet aminosav- és amintartalmát tanulmányoztam, azzal a céllal, hogy bemutassam az általam kidolgozott analitikai módszer hatékonyságát, illetve korlátait. Összesen 20 aminosav- és 17 aminkomponens elválasztását tűztük ki célul.

6.5.1. Irodalmi előzmények

Az irodalom áttekintése után megállapítható, hogy az aminok és aminosavak együttes elemzésére az alábbi módszereket alkalmazzák

1. Az aminosavakat és az aminokat egy külön lépésben elválasztják egymástól, majd ezeket külön-külön elemzik különböző analitikai technikákkal. E módszer nagy hátránya, hogy idő- és pénzigényes, illetve bonyolult és nem automatizálható. Az aminosavakat és az aminokat egymástól extrahálással vagy ioncserével választják el, ami jelentős és reprodukálhatatlan veszteségekkel jár.
2. Számos esetben csak az aminok meghatározására volt szükség. Ilyenkor sem tudták azonban elkerülni, hogy az aminosavakat eltávolítsák a mátrixból, mivel ezeket minden biológiai mintában megtalálhatók és jelenlétük zavarja a mérést.

3. A harmadik és a legegyszerűbb módszer, ha egy kromatográfiás felvétel során egyszerre sikerül analizálni mind az aminosavakat mind az aminokat.

Mi az utóbbi eljárást kívántuk tovább fejleszteni. Összesen 22 cikket találtunk, ahol ezt az együttes mérést alkalmazták. Az irodalomban talált példákat tekintve, várható gondot jelentett, hogy sok esetben bonyolult összetételű eluens rendszerrel dolgoztak, sokan használtak trietil-amin (TEA) illetve tetrahidrofuránt (THF) szerves módosítót az elválasztás javítására. A PTC-származékok esetében a sok komponens elválasztását egyik állófázissal sem sikerült maradéktalanul megoldani.

A következő részben röviden említék néhány irodalmi példát és ezek eredményeit.

1. Egy leírásban 90 perc alatt 26 aminosavat és amint választották el DABZYL-Cl származékképző segítségével, 70 °C-on (reakcióidő 15 perc).

2. Bóz és munkatársai összesen 16 aminosavat és amint 110 perc alatt tudtak elválasztani, FMOC-Cl származékképzéssel. E módszer előnye az, hogy a származékképzési eljárás révén a mérések során érzékeny detektálást tudtak alkalmazni. A módszer hátránya viszont, hogy a maradék FMOC-Cl reagensfelesleget és az FMOC-OH és FM-OH mellékterméket a **3.1.1.3. fejezetben (2. ábra)** már ismertetett módszerrel kell eltávolítani.

3. Alberto és munkatársai 24 aminosavat és amint választottak el 50 perc alatt OPA/MCE származékképzési technika segítségével. A módszer hátránya, hogy a reagens csak 24 óráig használható, ezért nem automatizálható könnyen.

4. Antolini és munkatársai ionpárokromatográfiát alkalmazva 40 perc alatt 8 vegyületet választottak el. A 215 nm-en végzett detektálás azonban nem szelektív.

5. Számunkra a legérdekesebb munkát japán kutatók cikkében találtuk, ahol új reagenst használtak. (Karbazol-9-il)-acetyl-kloridot alkalmazva 25 vegyületet sikerül elválasztani 80 perc alatt. A módszer előnye hogy a mérés hibája 5 % alatt van még pmol mennyiségű aminosav mérésénél is. A módszer jelentős hátránya azonban az, hogy a reagens feleslegétől ecetsavoldattal segítségével kell megszabadulni.

6.5.2. Módszerfejlesztés az optimális gradiens program kidolgozására

Az OPA/MPA és az OPA/NAC aminosav- és aminoszármazékainak elválasztására szolgáló HPLC-s módszer optimalizálása során számos kromatográfiai paramétert kellett figyelembe venni és variálnunk, hogy a megfelelő analitikai eljáráshoz jussunk.

1. az alkalmazott eluensek összetétele,
2. az alkalmazott eluensek pH-ja,
3. az alkalmazott eluensek koncentrációja,
4. a gradiens program,
5. az áramlási sebesség és ennek időprofilja,
6. az elválasztást végző oszlop minősége, fajtája,
7. az elválasztást végző oszlop hőmérséklete,
8. a detektálás módja.

Célunk az volt, hogy az általunk kidolgozott módszerrel 37 vegyületet, aminosavat és amint egyidejűleg tudjunk minél rövidebb idő alatt elválasztani. Mivel az OPA/NAC-aminosav- (1A. MÓDSZER) és OPA/MPA/aminosav-származék (1B. MÓDSZER) elválasztását már előzőleg megoldottuk[1], ezért külön elválasztási módszert dolgoztam ki az aminokra. Tapasztalatunk szerint az aminok az aminosavak után eluálódnak, ezért a két módszert egyesítettük. Ezekben az esetben is párhuzamosan a Hypersil és Nucleosil RP C₁₈-as állófázisokkal (3 és 5 µm szemcseméretű oszlopokkal) dolgoztunk.

A továbbiakban 17 aminosav elválasztására két HPLC-s módszert dolgoztunk ki (2A. és 2B. MÓDSZER, **23. ábra, 21. táblázat**). A 2A. MÓDSZER esetében OPA/NAC származék-képző reagenst alkalmaztunk, amellyel 17 aminosavat 35 perc alatt sikerült alapvonal-elválasztással elválasztani. Mivel az OPA/NAC reagens alkalmazása esetén az aminosavak enantiomerjei is elválnak, ezért kidolgoztam a 2B. MÓDSZERT, ahol OPA/MPA reagenst alkalmaztunk, ugyanis ebben az esetben nincs királis szétválás. Az elválasztás ideje itt is 35 perc volt.

A két módszer összehasonlítása útján megállapítható, hogy a 2A. MÓDSZER jöllehet előnyösebb, mint az OPA/MPA reagenst alkalmazó 2B. MÓDSZER, de a természetes mátrixokban jelenlévő aminosavak enantiomerjei miatt a 2A. MÓDSZER alkalmazásakor rengeteg komponens elválasztását kellene megoldani. Az itt bemutatott módszerek kiválóan alkalmazhatóak aminok elválasztására.

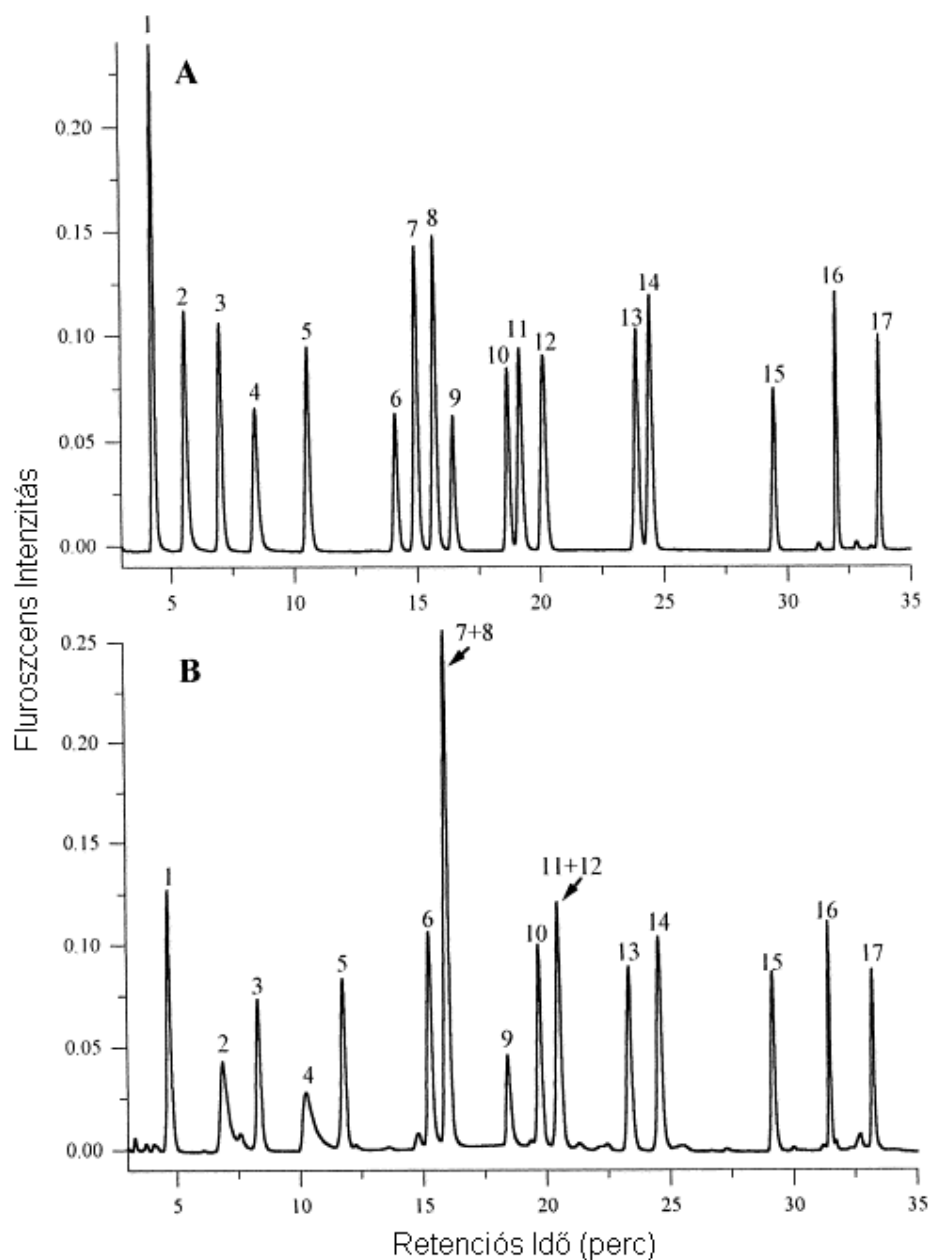
Az aminosavakra kidolgozott 1B. és az aminokra javasolt 2B. MÓDSZER egyszerű egyesítése után azonban négy aminosav (metil-amin, hisztamin, etanolamin, agmatin) más aminosav

savakkal együtt eluálódott. Ezért az aminosavak és aminok együttes elválasztása érdekében további finomítást volt indokolt.

21. táblázat. Modell oldatok amin tartalmának együttes elemzése és reprodukálhatósági vizsgálata: OPA/MPA (2B módszer) származékként fluoreszcenciás intenzitásuk alapján

Aminosavak +Aminok↓ [OPA]/[MPA]: [AA+amin] ^T ⇒	Ret. Idő, Perc↓	Integrátor egység / 1pM aminosav**						
		Injektált ^a pM↓	8,47:1 ^a	16,94:1 ^b	33,89:1 ^c	67,78:1 ^d	Átlag#	RSD %
1 etanolamin	4.15	760	1,87	1,86	1,85	1,82	1,85	1,2
2 hisztamin	5.30	700	1,75	1,78	1,65	1,73	1,73	3,2
3 metil-amin	6.65	610	1,90	1,88	1,76	1,80	1,84	3,6
4 agmatin	8.00	666	1,43	1,47	1,48	1,56	1,49	3,7
5 etil-amin	10.08	637	1,55	1,73	1,73	1,66	1,67	2,2
6 izo-propil-amin	13.60	799	0,672	1,00	1,14	1,33	n.á.	
7 propil-amin	14.42	666	2,22	2,40	2,32	2,55	2,34	4,1
8 tiramin	15.13	677	2,34	2,44	2,35	2,41	2,41	2,0
9 putreszcin	15.83	642	1,05	1,01	0,95	0,98	1,00	4,3
10 kadaverin	18.60	664	1,24	1,28	1,25	1,28	1,26	1,7
11 izo-butil-amin	19.53	587	1,80	1,92	1,94	2,05	1,96	3,1
12 butil-amin	20.35	674	1,76	1,89	1,86	1,90	1,85	1,9
13 izo-amil-amin	23.85	728	1,58	1,62	1,56	1,61	1,59	1,7
14 feniletal-amin	24.35	684	1,92	2,07	2,02	2,09	2,05	1,6
15 hexil-amin	29.03	607	1,50	1,60	1,56	1,60	1,57	3,0
16 heptil-amin	31,79	594	1,64	1,73	1,65	1,71	1,68	2,6
17 oktil-amin	33,55	557	1,59	1,64	1,59	1,65	1,62	2,0

Jelölések:**=legalább három kísérlet átlagértéke; #eltérő molarányok mellett mérve; [OPA/MPA]:[AA]^T = 8,97:1; 17,93:1; 35,87 és 71,74:1; [OPA]^{a,b,c,d} = 1,01x10⁻⁷M; 1–17 = megegyezik az aminok kromatogramjain szereplő számokkal; a dőlt betűk az átlagba nem voltak beszámolva; pM^a= Az aminok összegének legmagasabb mennyisége 10 µl-t injektálva; n.á. = nincs átlagolva



23. ábra OPA/NAC/amin- (A: 2A. MÓDSZER) és OPA/MPA/amin-származékok (B: 2B. MÓDSZER) elválasztása HPLC-vel az optimált módszerekkel. A csúcsok számozása meg-
egyezik az 17. táblázatával

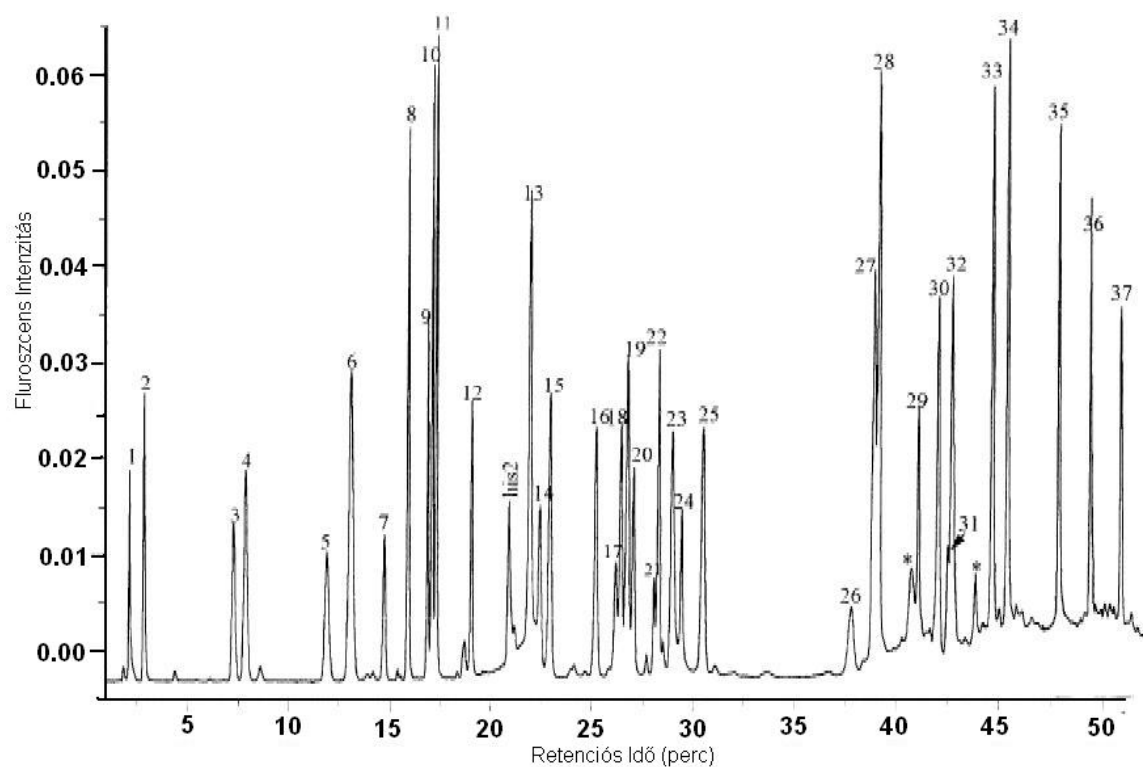
A 1B. MÓDSZER és a 2B MÓDSZER egyesítése után (3. MÓDSZER) kiderült, hogy ez az eljárás elsőre nem járt sikerrel, ugyanis az aminok többnyire a várt helyen az aminosavak után jöttek, de a már említett négy amin (metil-amin, etil-amin, etanolamin, hisztamin) becsúszott az aminosavak közé, és kromatográfiai csúcsaik átfedtek az aminosavak csúcsai-
val. A továbbiakban ezért együtt kellett optimalni a módszert. Hosszas kísérletezés után sem

sikerült a 3. MÓDSZERben alkalmazott körülményekkel az összes együttes elúciót megoldani. Mivel az említett szokásos biner eluens rendszerrel (1B+2B. MÓDSZER), ami, egy vizes puffert (A eluens) és acetonitrilt (B eluens) jelent, nem sikerült kielégítő eredményt elérni, ezért áttértünk a kvaterner rendszer használatára. Végül sikerült egy négy eluensből álló **(5.9.3 fejezet)** kvaterner rendszerrel 20 aminosavat és 17 amint egymás mellett 53 perc alatt elválasztani **(24. ábra, 22. táblázat)**. Az optimálás során hasznosítottuk azt a megfigyelést, hogy a metanol szelektíven hat a származékok elúciójára, és ezt felhasználva el tudtuk választani az átfedő csúcsokat.

22. táblázat. Modelloldatok aminosav (piros) és amin (fekete) tartalmának együttes elemzése és reprodukálhatósági vizsgálata: OPA/MPA származékként fluoreszcenciás intenzitásuk alapján. A 17: hisztidin, 26: izopropil-amin, 27: ornitin, 28: tiramin, 30: izobutil-amin, 35: hexil-amin, 36: heptil-amin és 37: oktil-amin vegyületeket nem tüntettük fel a táblázatban, mert a vizsgált biológiai mintákban nem szerepelnek

Áblázatban Aminosavak +Aminok↓ [OPA]/[MPA]: [AA+amin] ^T ⇒	Ret. Idő, Perc↓	Integrátor egység / 1pM aminosav**						
		Injektált ^a pM↓	8,47:1 ^a	16,94:1 ^b	33,89:1 ^c	67,78:1 ^d	Átlag#	RSD %
1 aszparaginsav	2.12	363.4	2.81	2.70	2.90	2.80	2.80	3.0
2 glutaminsav	2.78	392.8	3.44	3.57	3.77	3.74	3.63	4.0
3 aszparagin	6.87	320.0	3.26	3.24	3.54	3.53	3.39	4.6
4 szerin	7.53	191.3	3.76	3.61	3.99	4.15	3.88	5.1
5 glutamin	11.48	74.8	3.73	3.96	4.09	4.10	3.97	4.3
6 glicin	12.72	225.7	4.09	4.10	4.31	4.42	4.23	3.9
7 treonin	14.72	351.5	3.03	3.05	3.31	3.29	3.17	4.8
8 β-alanin	15.80	397.6	2.10	2.09	2.21	2.29	2.17	4.4
9 alanin	16.80	1003	3.40	3.39	3.58	3.47	3.46	2.5
10 arginin	17.02	1795	4.76	4.91	5.05	4.89	4.90	2.6
11 GABA	17.58	1439	3.73	3.80	3.90	3.99	3.85	3.0
12 tirozin	19.18	355.6	3.86	3.80	4.15	4.03	3.96	3.9
13 etanolamin	22.05	543.9	6.66	6.73	7.09	6.99	6.87	3.0
14 valin	22.77	383.8	3.36	3.20	3.52	3.38	3.36	3.8
15 metionin	23.05	400.0	2.19	2.11	2.21	2.17	2.17	2.7
16 triptofán	25.26	293.5	9.93	9.53	10.08	9.69	9.80	2.7
18 fenilalanin	26.45	361.0	5.06	4.47	4.60	4.43	4.50	2.0
19 metil-amin	26.67	89.1	4.14	3.83	3.97	3.85	3.95	4.2
20 izoleucin	27.03	364.0	3.33	3.55	3.66	3.67	3.55	4.2
22 leucin	28.08	179.0	4.74	4.68	5.00	5.09	4.88	3.9
23 agmatin	28.85	189.5	3.07	3.08	3.13	3.17	3.11	2.3
24 lizin	30.12	182.0	1.27	1.27	1.24	1.29	1.26	2.7
25 etanolamin	30.75	44.9	4.30	4.06	4.09	4.19	4.16	2.7
26 spermin	39.00	491.1	10.26	10.16	9.82	10.05	10.07	2.6
29 kadaverin	42.58	46.9	3.01	2.94	2.91	n.a.	2.95	1.9
31 butil-amin	43.50	47.6	3.27	3.13	3.16	n.a.	3.18	2.0
32 putreszcin	43.98	103.7	9.26	9.39	7.84	n.a.	8.49	8.7
33 feniletil-amin	45.32	96.9	5.87	5.85	5.87	5.72	5.81	1.3
34 izo-amil-amin	46.08	103.1	5.21	5.13	5.03	n.a.	5.12	2.0

Jelölések:**legalább három kísérlet átlagértéke; #eltérő molarányok mellett mérve [OPA/MPA]:[AA]^T = 8,97:1; 17,93:1; 35,87 és 71,74:1; [OPA]^{a,b,c,d} = 1,01x10⁻⁷M; 1–17 = megegyezik az aminok kromatogramjain szereplő számokkal; a dőlt betűk az átlagba nem voltak beszámolva; pM^a = Az aminok összegének legmagasabb mennyisége 10 µl-t injektálva; n.a. = nincs adat



24. ábra Az aminosavak és aminok OPA/MPA-származékaik elválasztása modelloldatokból (3. MÓDSZER). A csúcsok számozása megegyezik a **22. táblázat**ével. 17: hisztidin, 26: izopropil-amin, 27: ornitin, 28: tiramin, 30: izobutil-amin, 35: hexil-amin, 36: heptil-amin, 37: oktil-amin

6.6. Sör- és borminták amin- és aminosavtartalmának meghatározása OPA/MPA-származékként (3. MÓDSZER)

Biológiai minták, mint például borok és sörök aminosav- illetve aminösszetétele, illetve amin/aminosav aránya igen fontos paraméterek ezen italok minőségére és életkorára vonatkozóan. Az érési folyamatok során, az úgynevezett biológiai eredetű dekarboxileződési folyamatok révén az aminosavakból aminok képződnek, jellegzetes zamatot vagy időnként undort keltő ízt produkálva. A szakemberek a fent említett paraméterek ismeretében képesek pontosan következtetni az italok alábbi jellemzőire:

1. a készítés idejére,
2. a készítés helyére,
3. a bor korára,
4. a minőségére: igazi vagy hamisítvány,
5. a készítés módjára,
6. a felhasznált alapanyagokra vonatkozóan.

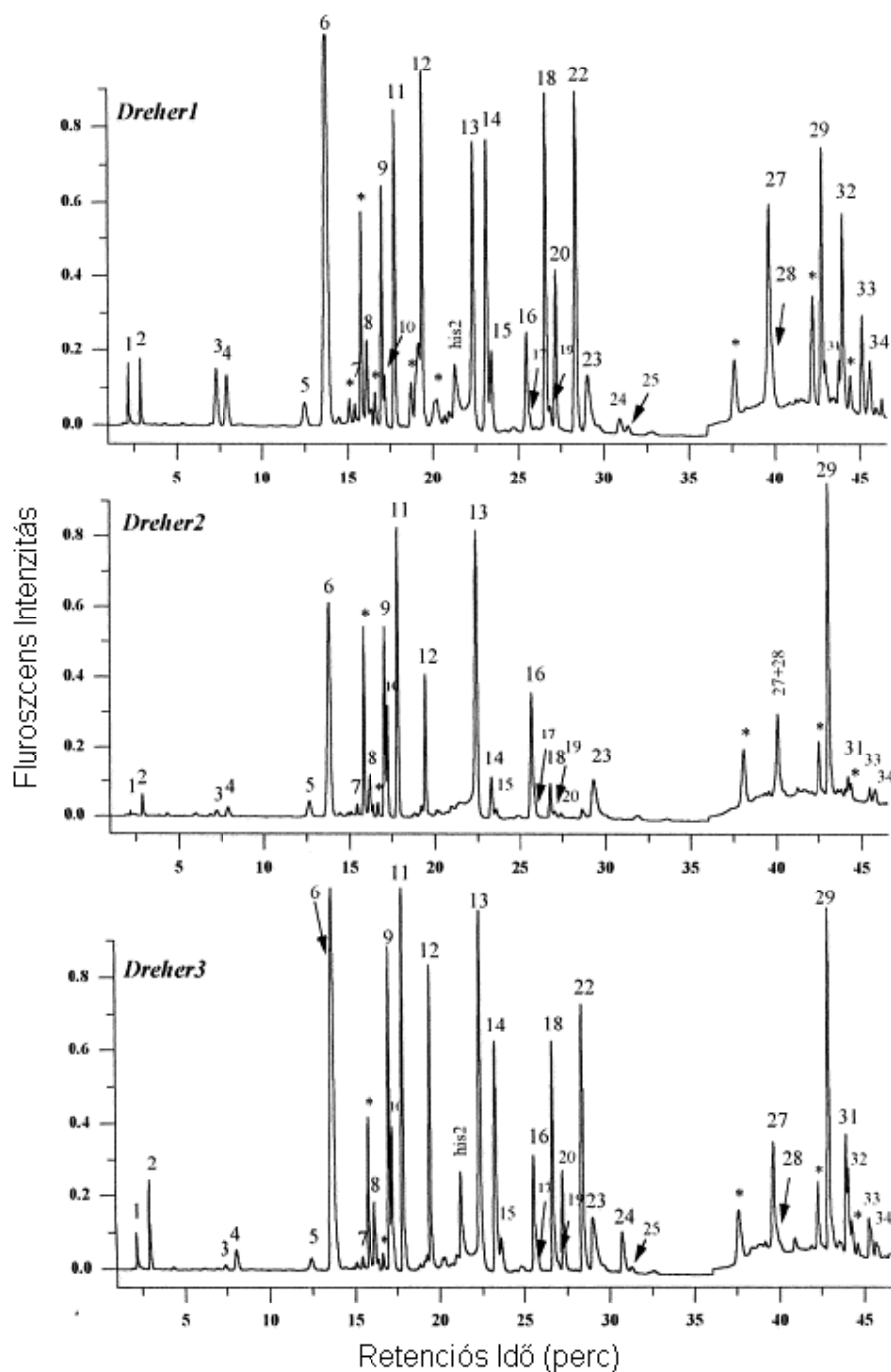
Az aminok mennyiségének és minőségének meghatározása és ismerete egészségügyi szempontból is fontos, mivel a hisztidin aminosav dekarboxilezett származéka, a hisztamin allergiát okozó vegyület, és egyes embereknél súlyos rohamokat is kiválthat.

Munkám során, háromféle sör (Dreher 1 = láger; Dreher 2 = klasszik; Dreher 3 = bak) és háromféle bor (egy fehér és két vörös) és egy borecet vizsgálatával teszteltük a módszerünket. Eredményeinket röviden összefoglalva megállapíthatjuk, hogy kidolgozott módszerünket (3. MÓDSZER) az említett összes biológiai mintán hatékonyan és gyakorlatilag problémamentesen tudtuk alkalmazni. Az eredményeket a **23. táblázatban** és a **25–26. ábrán** foglaltam össze.

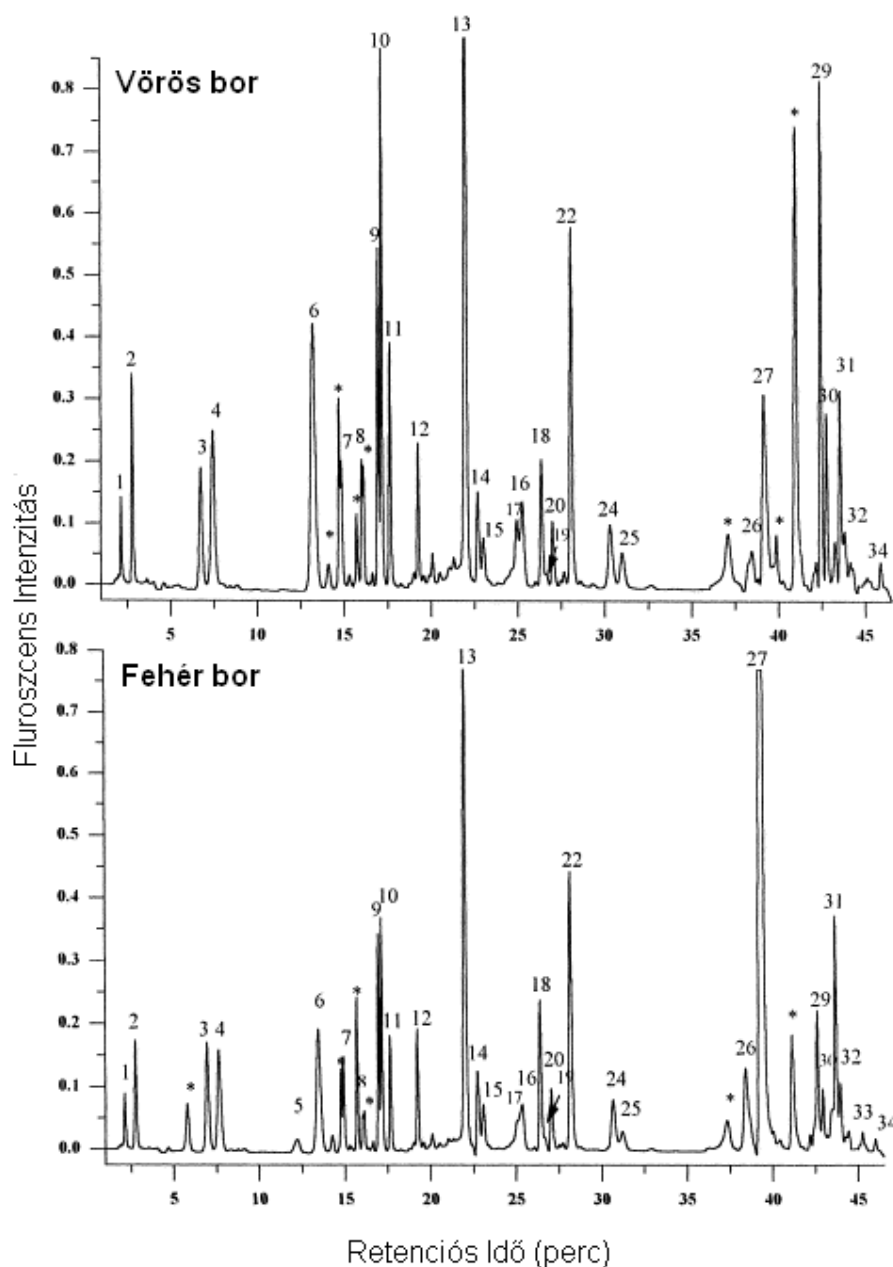
23. táblázat. Minták aminosav (piros) és amin (fekete) tartalmának együttes elemzése és reprodukálhatósági vizsgálata OPA/MPA-származékként fluoreszcenciás intenzitásuk alapján

Aminosav és Amin↓ Minta→	Aminosav és Amin mg/L							
	Sörök				Borok			Borecet
	Dréher1	Dréher2	Dréher3	Hofpills	Fehér	Vörös1	Vörös2	
1 Aszparaginsav	6,30	3,98	0,34	5,68	8,12	4,04	3,08	4,78
2 Glutaminsav	7,02	8,98	2,76	10,9	18,3	4,16	4,48	8,88
3 Aszparagin	3,94	0,38	0,44	4,98	5,66	1,14	0,56	2,22
4 Szerin	2,24	0,92	0,44	3,36	5,80	1,06	1,98	1,04
5 Glutamin	1,78	1,26	1,24	0,90	-	20,9	-	1,30
6 Glicin	16,6	14,4	7,20	3,28	7,50	1,94	2,68	9,04
7 Treonin	0,46	0,34	0,30	2,36	3,24	2,16	1,78	0,38
8 β-Alanin	1,52	1,36	1,00	0,46	1,36	0,20	0,64	0,46
9 Alanin	20,6	27,6	16,3	11,2	18,3	5,20	6,90	21,10
10 Arginin	7,42	20,9	17,5	21,5	50,0	2,56	1,62	21,30
11 GABA	32,4	40,5	30,6	7,72	16,6	3,00	6,90	21,50
12 Tirozin	16,9	12,5	6,16	3,28	3,70	0,76	0,88	14,00
13 Etanolamin	3,58	4,70	4,04	4,26	5,56	2,30	2,06	3,44
14 Valin	14,2	12,3	2,26	2,76	3,08	1,40	2,44	12,00
15 Metionin	3,62	1,60	0,46	1,66	1,52	0,20	0,32	1,46
16 Triptofán	3,84	4,28	5,14	2,78	5,44		0,40	4,64
18 Fenilalanin	15,9	10,7	1,66	4,84	4,24	1,04	1,80	15,10
19 Metil-amin	0,58	0,20	0,16	0,18	0,20	0,060	0,12	0,26
20 Izoleucin	6,96	4,28	0,22	1,96	1,98	0,84	1,12	4,24
22 Leucin	12,4	9,18	-	6,64	7,68	2,30	1,88	9,00
23 Agmatin	13,0	12,1	9,76	-	-	-	-	18,20
24 Lizin	4,90	10,9	-	12,5	14,0	4,30	4,24	9,26
25 Etanolamin	0,18	0,14	-	0,34	0,64	0,20	0,40	0,10
26 Spermin	-	-	-	0,88	0,14	0,080	0,060	-
27 Spermidin	0,44	0,14	0,74	5,18	1,34	0,56	0,42	0,32
28 Tiramín	1,16	0,52	-	-	-	-	1,34	1,04
29 Kadaverin	1,00	1,36	0,08	0,38	1,22	0,38	20,20	2,04
30 Izobutil-amin	0,06	-	-	0,040	0,14	-	-	0,040
31 Butil-amin	0,06	-	-	0,040	0,14	-	-	0,040
32 Putreszcin	2,06	0,90	-	1,40	1,26	0,14	-	1,56
33 Feniletilamin	0,24	0,14	0,036	0,040	0,16	-	0,22	0,12
34 Izoamil-amin	0,14	0,04	0,034	0,24	0,18	0,20	0,52	0,14
Összes Aas: mg/L	201,5	206,5	108,9	121,7	187,6	60,9	69,0	189,1
10–9 M/10μL ^{&}	50,3	51,6	27,2	30,4	46,9	15,2	17,3	47,3

Jelölések: **legalább három kísérlet átlagértéke; #eltérő molaritások mellett mérve [OPA/MPA]:[AA][†] = 8,97:1; 17,93:1; 35,87 és 71,74:1; [OPA]^{a,b,c,d} = 1,01x10⁻⁷M; 1–17 = megegyezik az aminok kromatogramjain szereplő számokkal; a dőlt betűk az átlagba nem voltak beszámolva; pM^a = az aminok összegének legmagasabb mennyisége 10 μl-t injektálva; n.a.=nincs adat



25. ábra. Sörminták OPA/MPA/aminosav- és OPA/MPA/amin származékainak elválasztása (3. MÓDSZER). A csúcsok számozása megegyezik az **18. táblázatával**. 17: hisztidin, 26: izopropil-amin, 27: ornitin, 28: tiramin, 30: izobutil-amin, 35: hexil-amin, 36: heptil-amin, 37: oktil-amin



26. ábra. Borminták OPA/MPA/aminosav- és OPA/MPA/amin-származékainak elválasztása (3. MÓDSZER). A csúcsok számozása megegyezik az **18. táblázatéval**. 17: hisztidin, 26: izopropil-amin, 27: ornitin, 28: tiramin, 30: izobutil-amin, 35: hexil-amin, 36: heptil-amin, 37: oktil-amin

7. ÖSSZEFOGLALÁS

7.1. Célkitűzések és vizsgálati módszerek

Bizonyos OPA/tiol/aminosav-származékok kutatócsoportunk által is tapasztalt bomlási képessége már régóta ismert az irodalomban, és ezt igen komoly hátránnyként tartják számon. Megfigyelték, hogy ezen bomlékony aminosavszármazékok esetében a többi aminosavnál megszokott, elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származékok („izoindol-aminosavak”) néhány perc alatt, részben másodlagos termékekké alakulnak át, amelyek a kromatogramban új csúcsként jelentkeznek. Doktori munkám során ezen bomlási vagy átalakulási reakcióik vizsgálatát tűztem ki célul, az irodalom részletes és alapos áttanulmányozása után feladataim a következők voltak:

1. Az irodalomban alkalmazott módszerek elsajátítása és reprodukálása.
2. Az OPA/tiol/aminosav-származékok képződési és átalakulási folyamatainak időbeli (kinetikai) követése.
3. Tanulmányozandó továbbá, az OPA/tiol/aminosav-származékok átalakulási sebességének függése a származékolószert és aminosav molarányától.
4. Vizsgálandó a reakcióelegy pH-jának hatása az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék átalakulására.
5. Szintén tanulmányozzuk a származékképző szer reagensösszetételének ([OPA]:[tiol] arány) hatását.
6. HPLC-MS módszer alkalmazása a másodlagosan keletkező, átalakult termékek molekulatömegének és kémiai szerkezetének felderítésére.
7. Az ismert kémiai szerkezet ismeretében javaslat a másodlagos termékek keletkezési mechanizmusára.
8. Kísérlet a másodlagos termékek képződésének visszaszorítására.
9. Az elért eredmények felhasználása a még bomlékonyabbnak tartott OPA/tiol/aminoszármazékok bomlásának megelőzésére.
10. Az irodalomban talált példák alapján igen fontosnak tűnt az aminosavak és aminok egymás melletti meghatározási HPLC-s módszerrel, ezért célul tűztük ki, hogy a legtöbb aminosavat és biológiailag fontos amint egy kromatográfiás futtatás alatt elválasszunk.
11. A 10. pontban kidolgozott analitikai módszerrel valós minták (borok, sörök) aminosav- és amintartalmának meghatározása, egyben tesztelve módszer alkalmazhatóságát.

7.2. Az értekezésben foglalt új tudományos eredmények

1. Az irodalomban az aminosavak és aminok származékolására az [OPA]:[tiol] = 1:3 reagens-molarányt alkalmaztak. Sokoldalúan felderítettük az OPA/MPA és az OPA/NAC származékképző reagenseknek a kromatográfiás elemzés szempontjai szerinti legfontosabb jellemzőit. A mások által publikált eredményeket megbízhatóan reprodukálni tudtuk és megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált aminosavakat az elsődlegesen képződött származékuk bomlékonyságának függvényében két fő csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba az egy csúcsban, míg a második csoportba a HPLC vizsgálat során több csúcsban eluálódó aminosavak tartoznak (az utóbbiak a glicin, β -alanin, lizin, orinitin, γ -amino-vajsav és a hisztidin). Elsőként végeztük el az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok stabilitásának és HPLC tulajdonságainak azonos feltételek közötti, részletes összehasonlítását.

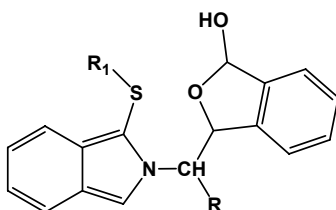
2. A 2. csoportba tartozó aminosavaknál sikerült az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származékok átalakulásának időbeli lefutását (kinetikáját) meghatározni. Az elsődleges származék jele csökken, míg a másodlagos termékeké nő. Megállapítottuk, hogy a 2. csoportba tartozó aminosavak esetében az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék HPLC csúcsainak és az ebből keletkező másodlagos csúcsoknak az összege időben állandó. Ezzel bizonyítottuk, hogy a másodlagos termékek az elsődlegesen keletkező származék átalakulása útján jönnek létre. Ez az eredmény lehetővé teszi a 2. csoportba tartozó aminosavak, bomlékonynak tartott származékai esetében is a kvantitatív és megbízható meghatározást.

3. Megállapítottuk, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származékok átalakulási sebessége nem függ a reagens és az aminocsoport molarányától.

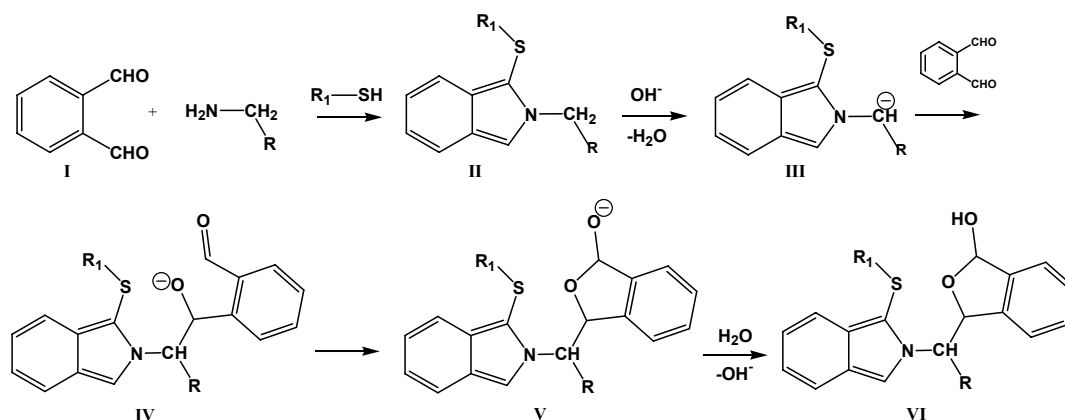
4. Kimutattuk, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék stabilitása nagymértékben függ a reakcióközeg pH-jától: savas tartományban nagyobb, míg lúgos tartományban kisebb az átalakulás sebessége. Eredményeink alapján, a pH = 9.3-as közeget javasoljuk, mint optimális pH értéket.

5. Megállapítottuk, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék stabilitása az [OPA] : [tiol] reagensarányától függ leginkább. Míg az [OPA]:[tiol] = 1 : 3 arány jelenlétében az átalakulás igen jelentős (7 perc alatt már nagy mértékű a bomlás), addig az 1:10-es illetve 1:50-es reagensarány mellett az átalakulás 6 óra múlva sem jelentős. Ez, az általunk elsőként közölt, jelentősnek tekinthető eredmény lehetőséget nyújtott arra, hogy az elsődleges OPA/tiol-származékot stabilizáljuk.

6. Kooperáció keretében, HPLC-MS technikával sikerült meghatározni a 2. csoportba tartozó aminosavak elsődleges OPA/tiol/aminosav-származékaiból keletkező másodlagos termékek molekulatömegét. Ez mindig az elsődlegesen keletkezett termék molekulatömegénél egy OPA molekulatömegével volt nagyobb: $M(\text{elsődleges termék}) = \text{AA} + \text{OPA} + \text{tiol} - 2\text{H}_2\text{O}$; $M(\text{másodlagos termék}) = M(\text{elsődleges termék}) + \text{OPA}$. Ennek alapján nagy biztonsággal az alábbi kémiai szerkezetet valószínűsítettük:



7. Az átalakult termék kémiai szerkezetének ismeretében a következő képződési mechanizmust tételeztük fel:



8. Megállapítottuk, hogy a már ismert mechanizmus szerint képződő, a mérést zavaró, másodlagos termék megjelenését a jelenlévő magas tiolkoncentráció képes visszaszorítani, így vizsgálataink szerint az $[\text{OPA}] : [\text{tiol}] = 1 : 50$ reagensarány és a $\text{pH} = 9.3$ -as reakcióközeg az optimális.

9. Az aminosavak OPA/tiol reagenssel kiváltott származékképzési reakciójának eredményes tanulmányozása révén a még bomlékonyabb OPA/tiol-származékot adó mono-, di- és poliaminok OPA/tiol-származékait is stabilizálni tudtuk.

10. Megoldottuk 20 aminosav és 17 amin egy kromatográfiás futtatás alatti elválasztását 51 perc alatt egy kvaterner eluens rendszer segítségével.

11. Az általunk kidolgozott HPLC-s rendszert sikeresen alkalmaztuk valóságos biológiai minták, borok és sörök aminosav- és amintartalmának mérésére.

7.3. Az eredmények gyakorlati alkalmazása

Az aminosavak és aminok egymás mellett történő meghatározása számos gyakorlati munkában fontos szerepet játszik, mivel ezek a vegyületek igen fontos és változatos markerekként szerepelnek a biológiai szervezetekben. Számos szakterületen nagy igény van egy jól működő, reprodukálható, gyors és megbízható módszerre, amelynek segítségével a biológiailag fontos aminosavak és aminok minősége és mennyisége meghatározható.

Ilyen területek:

1. élelmiszerminőség-biztosítás (borok, sörök, sajtok, gyümölcsök aminosav- és amintartalma);
2. bűnügyi korbonctan (hullamérgek mérése);
3. környezetvédelem (iparban alkalmazott aminok vizsgálata);
4. kozmetikaipar (adalékanyagok).

Ezeket az analitikai módszereket az élelmiszeriparban gyakran és előszeretettel alkalmazzák a minőség és a technológia ellenőrzésére, mivel az aminosavak a különböző technológiai műveletek során biológiai úton dekarboxileződhetnek káros aminokká. Munkám során én a borok, sörök és a borecet aminosav- és amintartalmát tanulmányoztam, azzal a céllal, hogy valós igényeket kielégítő és gyakorlati munka során demonstráljam az általam kidolgozott analitikai módszer hatékonyságát és korlátait. Összesen 20 aminosav és 17 amin komponens elválasztását oldottuk meg rövidnek mondható, 51 perces kromatográfiás futtatás alatt. A módszer reprodukálhatósága és kimutatási határa is kiválónak mondható.

8. IRODALOMJEGYZÉK

8.1. Az értekezés alapját képező publikációk

- [1] A. Vasanits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl; J. Chromatogr. A, 870, 271(2000)
- [2] D. Kutlán, Molnár-Perl; Chromatographia, 53, 1(2001)
- [3] Y. Mengerink, F. Tóth, D. Kutlán, I. Molnár-Perl; J. Chromatogr. A, 949, 99 (2002)
- [4] D. Kutlán, P. Presits, I. Molnár-Perl; J. Chromatogr. A, 949, 235 (2002)
- [5] R. Hanczkó, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl; J. Chromatogr. A, 949, 235 (2002)
- [6] D. Kutlán, I. Molnár-Perl; J. Chromatogr. A, 987, 311 (2003)
- [7] A. Csámpai, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl; J. Chromatogr. A, 1031, 67 (2004)

8.2. Irodalmi idézetek

- [8] L. Stryer: *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, (1996)
- [9] Elődi P., *Biokémia*, Akadémiai Kiadó, Budapest, (1989)
- [10] C.W. Gehrke, R.W. Zumwalt, D.L. Stalling, D. Roach, W.A. Aue, C. Ponnampuruma és K.K. Kvenvolden, J. Chromatogr., 59, 305 (1971)
- [11] S. Moore és W.H. Stein, J. Biol. Chem. 192, 663 (1951)
- [12] H.J. Chaves-das-Neves és Z. Braga-Morais, Anal. Quim., 93, 98 (1997)
- [13] H.J. Chaves-das-Neves és Z. Braga-Morais, J. High Resol. Chromatogr., 20, 115 (1997)
- [14] J.A. Peterson, L.J. Lorenz, D.S. Risley és B.J. Sandmann, J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol., 22, 1009 (1999)
- [15] K. Petritis et al., J. Chromatogr. A, 833, 147 (1999)
- [16] K. Petritis et al., Spectra 2000 Anal., 211, 31 (1999)
- [17] P. Chaimbault et al., J. Chromatogr. A, 855, 191 (1999)
- [18] P. Chaimbault et al., J. Chromatogr. A, 870, 245 (2000)
- [19] K. Petritis et al., J. Chromatogr. A, 896, 253 (2000)
- [20] K. Petritis et al., J. Chromatogr. A, 896, 335 (2000)
- [21] K. Petritis, C. Elfakir és M. Dreux, LC·GC Európa, 14, 389 (2001. július)
- [22] M. Eslami, P. Hashemi and M. N. Sarbolouki, J. Chromatogr. Sci., 31, 480 (1993)
- [23] F. Y. Tsai, C. J. Chen and C. S. Chien, J. Chromatogr. A., 697, 309 (1995)
- [24] R. Schuster, Anal. Chem. 52, 617 (1980)
- [25] A. Martens and W. T. Frankerberger, Jr., J. Liquid Chromatogr., 15, 423 (1992)

- [26] J. Clarke, *Anal. Biochem.*, 212, 344 (1993)
- [27] P. J. Vandenberg and D. C. Johnson, *Anal. Chem.*, 65, 2713 (1993)
- [28] C.M. Selavaka, K.-S. Jiao és I.S. Krull, *Anal. Chem.*, 59, 2221 (1987)
- [29] H. Engelhardt, *Eur. Chromatogr. News.*, 2, 20 (1988)
- [30] D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore, *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958)
- [31] H. Iwase, S. Ozawa, M. Ikuta and I. Ono, *J. Chromatogr. B.*, 663, 15 (1995)
- [32] J. Csapó, Zs Csapó-Kiss, T. G. Martin, S. Folestad, O. Orwar, A. Tivesten and S. Némethy, *Anal. Chim. Acta*, 300, 313 (1995)
- [33] J. A. Grunnau and J. M. Swiader, *J. Chromatogr.*, 594, 165 (1992)
- [34] S. Stein, P. Böhlen, J. Stone, W. Dairman és S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 203 (1973)
- [35] M. Roth és A. Hampad', *J. Chromatogr.*, 83, 353 (1973)
- [36] J.R. Cronin és P.E. Hare, *Anal. Biochem.*, 81, 151 (1977)
- [37] H. Sista, *J. Chromatogr.*, 359, 231 (1986)
- [38] W.H. Stein és S. Moore, *J. Biol. Chem.*, 176, 337 (1948)
- [39] Y. Watanabe és K. Imai, *Anal. Chem.*, 55, 1786 (1983)
- [40] I.M.-Perl, *J. Chromatogr. A*, 913, 283 (2001)
- [41] I.M.-Perl, *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, (2000), Vol. III/Amino Acids/Liquid Chromatography, 1999-2012.
- [42] M. Roth, *Anal. Chem.*, 43, 880 (1971)
- [43] Georgi, C. Pietsch and G. Sawatzki, *J. Chromatogr.*, 613, 35 (1993)
- [44] D. Fekkes, A. van Dalen, M. Edelman and A. Voskuilen, *J. Chromatogr. B.*, 669, 177 (1995)
- [45] V. Rizzo, A. Anesi, L. Montalbetti, G. Bellantoni, R. Trotti, G. V. Melzi d'Eril, *J. Chromatogr. A.*, 729, 181 (1996)
- [46] G. Michael and G. Henrion, *GIT Fachz. Lab.*, 9, 769 (1995)
- [47] S. Palermo, M. Marchis, M. Prati and E. Fugassa, *Anal. Biochemistry.*, 202, 152 (1992)
- [48] H. M. H. van Eijk, D. R. Rooyakkers and N. E. P. Deutz, *J. Chromatogr.*, 620, 143 (1993)
- [49] T. Teerlink, P. A. M. van Leeuwen and A. Houdijk, *Clin. Chem.*, 40, 245 (1994)
- [50] M. Catalá-Icardo, M. J. Medina-Hernández and M. C. G. Alvarez-Coque, *J. Liquid Chromatogr.*, 18, 2827 (1995)
- [51] M. Zhao and J. L. Bada, *J. Chromatogr. A.*, 690, 55 (1995)
- [52] H. Bückner, S. Haasmann and A. Friedrich, *Amino. Acids.*, 6, 205 (1994)

- [53] H. Brückner, S. Haasmann, M. Langer, T. Westhauser and R. Wittner, *J. Chromatogr.*, 666, 259 (1994)
- [54] H. Brückner és T. Westhauser, *Chromatographia*, 39, 419 (1994)
- [55] H. Brückner, M. Langer, M. Lüpke, T. Westhauser, H. Godel, *J. Chromatogr. A*, 697, 229 (1995)
- [56] A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi and T. Hayashi, *J. Chromatogr.*, 582, 41 (1992)
- [57] M. Roth és A. Hampai, *J. Chromatogr.*, 83, 353 (1973)
- [58] A. Himuro, H. Nakamura és Z. Tamura, *J. Chromatogr.*, 264, 423 (1983)
- [59] D.G. Drescher és K.S. Lee, *Anal. Biochem.*, 84, 559 (1979)
- [60] H. G. Worthen and H. Liu, *J. Liquid Chromatogr.*, 15, 3323 (1992)
- [61] T. Bartók, G. Szalai, Zs. Lőrincz, G. Börcsök and F. Sági, *J. Liquid Chromatogr.*, 17, 4391 (1994)
- [62] C. Carducci, M. Birarelli, V. Leuzzi, G. Santagata, P. Serafini and I. Antonozzi, *J. Chromatogr. A*, 729, 173 (1996)
- [63] K. Blau és J.M. Halket, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, J. Wiley & Sons Ltd, (1993), Fluorescent Derivatives, 186.
- [64] R. Bank, E. Jansen, B. Beekman and J. M. Koppele, *Anal. Biochem.*, 240, 167 (1996).
- [65] U. Arnold, E. Ludwig, R. Kühn and U. Möschwitzer, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 199, 22 (1994)
- [66] K. Ou, M. R. Wilkins, J. X. Yan, A. A. Gooley, Y. Fung, D. Sheumack and K. L. Williams, *J. Chromatogr. A*, 723, 219 (1996)
- [67] C. M. Grzywacz, *J. Chromatogr. A*, 676, 177 (1994)
- [68] B. Gustavsson és I. Betner, *J. Chromatogr.*, 507, 67 (1990)
- [69] 132: P. Edman, *Acta Chem. Scand.*, 4, 283 (1950)
- [70] P.A. Graffeo, A. Haag és B.L. Karger, *Anal. Lett.*, 6, 505 (1973)
- [71] C. Bollet és M. Caude, *J. Chromatogr.*, 121, 323 (1976)
- [72] C.L. Zimmerman, E. Apella és J.J. Pesano, *Anal. Biochem.*, 77, 569 (1977)
- [73] D. E. H. Palladino, R. M. House and K. A. Cohen, *J. Chromatogr.*, 599, 3 (1992)
- [74] S. R. Hagen, *J. Chromatogr.*, 632, 63 (1993)
- [75] S. R. Hagen, J. Augustin, E. Grings and P. Tassinari, *Food Chem.*, 46, 319 (1993)
- [76] J. K. Khan, Y-H. Kuo, N. Kebede, F. Lambein, *J. Chromatogr. A*, 687, 113 (1994)
- [77] M. Morvai, V. Fábián and I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr.*, 600, 87 (1992)
- [78] I. Molnár-Perl and M. Morvai, *Chromatographia*, 34, 132 (1992)

- [79] I. Molnár-Perl, M. Pintér-Szakács and M. Khalifa, J. Chromatogr., 632, 57 (1993)
- [80] I. Molnár-Perl and M. Khalifa, Chromatographia, 36, 43 (1993)
- [81] I. Molnár-Perl, J. Chromatogr., 661, 43 (1994)
- [82] E. Tatár, M. Khalifa, Gy. Záray and I. Molnár-Perl, J. Chromatogr. A., 672, 109 (1994)
- [83] K. Schmeer, M. Khalifa, J. Császár, Gy. Farkas, E. Bayer and I. Molnár-Perl, J. Chromatogr. A., 691, 285 (1995)
- [84] I. Molnár-Perl, J. Chromatogr. A., 763, 1 (1997)
- [85] C-Y. Yang, T. Yang and B. K. Yeh, J. Protein Chem., 12, 11 (1993)
- [86] L. Gorbics, L. Ürge and L. Ötvös. Jr., J. Chromatogr. A., 676, 169 (1994)
- [87] I. Krause, A. Bockhardt, H. Neckermann, T. Henle and H. Klostermeyer, J. Chromatogr. A., 715, 67 (1995)
- [88] J.-K. Lin és C.-H. Wang, Clin. Chem., 26, 579 (1980)
- [89] K. Blau és J.M. Halket, Handbook of Derivatives for Chromatography, J. Wiley & Sons Ltd, (1993), Fluorescent Derivatives, 177-183.
- [90] T. Takeuchi and T. Miwa, Chromatographia, 40, 159 (1995)
- [91] T. Takeuchi and T. Miwa, J. Chromatogr. A., 696, 185 (1995)
- [92] A. R. Martins and A. P. Padovan, J. Liquid Chromatogr., 19, 467 (1996)
- [93] T. Takeuchi and N. Nagae, J. High Chromatogr., 15, 121, (1992)
- [94] T. Takeuchi and T. Miwa, Anal. Chim. Acta, 292, 275, (1994)
- [95] B. Galli, F. Gasparini, D. Misiti és C. Villani, J. Chromatogr. A, 666, 77 (1994)
- [96] N. Nimura, K. Iwaki, T. Kinoshita, K. Takeda és H. Ogura, Anal. Chem., 58, 2372 (1986)
- [97] S. A. Cohen and D. P. Michaud, Anal. Biochem., 211, 279 (1993)
- [98] D. J. Strydom and S. A. Cohen, Anal. Biochem., 222, 19 (1994)
- [99] S. A. Cohen, and K. M. De Antonis, J. Chromatogr., 661, 25 (1994)
- [100] C. van Wandelen and S. A. Cohen, J. Chromatogr. A., 763, 11 (1997)
- [101] I.M.-Perl, Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, (2000)
- [102] K. Blau és J.M. Halket, Handbook of Derivatives for Chromatography, J. Wiley & Sons Ltd, (1993)
- [103] R. W. Zumwalt, K. C. T. Kuo and C. W. Gehrke (Editor), Amino Acid Analysis by Gas Chromatography CrC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1987, Vol. I-III.
- [104] F. E. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumalt és K.C. Kuo, J. Chromatogr., 94, 113 (1974)
- [105] C.W. Moss, M. A. Lambert és F. J. Diaz, J. Chromatogr., 60, 134 (1971)
- [106] J. Desgres, D. Boisson és P. Padieu, J. Chromatogr., 162, 133 (1979)
- [107] J. R. Coulter és C. S. Hann, J. Chromatogr., 36, 42 (1968)

- [108] R. F. McGregor, G. M. Brittin és M. S. Sharon, *Clin. Chim. Acta.*, 48, 65 (1973)
- [109] P. S. S. Dawson, *Biochim. Biophys. Acta*, 111, 51 (1965)
- [110] A. Darbre és K. Blau, *J. Chromatogr.*, 17, 31 (1963)
- [111] F. E. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumalt és K.C. Kuo, *J. Chromatogr.*, 94, 113 (1974)
- [112] G. Gamerith, *J. Chromatogr.*, 256, 267 (1983)
- [113] G. Gamerith, *J. Chromatogr.*, 256, 326 (1983)
- [114] C. W. Gehrke és K. Leimer, *J. Chromatogr.*, 53, 201 (1970)
- [115] C. W. Gehrke és K. Leimer, *J. Chromatogr.*, 57, 219 (1971)
- [116] K. Leimer, R. H. Rice és C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, 141, 355 (1977)
- [117] J. Maybaum, M. G. Kott, N. J. Johnson, W. D. Ensminger és P. L. Stetson, *Anal. Biochem.*, 161, 164 (1987)
- [118] S. L. Mackenzie, D. Tenaschuk és G. Fortier, *J. Chromatogr.*, 387, 241 (1987)
- [119] W. F. Schwenck, P. J. Berg, B. Beaufriere, J. M. Miles és M. W. Haymond, *Anal. Biochem.*, 141, 101 (1984)
- [120] H. J. Chaves das Neves és A. M. P. Vasconcelos, *J. Chromatogr.*, 392, 249 (1987)
- [121] B. W. Patterson, F. Carraro and R. R. Wolfe, *Biol. Mass Spectrometry*, 22, 518 (1993)
- [122] K-L. Woo and D-K. Chang, *J. Chromatogr.*, 638, 97 (1993)
- [123] P. Simek, A. Heydová and A. Jegorov, *J. High Res. Chromatogr.*, 17, 145 (1994)
- [124] P. Husek, *J. Chromatogr.*, 552, 289 (1991)
- [125] P. Husek and C. C. Sweeley, *J. High Res. Chromatogr.*, 14, 751 (1991)
- [126] P. Husek, *FEBS. Letters.*, 280, 354 (1991)
- [127] Z-H. Huang, J. Wang, D. A. Gage, J. T. Watson, C. C. Sweeley and P. Husek, *J. Chromatogr.*, 635, 271 (1993)
- [128] J. Wang, Z-H. Huang, D. A. Gage and J. T. Watson, *J. Chromatogr. A.*, 663, 71 (1994)
- [129] I. E. Valkó, H. A. H. Billiet, H. A. L. Corstjens and J. Frank, *LC·GC Intl.*, 6, 420 (1993)
- [130] T. L. Bereuter, *LC·GC Intl.*, 7, 78 (1994)
- [131] R. Dadoo, C. Yan, R. N. Zare, D. S. Anex, D. J. Rakestraw and G. A. Hux, *LC·GC Intl.*, 10, 164 (1997)
- [132] M.J. Thornton, J.S. Fritz és C.W. Klampfl, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 20, 647 (1997)
- [133] S. A. C. Wren, *J. Chromatogr. A.*, 768, 153 (1997)
- [134] Y. Kurosu, K. Murayama, N. Shindo, Y. Shisa and N. Ishioka, *J. Chromatogr. A.*, 752, 279 (1996)
- [135] H. Wan, P. E. Andersson, A. Engström, and L. G. Blomberg, *J. Chromatogr. A.*, 704, 179 (1995)

- [136] H. Wan, A. Engström, and L. G. Blomberg, *J. Chromatogr. A.*, 731, 283 (1996)
- [137] W. Lindner, B. Böhs and V. Seidel, *J. Chromatogr. A.*, 697, 549 (1995)
- [138] A. Tivesten és S. Folestad, *Electrophoresis*, 18, 70 (1997)
- [139] Y.-M. Liu, M. Schneider C.M. Sticha, T. Toyooka és J.V.Sweedler, *J. Chromatogr. A.*, 800, 345 (1998)
- [140] A. Taga and S. Honda, *J. Chromatogr. A.*, 742, 243 (1996)
- [141] A. Tivesten, E. Örnkvist and S. Folestad, *J. High. Resol. Chromatogr.*, 19, 229 (1996)
- [142] H.J. Isaaq, P.L.C. Horng, G.M. Janini és G.M. Muschik, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20, 167 (1997)
- [143] J.-W. Kang, Y.-T. Jang, Y.-M. You és Q.-Y. Ou, *J. Chromatogr. A.*, 825, 81 (1998)
- [144] K. Takizawa és H. Nakamura, *Anal. Sci.*, 14, 925 (1998)
- [145] Z. Deyl, I. Mikšik, F. Tagliaro és E. Tesarova, *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Elsevier Science 1998, Amino Acids 436.
- [146] J. T. Smith, *Electrophoresis*, 20, 3078 (1999)
- [147] M.V. Pickering és P. Newton, *LC-GC*, 3 (11), 22 (1990)
- [148] E. Stahl, *Thin-Layer Chromatography, a Laboratory Handbook*, 2nd edition, Springer, Berlin 1969.
- [149] G. Matysik, *Chromatographia*, 43, 301 (1996)
- [150] B. Das and S. Sawant, *J. Planar Chromatogr.*, 6, 294 (1993)
- [151] M. Alaiz, J. L. Navarro, J. Giron and E. Vioque, *J. Planar Chromatogr.*, 5, 143 (1992)
- [152] R. Bhushan, V. K. Mahesh and A. Varma, *Biomed. Chromatogr.*, 8, 69 (1994)
- [153] E. Pyra and S. Wawrzycki, *Acta. Pol. Pharm.*, 53, 147 (1996)
- [154] Dévényi T., Bárti J., Kovács J. és Kiss P., *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 7, 237 (1972)
- [155] F.J. Dettlerbeck és H.A. Lillevik, *Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods Vol. II.; The Investigation of aminoacidurias by TLC*
- [156] R. Bhushan and V. Parshad, *J. Planar Chromatogr.*, 7, 480 (1994)
- [157] E. Norfolk, S. H. Khan, B. Fried and J. Sherma, *J. Liquid Chromatogr.*, 17, 1317 (1994)
- [158] I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A.*, 913, 283 (2001)
- [159] J.F. Stobaugh, A. J. Repta, L.A. Sternson és K.W. Garren, *Anal. Biochem.*, 135, 495 (1983)
- [160] J.F. Stobaugh, A. J. Repta és L.A. Sternson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4, 341 (1986)
- [161] P. Kucera és H. Umagat, *J. Chromatogr.*, 255, 563 (1983)
- [162] H. Godel, T. Graser, P. Földi, P. Pfaender és P. Fürst, *J. Chromatogr.*, 297, 49 (1984)

- [163] N. Nimura és T. Kinoshita, J. Chromatogr., 352, 169 (1986)
- [164] M. Fujiwara, Y. Ishida, N. Nimura, A. Toyama és T. Kinoshita, Anal. Biochem., 166, 72 (1987)
- [165] M. C. G. Alvarez-Coque, M. J. M. Hernández, R. M. V. Camañas és C. M. Fernández, Anal. Biochem., 180, 172 (1989)
- [166] I. Molnár-Perl, I. Bozor, J. Chromatogr. A, 798, 37-46 (1998)
- [167] R.H. Buck és K. Krummen, J. Chromatogr., 387, 255 (1987)
- [168] S. S. Simons, Jr. és D. F. Johnson, J. Am. Chem Soc., 98, 7098 (1976)
- [169] S. S. Simons, Jr. és D. F. Johnson, Anal. Biochem., 82, 250 (1977)
- [170] S. S. Simons, Jr. és D. F. Johnson, J. Org. Chem., 43, 2886 (1978)
- [171] S. S. Simons, Jr. és D. F. Johnson, Anal. Biochem., 90, 405 (1978).
- [172] J. D. H. Cooper, G. Ogden, J. McIntosh és D. C. Turnell, Anal. Biochem., 142, 98 (1984)
- [173] V. J. K. Svedas, I. J. Galaev, I. L. Borisov és I. V. Berezin, Anal. Biochem., 101, 188 (1980)
- [174] A. P. Halfpenny és Ph. R. Brown, HRC, 8, 243 (1985)
- [175] G. L. Lookhart és B. L. Jones, Cereal Chem., 62, 97 (1985)
- [176] B. J. Micallef, B. J. Shelp és R. O. Ball, J. Liq. Chromatogr., 12, 1281 (1989)
- [177] G. Michael és G. H. Berlin, Git Fachz. Lab., 9, 769 (1995)
- [178] J. R. Cronin, S. Pizzarello és W. E. Gandy, Anal. Biochem., 93, 174 (1979)
- [179] D. W. Hill, F. H. Walters T. D. Wilson és J. D. Stuart, Anal. Chem., 51, 1338 (1979)
- [180] P. Lindroth és K. Mopper, Anal. Chem., 51, 1667 (1979)
- [181] G. A. Qureshi, J. Chromatogr., 400, 91 (1987)
- [182] G. A. Qureshi, L. Fohlin és J. Bergström, J. Chromatogr., 297, 91 (1984)
- [183] K. Blau és J.M. Halket, Handbook of Derivatives for Chromatography, J. Wiley & Sons Ltd, (1993), Fluorescent Derivatives, 180-181.

8.3. Konferencia absztraktok

2000

1. EUFEPS 2000, 16th European Congress of Pharmaceutical Sciences, September 16-19, Budapest

P. Presits, D. Kutlán & I. Molnár-Perl*: HPLC of tryptophan and its metabolites as OPA derivatives

2. ISC'2000, London, UK, October 1-5

D. Kutlán & I. Molnár-Perl*: Advances in the Evaluation of the Stability of the Amino Acid Derivatives Obtained with the OPA/3-Mercaptopropionic Acid and OPA/N-Acetyl-L-Cysteine Reagents

2001

3. Pittcon'2001, New Orleans, LA, March 4-9, 2001

I. Molnár-Perl*, D. Kutlán & A. Vasanits: Advances in the evaluation of the stability of the amino acid and amine derivatives obtained with the OPA/3-mercaptopropionic acid and OPA/N-acetyl-L-cysteine reagents

4. HPLC'2001 Maastricht, The Netherlands June 17-22, 2001

Y. Mengerink, F. Tóth, D. Kutlán & I. Molnár-Perl*: Advances in the Evaluation of the Stability of the Amino Acid Derivatives Obtained with the OPA/3-Mercaptopropionic Acid and OPA/N-Acetyl-L-Cysteine Reagents: HPLC/MS Study

5. HPLC'2001 Maastricht, The Netherlands June 17-22, 2001

D. Kutlán, P. Presits & I. Molnár-Perl*: Behavior and Characteristics of Various Mono and Diamine Derivatives Obtained with the OPA/3-Mercaptopropionic Acid and with the OPA/N-Acetyl-L-Cysteine Reagents

6. HPLC'2001 Maastricht, The Netherlands June 17-22, 2001

P. Presits, D. Kutlán & I. Molnár-Perl*: HPLC of Tryptophan and its Metabolites in Their Underivatized Form and as Their OPA Derivatives, Simultaneously

7. Balaton'01 Symposium, September 2-4, 2001 Siófok, Hungary

Y. Mengerink, F. Tóth, D. Kutlán & I. Molnár-Perl*: Advances in the Evaluation of the Stability of the Amino Acid Derivatives Obtained with the OPA/3-Mercaptopropionic Acid and OPA/N-Acetyl-L-Cysteine Reagents: HPLC/MS Study

8. Balaton'01 Symposium, September 2-4, 2001 Siófok, Hungary

Cs. Ágoston*, D. Kutlán & I. Molnár-Perl: GC/MS Study on the Composition of the OPA/MCE and OPA/ET Derivatives of Amines

9. Balaton'01 Symposium, September 2-4, 2001 Siófok, Hungary

P. Presits, D. Kutlán & I. Molnár-Perl*: HPLC of Tryptophan and its Metabolites in Their Underivatized Form and as Their OPA Derivatives, Simultaneously

10. *HPLC'Kyoto, September 11-14, 2001, Kyoto, Japan*

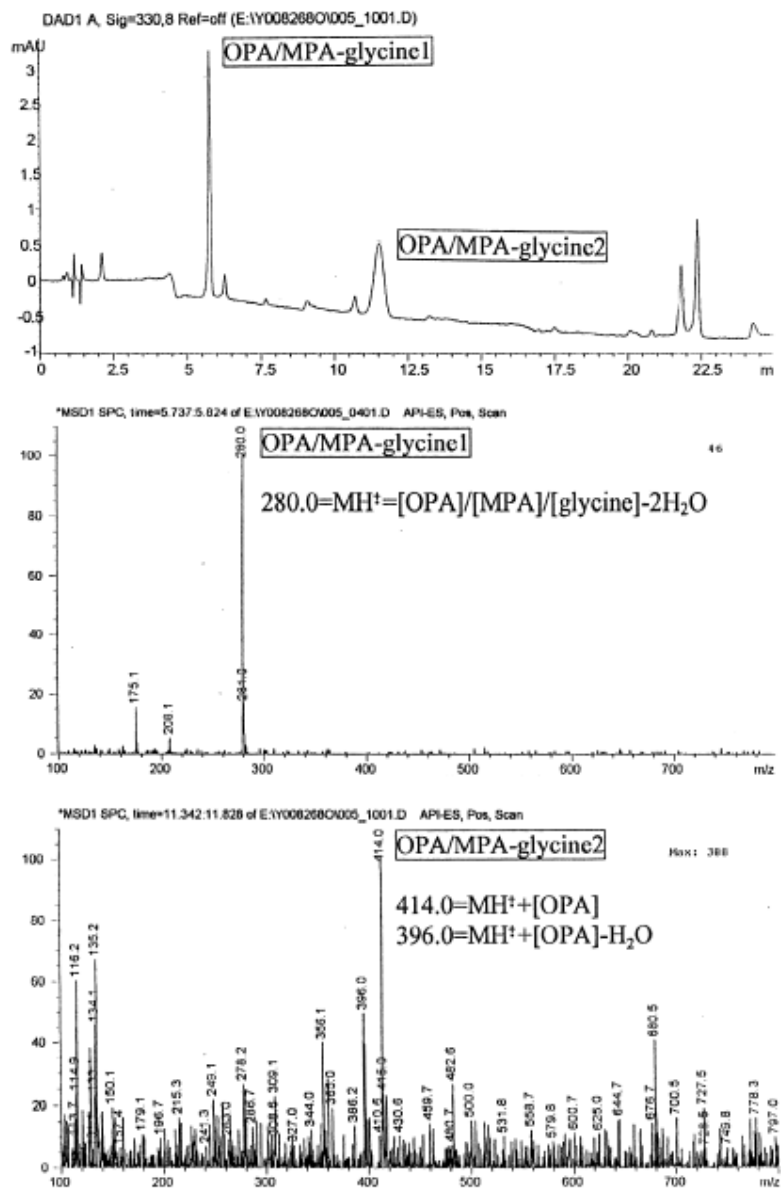
I. Molnár-Perl, D. Kutlán, Y. Mengerink & F. Tóth: Advances in the Evaluation of the Stability of Amino Acid and Amine Derivatives Obtained with the OPA/MPA and OPA/NAC Reagents: Reaction Mechanism Study by UV/PDA & HPLC/MS(APIESP)

2002

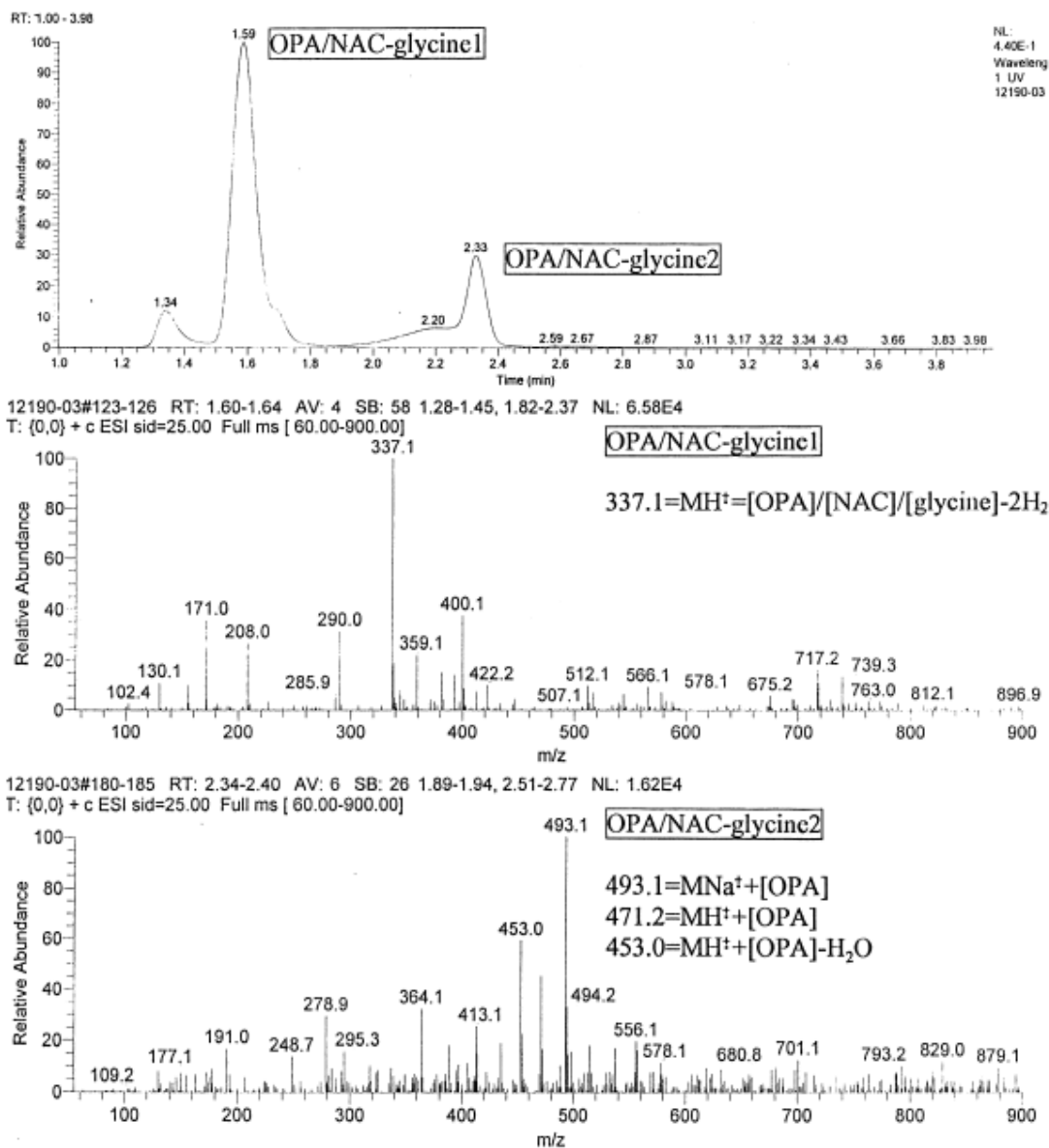
11. *HTC-7, February 5-7, 2002, Bruege, Belgium*

I. Molnár-Perl, D. Kutlán, Y. Mengerink & F. Tóth: Advances in the Evaluation of the Stability of Amino Acid and Amine Derivatives Obtained with the OPA/MPA and OPA/NAC Reagents: Reaction Mechanism Study by UV/PDA & HPLC/MS(APIESP)

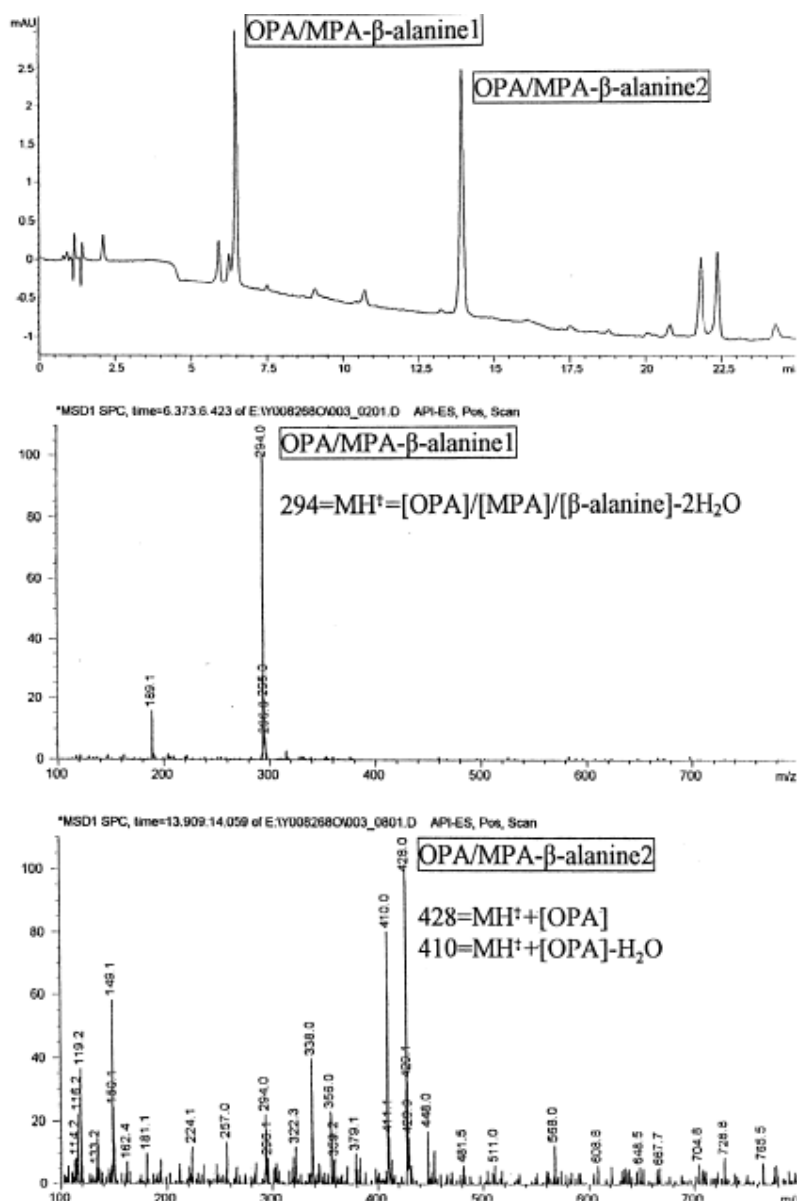
FÜGGELEK



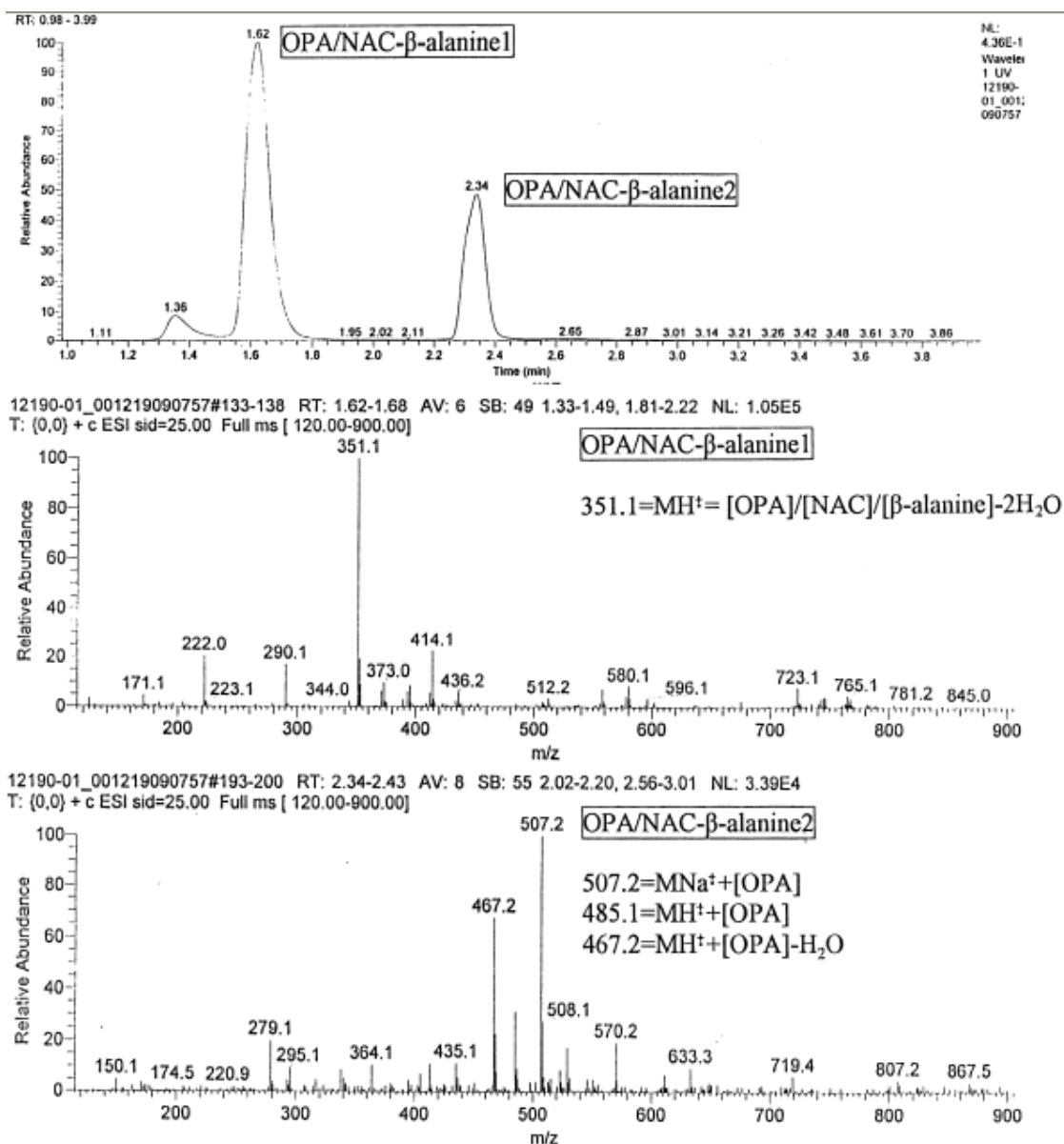
F1. ábra. A glicin OPA/MPA reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



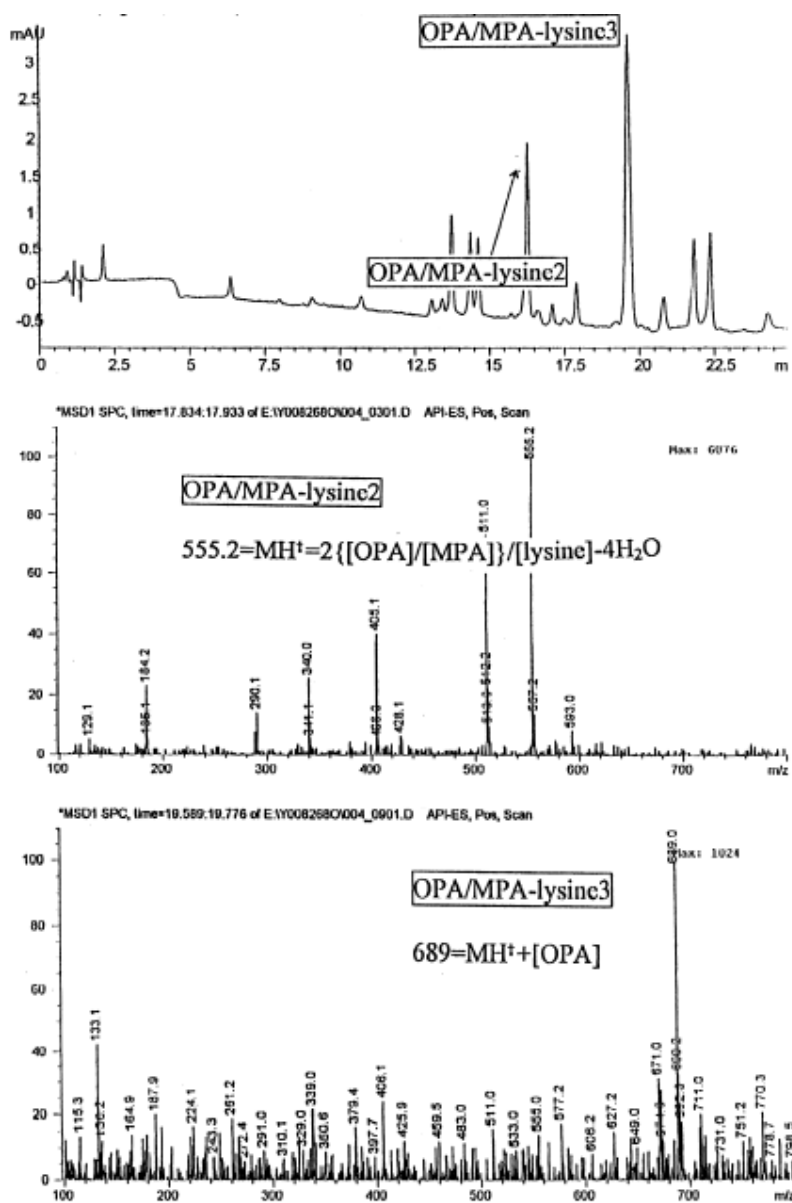
F2. ábra. A glicin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



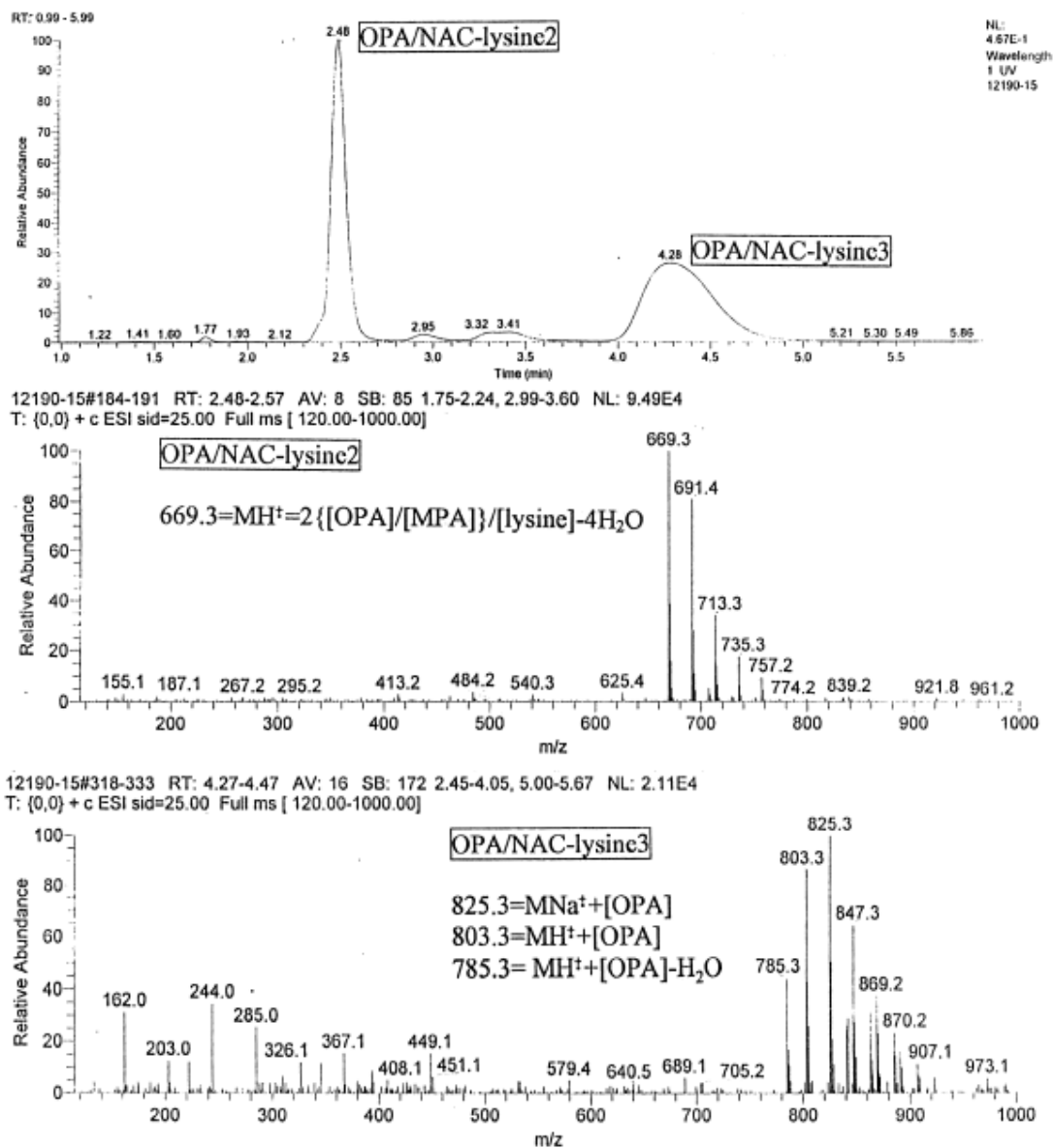
F3. ábra. A β -alanin OPA/MPA reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



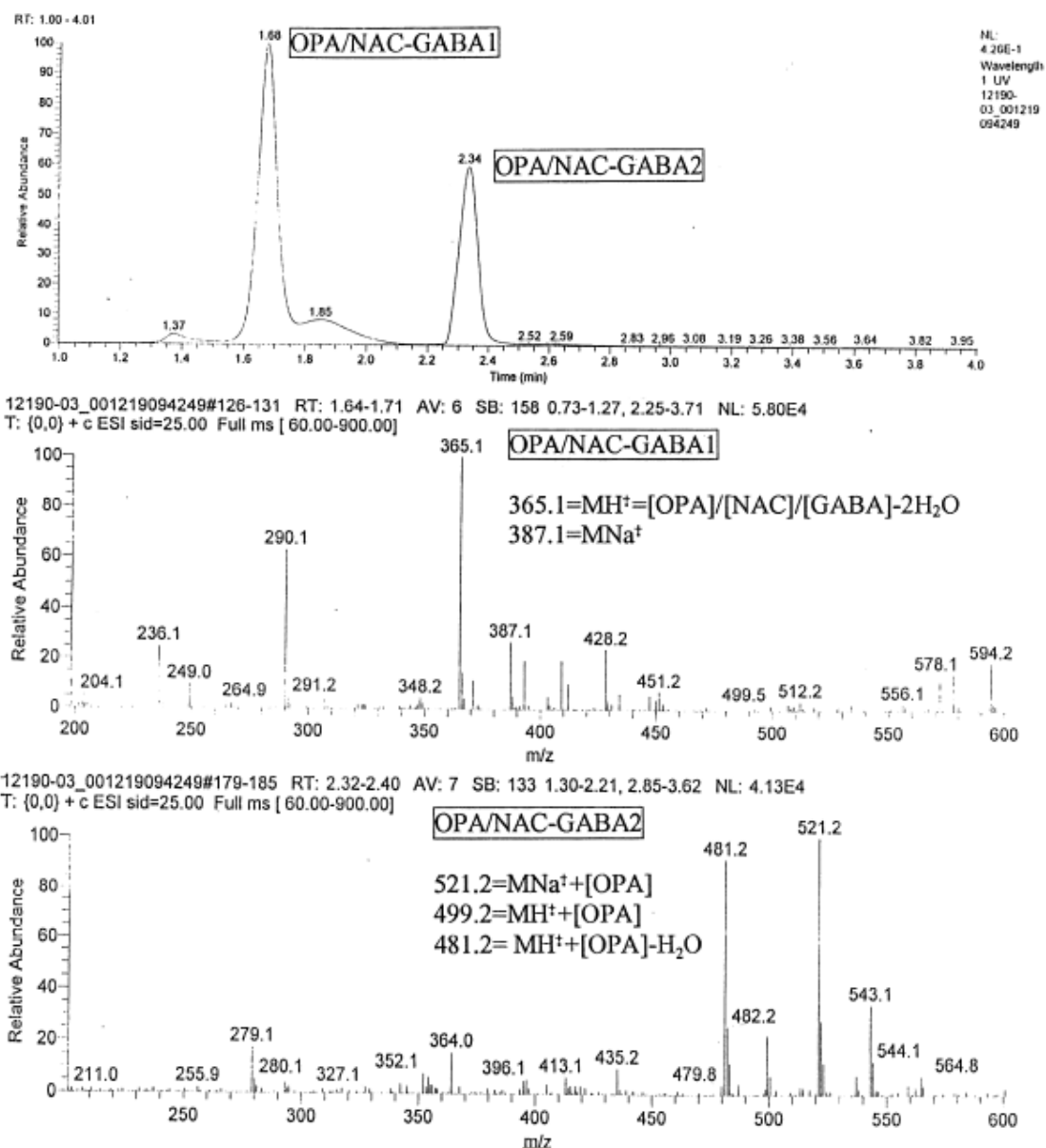
F4. ábra. A β-alanin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



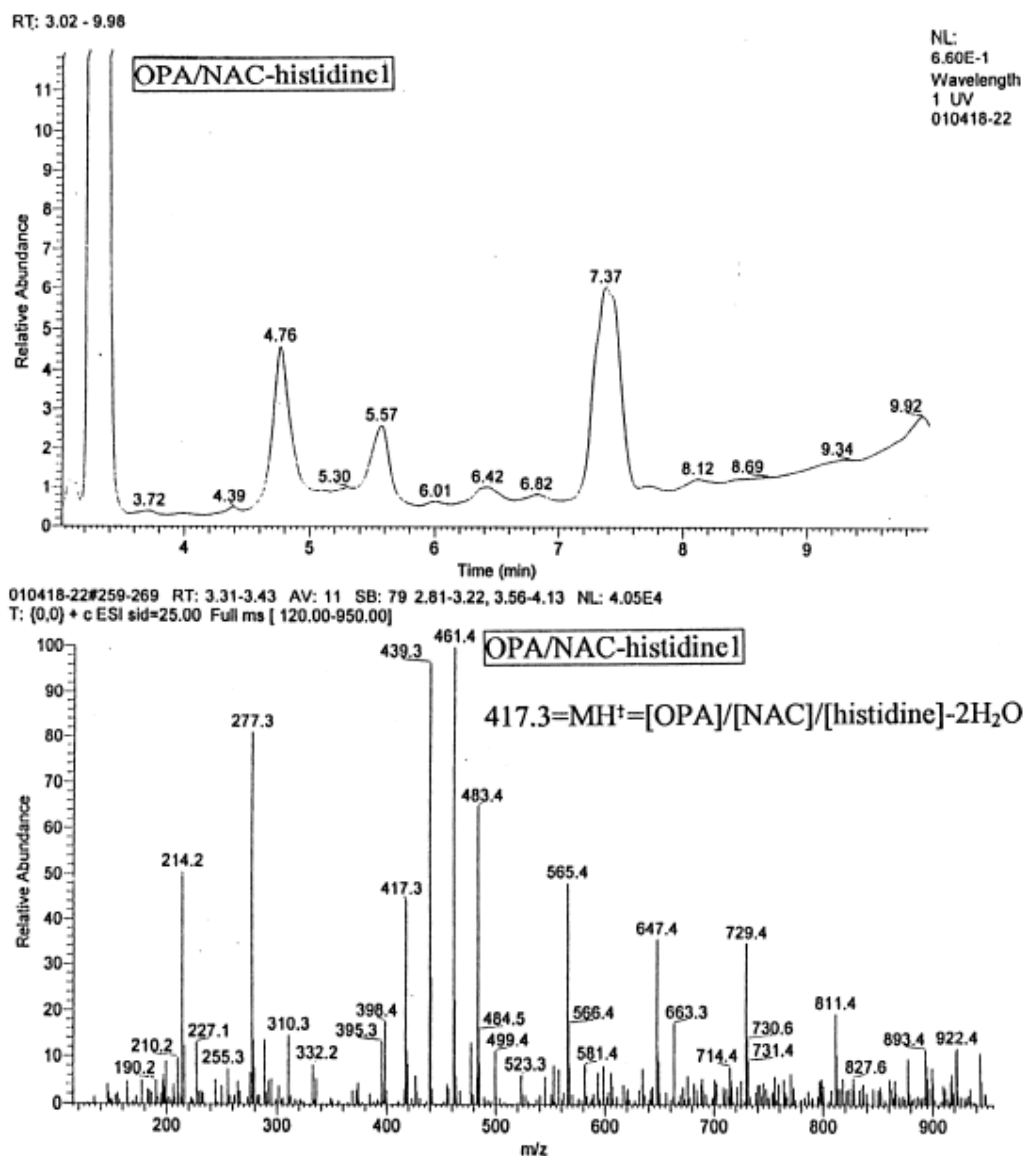
F5. ábra. A lizin OPA/MPA reagenssel történő származékolása során kapott másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



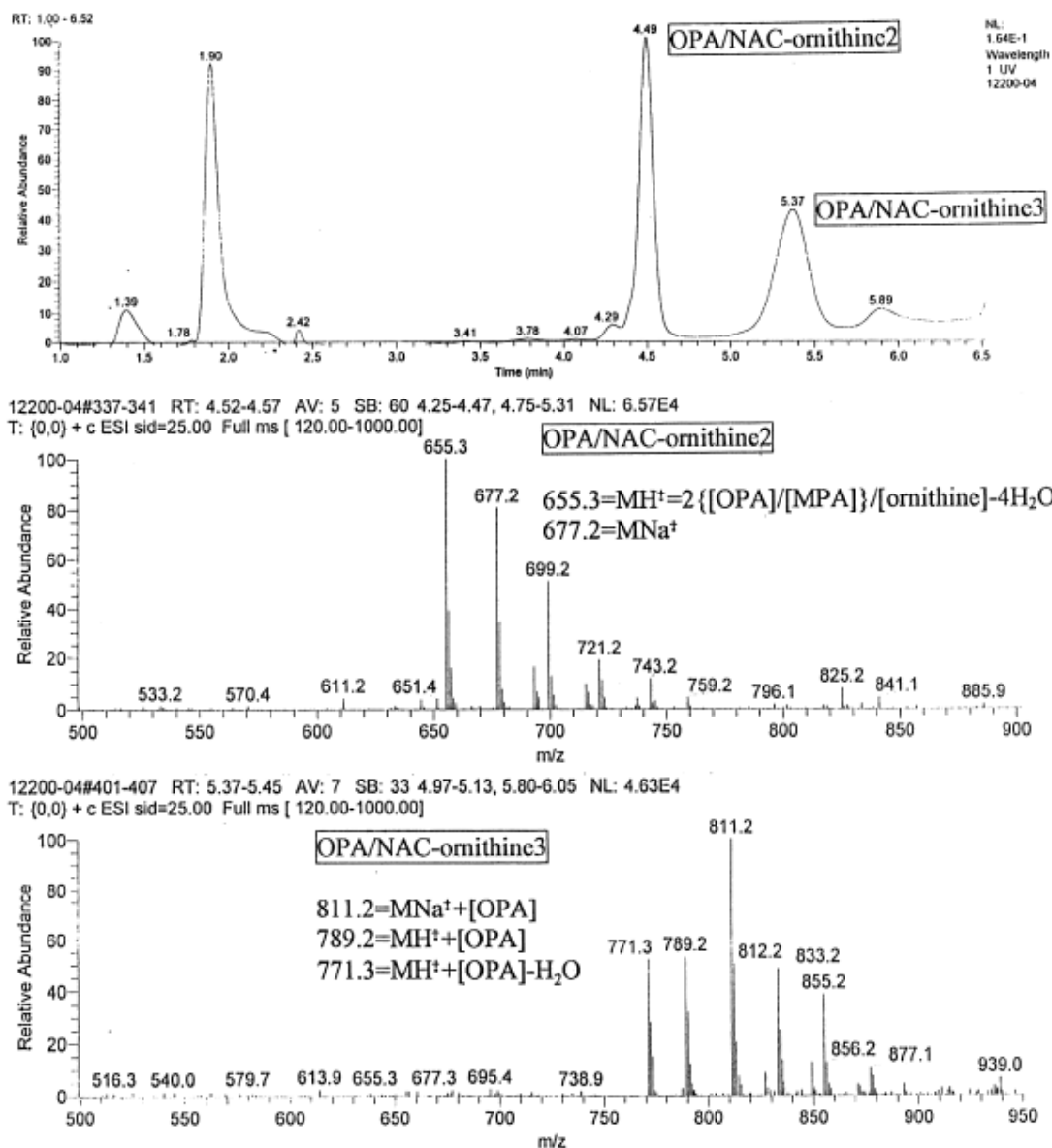
F6. ábra. A lizin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



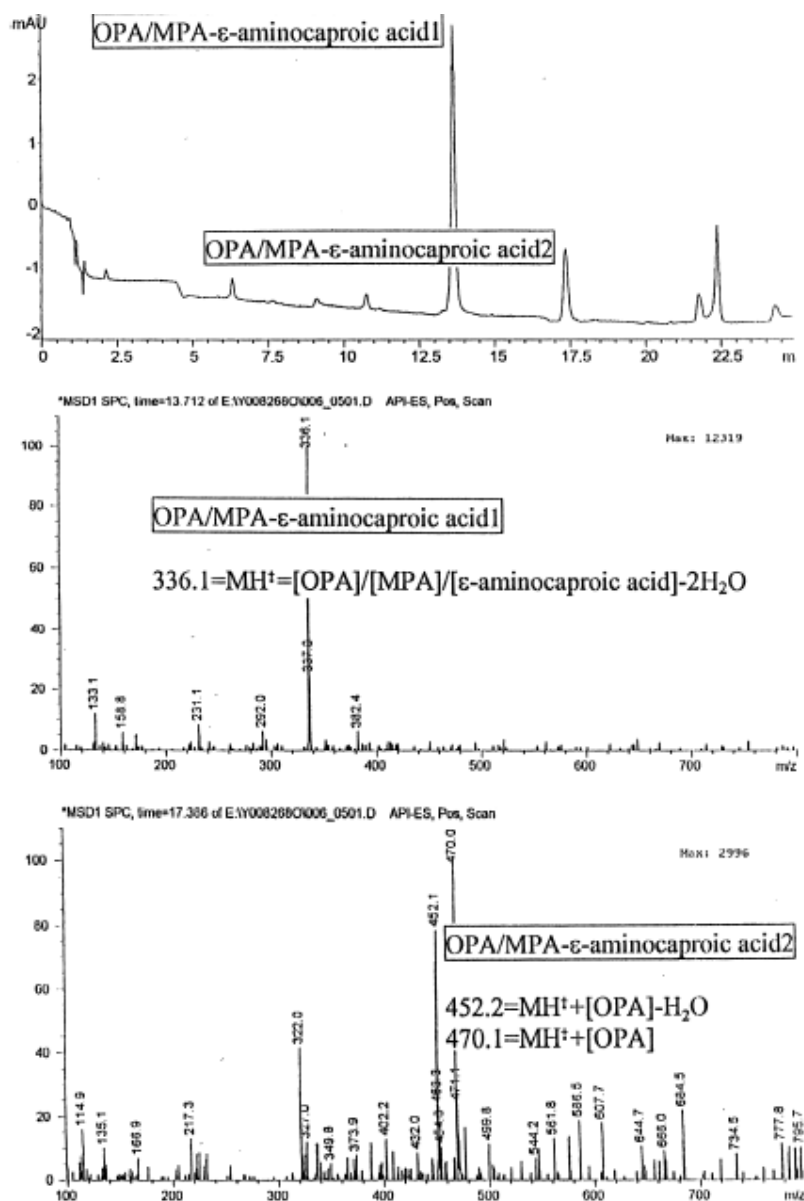
F7. ábra. A GABA OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



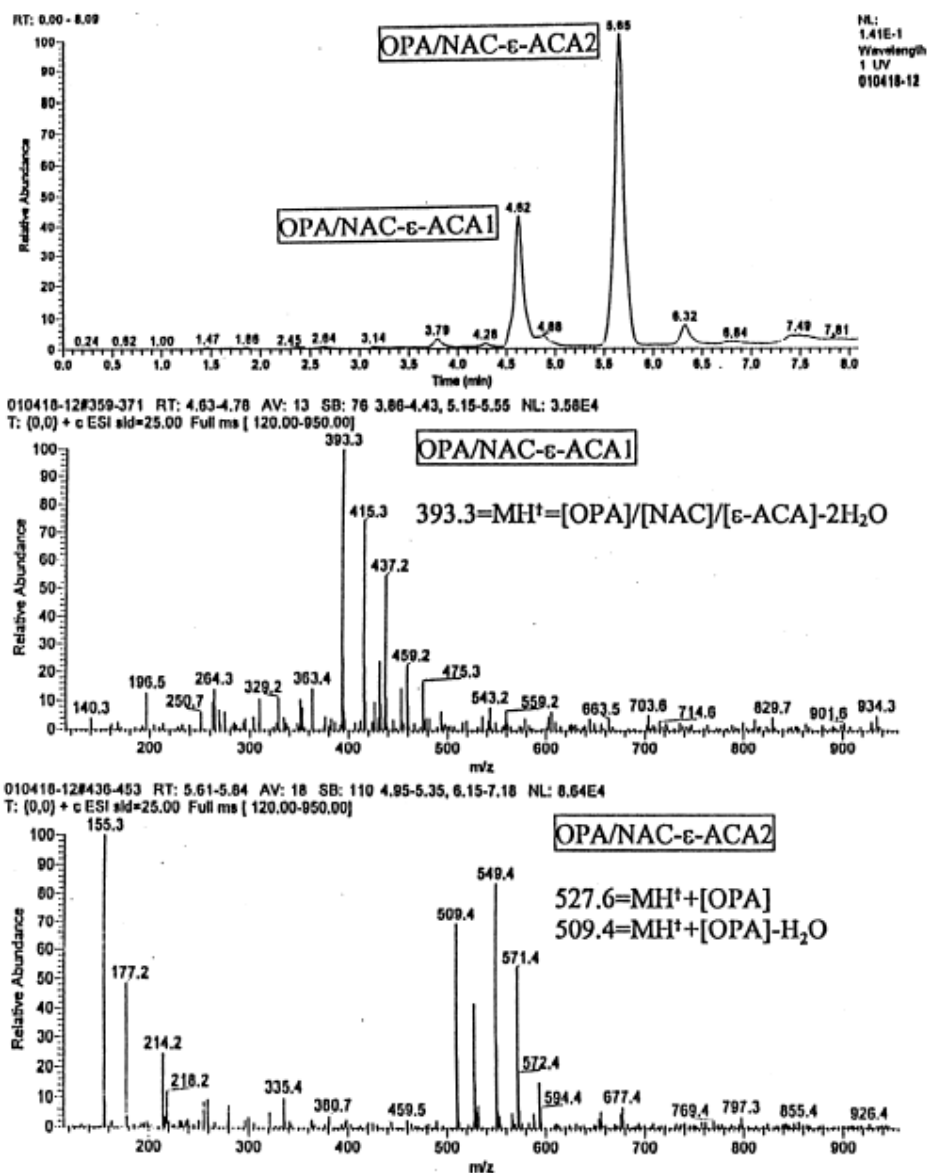
F8. ábra. A hisztidin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



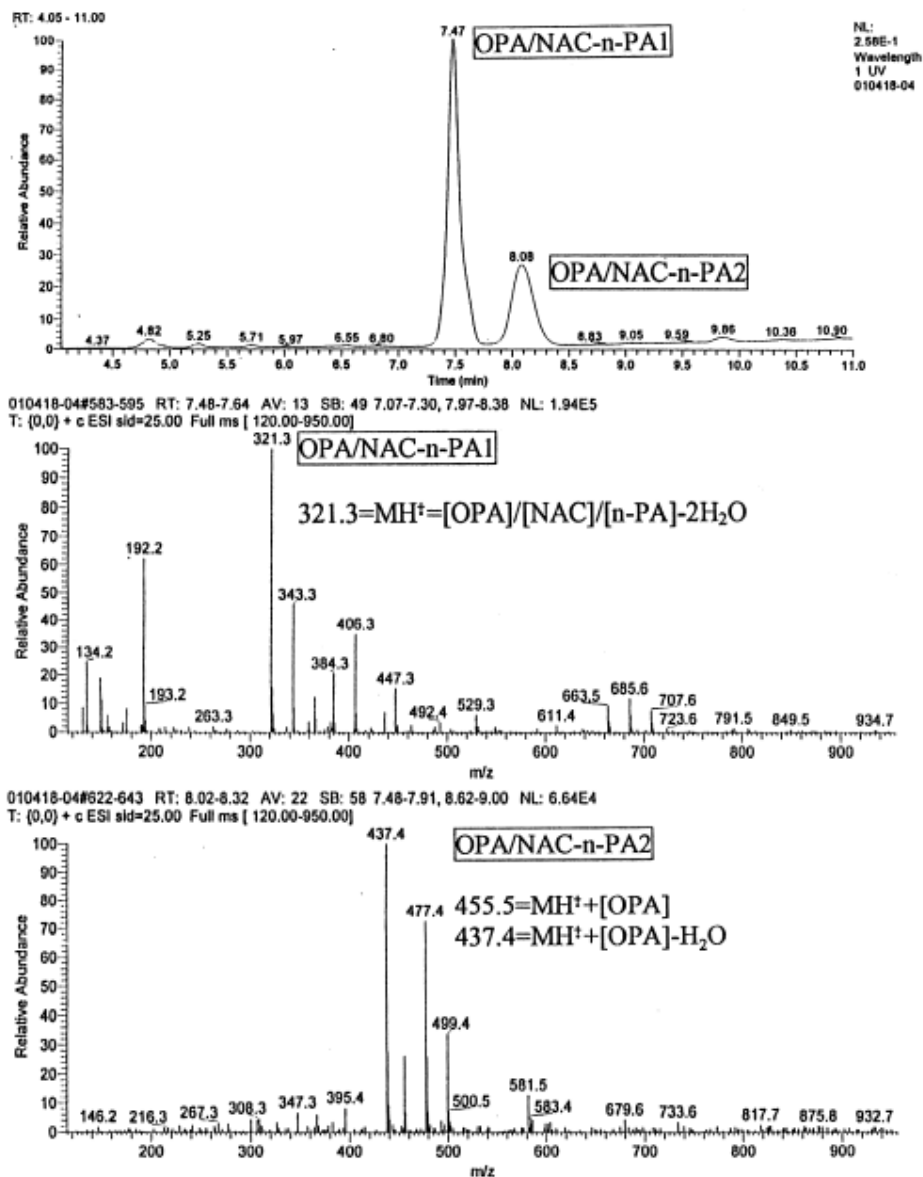
F9. ábra. A ornitin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



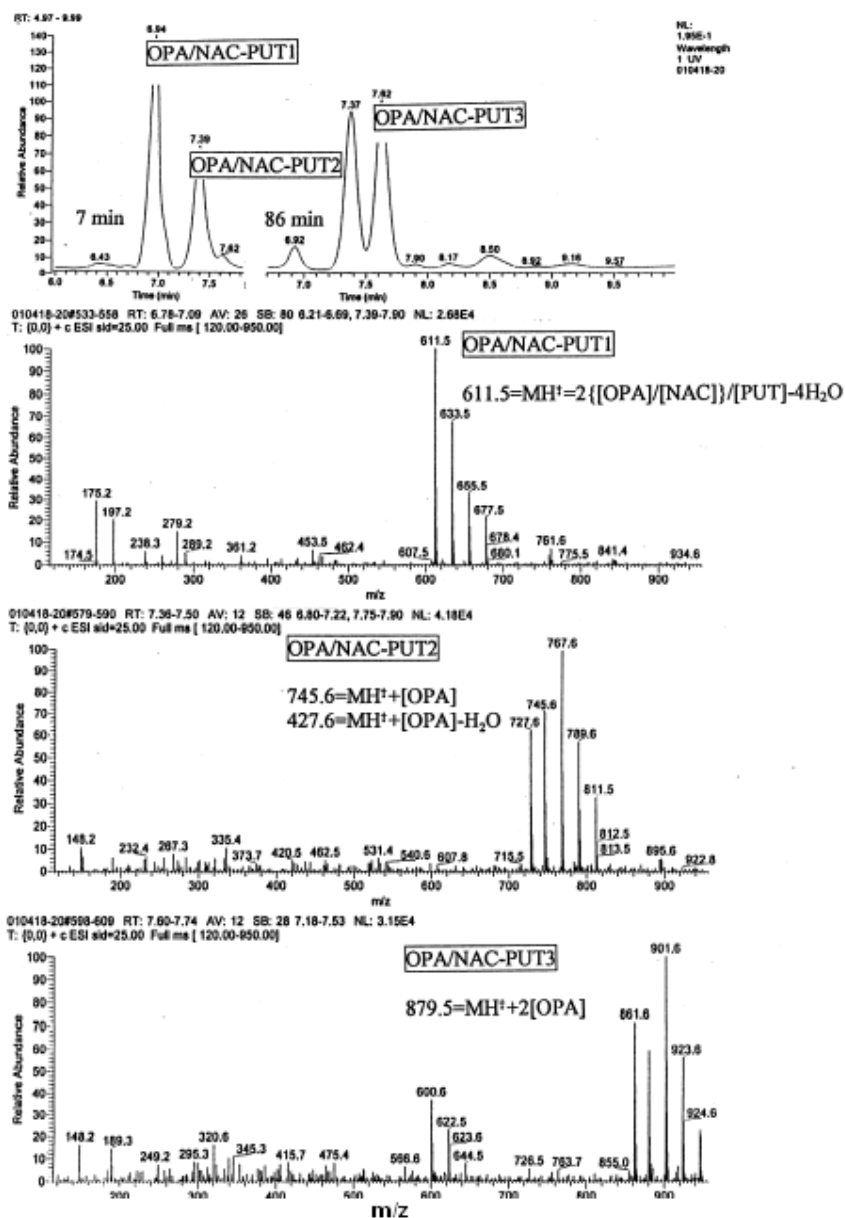
F10. ábra. Az ε-aminokapronsav OPA/MPA reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



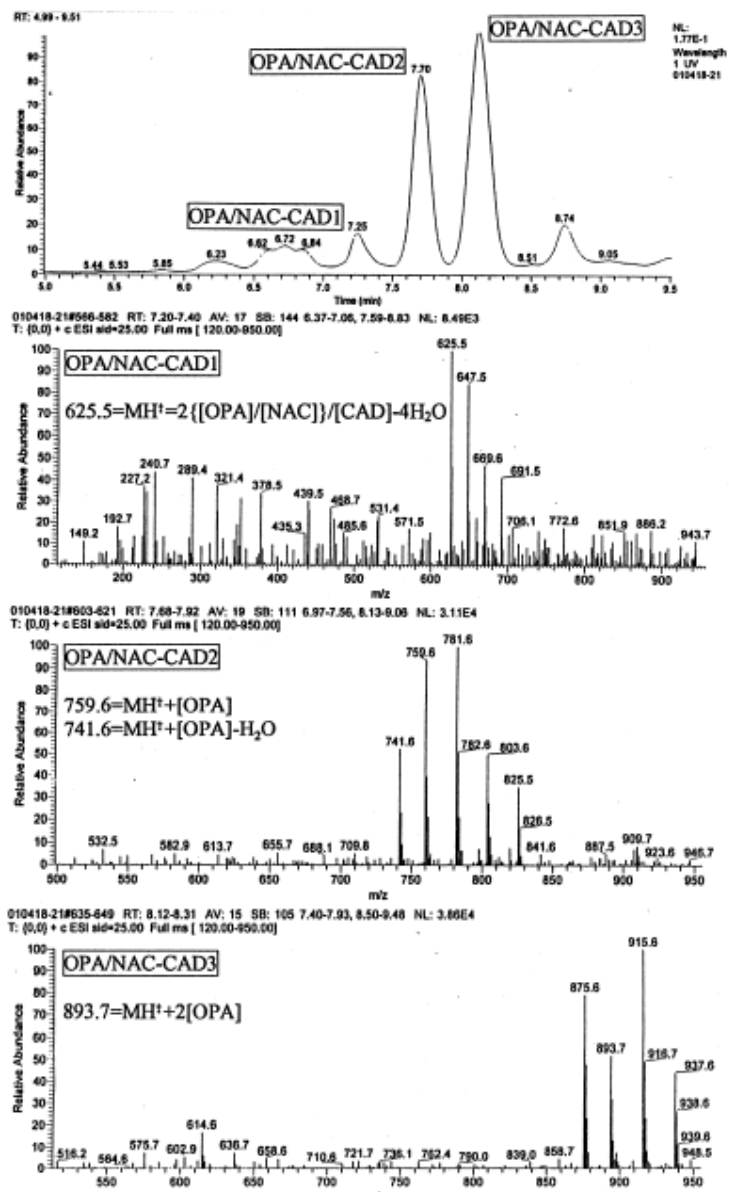
F11. ábra. Az ϵ -aminokapronsav OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



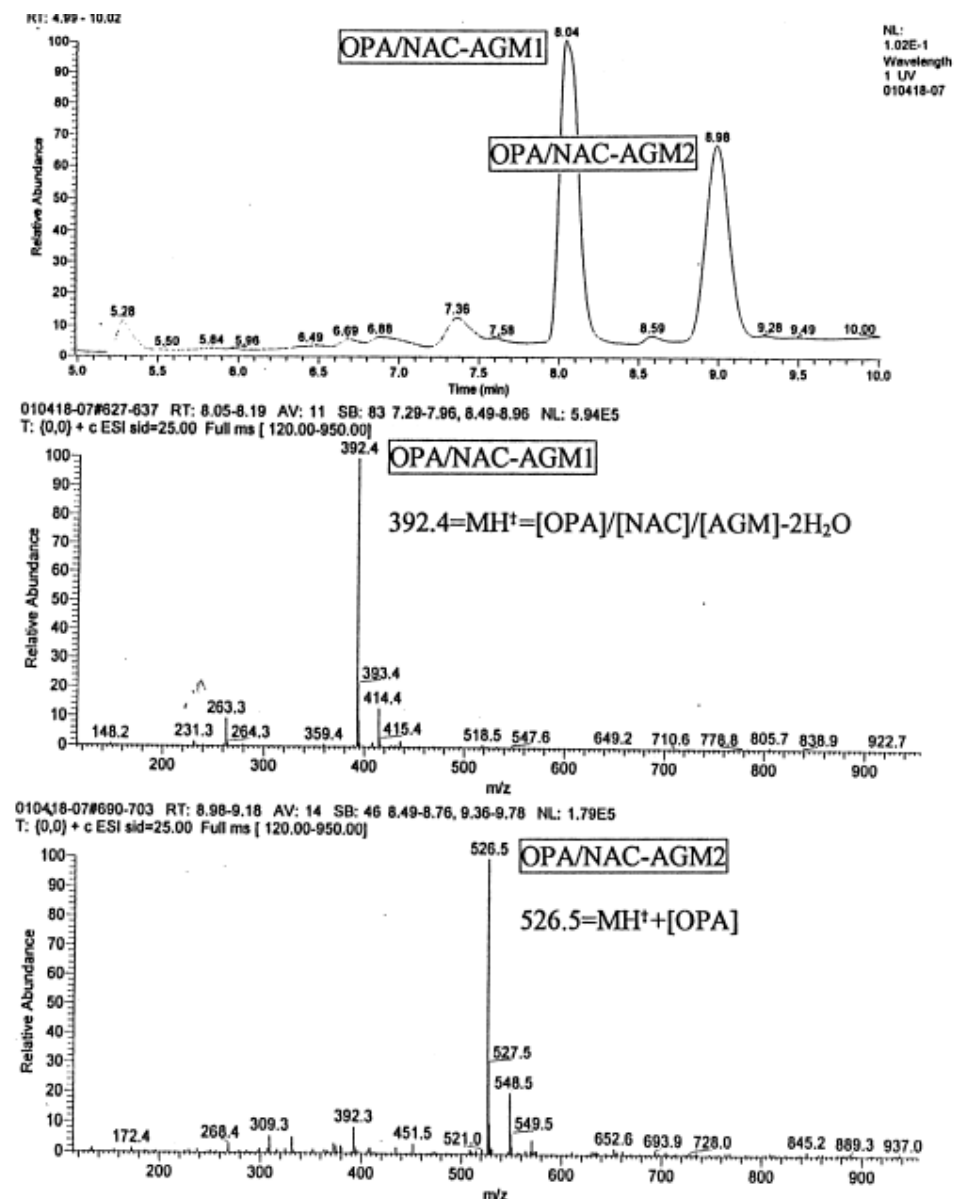
F12. ábra. A propil-amin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



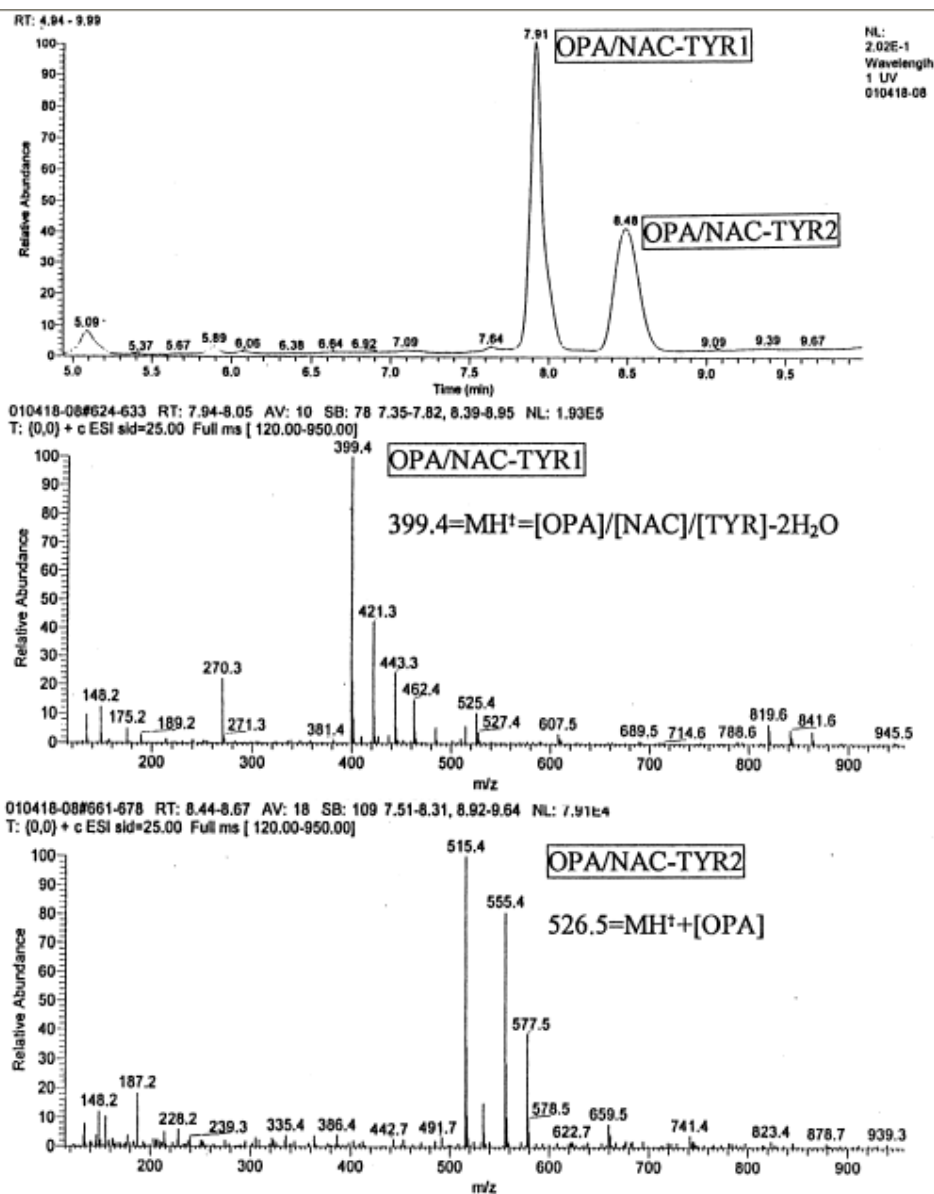
F13. ábra. A purescine OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



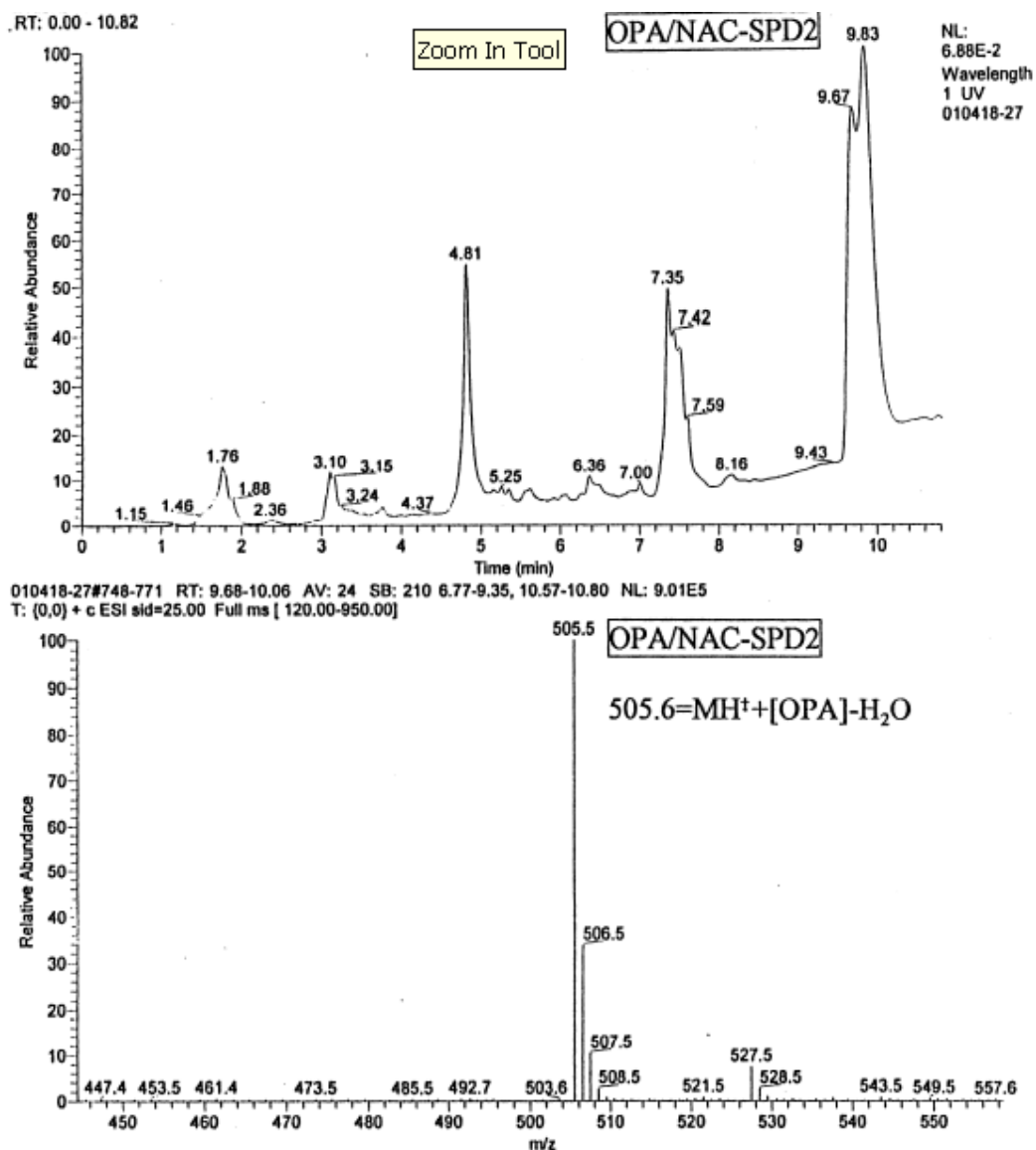
F14. ábra. A kadaverin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



F15. ábra. Az agmatin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



F16. ábra. A tiramin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott elsődleges és másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata



F17. ábra. A spermidin OPA/NAC reagenssel történő származékolása során kapott másodlagos csúcsok HPLC-MS vizsgálata

Kutlán Diana

Az aminosavak és aminok kölcsönhatása *o*-ftálaldehiddel.

A termékek stabilitása, a reakció mechanizmusa és analitikája.

(Doktori értekezés)

Az irodalomban az aminosavak és aminok származékká alakítására használt egyik legnépszerűbb származékképző reagens az OPA/tiol-kombináció: számos irodalmi utalás történt arra, hogy az ezekből képződött, olyan fontos aminosavak, mint a glicin, b-alanin, g-aminovajsav, hisztidin, ornitin és lizin, valamint az alifás n-aminok homológ sorának tagjai nem stabilak. Munkánk során sokoldalúan vizsgáltuk az OPA/MPA- és az OPA/NAC-származékképző reagenseknek a kromatográfiás elemzés szempontjai szerinti legfontosabb jellemzőit. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált aminosavakat az elsődlegesen képződött származékuk bomlékonyságának függvényében két fő csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba az egy csúcsban, míg a második csoportba a HPLC vizsgálat során több csúcsban eluálódó, bomlékony származékot adó aminosavak tartoznak. Az utóbbi csoportba hat jelentős/fontos aminosav tartozik. Elsőként készítettük el az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok stabilitásának és HPLC tulajdonságainak azonos feltételek közötti, részletes összehasonlítását. A második csoportba tartozó aminosavak esetében sikerült az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származékok átalakulásának időbeli átalakulását meghatározni. Bizonyítottuk, hogy a másodlagos termékek az elsődlegesen keletkező származék átalakulásából keletkeznek. Megállapítottuk, hogy

(i)-az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék átalakulási sebessége függ a reakcióközeg pH értékétől (savas tartományban nagyobb, lúgos tartományban kisebb az átalakulás sebessége), valamint

(ii)-az [OPA] : [tiol] reagensaránytól (az [OPA] : [tiol] = 1 : 3 arány esetében az átalakulás igen jelentős, az 1 : 10-es illetve 1 : 50-es reagensarány mellett az átalakulás számottevően kisebb. Ez az eredmény lehetőséget nyújtott arra, hogy az elsődleges OPA/tiol-származékot stabilizáljuk. HPLC-MS technikával sikerült meghatározni a másodlagos termékek molekulatömegét, aminek ismeretében javaslatot tettünk az átalakult másodlagos termékek szerkezetére és keletkezésének mechanizmusára. Az aminosavak OPA/tiol-származékképzési reakciójának tanulmányozása során elért eredmények ismeretében a még bomlékonyabb OPA/tiol-származékot adó mono-, di- és polyaminok OPA/tiol-származékainak tulajdonságait leírtuk és stabilizálni tudtuk. Az aminosavak és aminok külön-külön optimált származék-készítése és kromatográfiás elválasztása eredményeként az aminosavak és aminok egy oldatból, egyetlen felvételből meghatározásnak feltételeit teremtettem meg.

Kutatásaim gyakorlati hasznosításaként 20 aminosavat és 17 amint tartalmazó modell oldatot, valamint borok és sörök összetételét elemeztem.

Diana Kutlán

Behaviour characteristics, stabilities and reaction mechanism of *o*-phthaldehyde derivatives of amino acids and amines.

(PhD Thesis)

The one of the most frequently used derivatization reagent for amino acids and amines proved to be *o*-phthalaldehyde in the presence of various SH-group containing additives. Based on detailed literature overview it turned out that OPA derivatives of selected primary amino group containing compounds are particularly unstable. In order to find out the reason and background of these low stabilities of selected important amino acids - such as glycine, β -alanine, γ -amino butyric acid, histidine, ornithine, lysine - systematic stoichiometric studies were performed. To obtain comparable experimental data derivatizations have been performed under thoroughly unified reaction conditions. Investigations carried out as a function of the reaction time, varying the molar ratios of the OPA/S_H, the OPA/primary amines and also the S_H additives resulted in unambiguous phenomena. Data obtained proved that the primary amino group containing compounds could be classified into two main groups: the single, and the more than one derivative providing compounds. Based on the comparison in the derivatization of several primary amino group containing compounds it could be confirmed, that

(i) all those compounds that do have in their initial structure the -CH₂-NH₂ moiety are furnished more than one derivative, while,

(ii) the =CH-NH₂ moiety containing ones are providing a single and stable derivative.

This experience was completed by the definition of the composition of derivatives, applying on line HPLC-MS measurements. These studies revealed that in cases of the multiple derivatives providing primary amino group containing amino acids and amines

(i) their initially formed OPA derivatives are the classical isoindoles, while,

(ii) their transformed versions contain by one OPA molecule more. These experimental experiences led to the unified reaction mechanism proposal that do explain all those uncertainties that, until our principle, could not be explained. As an analytical consequences of the principle, applying extended molar ratios of OPA to the S_H additives (OPA/S_H-additive=1/50), resulted in increased stability also of the -CH₂-NH₂ moiety containing primary amines.

The utility of the method development was confirmed with the identification and quantification of beers and wines, natural matrices containing amino acids and amines, simultaneously.