

**AMINOSAVAK ÉS AMINOK SZÁRMAZÉKKÉSZÍTÉSE *O*-FTÁL-
ALDEHID-REAGENSEKKEL: ELTÉRŐ TIOLTARTALMÚ TERMÉ-
KEK ÖSSZEHASONLÍTÓ ÉRTÉKELÉSE HPLC ALKALMAZÁSÁVAL**

Doktori értekezés tézisei

Hanczkó Róbert



Témavezető:

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

Analitikai kémia program

Programvezető: Dr. Záray Gyula egyetemi tanár, DSc

Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémia Doktori Iskola

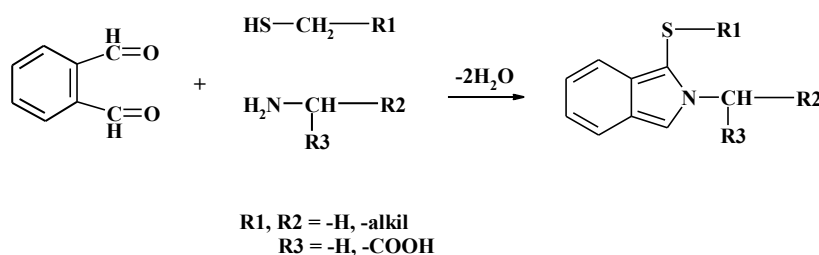
Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár, DSc

Budapest, 2006.

1. Bevezetés

A nitrogén fontos szerepet játszik az élő szervezetek felépítésében, az aminosavak, fehérjék, hormonok, koenzimek, s egyúttal a földi élet építőköve is. Az aminosavaknak és bizonyos aminoknak döntő jelentőségük van az élettani folyamatokban is. A biogén aminok nemcsak neurotranszmitterként, hanem hormonokként is életünk részei, amelyek befolyásolják és módosítják más hormonok kiválasztását. Rendellenes kiválasztásukról és/vagy metabolizmusukról feltételezik, hogy kapcsolatba hozhatók különböző betegségek kialakulásával. Széles körben vizsgálták a biogén aminok szerepét az esszenciális hipertónia kialakulásában is. A hisztamin a gyulladáso és allergiás folyamatokban játszik szerepet. Különbözö aminosavak dekarboxilezödésekor keletkezik a putreszcin, a kadaverin, az agmatin és a hisztamin.

Kutatócsoportunkban a szabad aminosavak és aminok nagyteljesítményű folyadékromatográfiás (HPLC) elemzésére alkalmas *o*-ftálaldehiddel (OPA) – különbözö SH-csoportú segédanyag jelenlétében – végzett származékképzés legkedvezöbb feltételeit részletesen és sokoldalúan vizsgáltuk.



1. ábra: Primer aminocsoportú vegyületek reakciója *o*-ftálaldehiddel

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

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

Az OPA-val történö származékképzés a bevezetése (1971) óta töretlen népszerűségnek örvend. Ezt igazolja az is, hogy az 1992–1998-ig terjedö időszakban az aminosavak HPLC-s meghatározásakor az esetek 31,2 %-ában OPA-t alkalmaztak. Ezt támasztja alá az az elmúlt öt évben megjelent 278 közlemény is melyben aminosavakat és aminokat határoztak meg HPLC-vel, OPA-val képzett származék formájában. Ide kívánkozik még az is, hogy közel 800 közlemény áttekintéséből, mind-

összesen ennyi volt azok száma, melyekben egyértelmű volt a reagens összetétele. Az esetek több mint 60 %-ában MCE-t alkalmaztak, mint SH-csoportú segédanyag.

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

Az alábbi kérdések merülnek még fel az irodalom áttekintésekor:

- Milyen összefüggés lehet az OPA-aminosavakról leírt, eltérő, egymásnak ellentmondó stabilitási értékek és az igen eltérő reagenskészítési szokások között?
- Az OPA/MPA(NAC, MCE, ET)-reagenseknek van-e fluoreszcenciás aktivitása, amit esetleg figyelembe kell venni az aminosavak/aminok mennyiségének HPLC-s meghatározásakor, egyidejű fluoreszcens és UV detektálás alkalmazásakor?
- Mennyi ideig szolgáltat az OPA-reagens ugyanakkora válaszjeleket, vagyis meddig tartható el?
- Van-e, s mi az oka annak, hogy a glicin, a β -alanin, a γ -aminovajsav, a hisztidin, az ornitin és a lizin származékait sokkal kevésbé stabilnak vélik a többi aminosavhoz képest?
- Mekkora az elsődlegesen keletkezett izoindolok fluoreszcenciás és UV válaszjelei, egymáshoz képest is, illetőleg függnek-e az OPA/aminosav molaránytól?
- Mi a szerkezete az elsődlegesen keletkezett izoindol továbbalakult termékeinek, s milyen mechanizmus szerint képződnek?

2. Célkitűzés

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

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

A szigorúan azonos körülmények alatt

- az *o*-ftálaldehid és az SH-csoportú anyag,
- az *o*-ftálaldehid és a primer aminocsoportú vegyület molarányának,
- a származékképzés oldata pH-értékének, hőfokának és időtartamának tudatos tervezését értjük.

- A HPLC-s elválasztáshoz használt eluensek összetétele és az oszlop fajtája is – a lehetőségek szerint – azonos volt.

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

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

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

3. Alkalmazott módszerek

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

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

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

3.2. On-line HPLC-MS-rendszer:

ThermoFinnigan TSQ Quantum AH készülék (ThermoFinnigan, LC-MS Division, San Jose, CA, USA): „Surveyor” fotodiódasoros UV-detektor, „TSQ Quantum AH” (ElektroSpray-Ionizációs, pozitív módban használt) MS-detektor, „Surveyor” automata mintaadagoló, „Surveyor” 4 eluens egyidejű kezelésére képes, termosztálható oszlopterű vezérlőegységből áll. A rendszer Xcalibur 1.4 SRI programmal működik. Az MS-detektor tömegtartománya: 50–1600 tömegegység; a gázhőmérséklet: 200 °C (200 µl/perc áramlási sebességnél); 380 °C (1 ml/perc áramlási sebességnél) volt. A detektálás a DAD esetében 334 nm-en történt. Ezeket a méréseket a Növény- és Talajvédelmi Központi Szolgálat Kémia Osztályán végeztük, dr. Tóth Ferenc segítségével.

3.3. Oszlopok:

Az OPA/MCE-termékeket mindvégig BST Hypersil ODS 150 mm×4 mm, 5 µm-es oszlopon (O-1) választottuk el. Az előtétoszlop 20 mm×4 mm, 5 µm-es BST Hypersil ODS (E-1) volt. Az OPA/ET-termékek elválasztását az O-1 és E-1 oszlopokkal indítottuk, majd Thermo Hypersil ODS 200 mm×4,6 mm, 5 µm-es oszlopon (O-2) folytattuk. Az előtétoszlop 30 mm×4 mm, 5 µm-es BST Hypersil ODS oszlop (E-2) volt. {Megjegyzés: az *n*-hexilamin, az *n*-heptilamin, az *n*-oktilamin és a β -feniletilamin OPA/MCE-származékainak elválasztása O-2 és E-1 oszlopokkal történt.}

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

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

3.4. Felhasznált eluensek

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

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

A jobb elválasztás érdekében még metanolt és/vagy acetonitrilt is használtunk.

3.5. Reagensoldatok

Az OPA/MCE-, illetőleg az OPA/ET-reagensoldatok, 10,00 cm³ térfogatú mérőlombikba analitikai pontossággal mért 2,5 ml OPA-törzsoldatból és

- OPA/MCE=1/3 molarány esetén 20 µl,
- OPA/MCE=1/50 molarány esetén 340 µl MCE, vagy
- OPA/ET=1/10 molarány esetén 38 µl ET hozzáadásával,

és 0,2 mol/dm³ koncentrációjú, pH=9,3 értékű borátpufferrel jelre töltve készültek. Azt megelőzően a pH-értékét szükség szerint 9,3-ra állítottuk. Ha ettől eltérő pH-értékű reagensre volt szükségünk, akkor ahhoz megfelelő pH-értékű borátpuffert is készítettünk. Az így elkészített reagensok metanol-tartalma 25 (V/V)% volt.

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

Az FMOC-Cl-oldat 5,00 cm³-ben, analitikai pontossággal mért és acetonitrilben oldott 0,17 g FMOC-ból készült.

A reagensoldatokat és az aminosav-/aminoldatokat olyan arányban elegyítettük, hogy a reagáló térfogatban az OPA/(aminosav és/vagy amin)=20/1 és az OPA/FMOC=1/0,4 legyen.

4. Összefoglalás; az értekezésben foglalt új kutatási eredmények

1. Aminosavak, alifás mono- és diaminok *o*-ftálaldehid (OPA)/2-merkaptoetanol (MCE) és OPA/etántiol (ET)-származékainak stabilitását és analitikai hasznosíthatóságát értékeltem. A termékek fluoreszcenciás intenzitásának és UV abszorbanciájának egyidejű nyomon követésével. Szigorúan azonos kísérleti {nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC)} körülmények között, –a reagens összetételének függvényében, –a reagens OPA/tiol molarányát, a kölcsönhatás hőfokát és idejét változtatva, mennyiségi adatokkal jellemzett, sztöchiometriai elemzések alapján vizsgáltam.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Doktori értekezésem összesített eredményeként értékelem, hogy sokoldalúan bizonyítottam

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

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

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

5.1. Közlemények:

–az eddig megjelent közlemények:

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

–a doktori értekezés beadásakor előkészületben lévő közlemény:

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

5.2. Poszterek és absztraktok

- R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: *Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthaldialdehyde Amino Acid and Amine Derivatives: o-Phthaldialdehyde/2-Mercaptoethanol Reagent* (**poszter**: 2002 – 24th International Symposium on Chromatography, Lipcse, Németország; Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Lillafüred)
- Hanczkó R., Perlné Dr. Molnár I.: *Aminosavak és aminok o-ftálaldehid származékainak stabilitása és jellemzése: eltérő SH-csoportú segédanyagok jelenlétében* (**poszter**: 2003 – Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII., Budapest)
- R. Hanczkó, D. Kutlán, Y. Mengerink, A. Csámpai, F. Tóth, T. Törő, I. Molnár-Perl: *The Role of the SH-Group Containing Additive in the Stability and Characteristics of the o-Phthalaldehyde Derivatives of Amino Acids and Amines* (**poszter**: 2003 – 27th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Nizza, Franciaország)

- R. Hanczkó, D. Kutlán, F. Tóth, I. Molnár-Perl: Behavior and characteristics of the o-phthalaldehyde derivatives of n-C6-C8 amines and Phenylethylamines with four additive SH-containing reagents (**poszter**: 2003 – 27th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Nizza, Franciaország)
- R. Hanczkó, A. Perl, I. Molnár-Perl: Optimum Conditions for the o-Phthalaldehyde Derivatization of the Primary Amino Group-containing Compounds in Biological Tissues (**poszter**: 2003 – 5th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok)
- R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: Comparison of the Stability and Characteristics of the o-Phthalaldehyde/Ethanethiol and o-Phthalaldehyde/2-mercaptoethanol Derivatives of Amino Acids and Amines (**absztrakt**: 2003 – 5th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok)
- R. Hanczkó, A. Perl, I. Molnár-Perl: Optimum Conditions for the o-Phthalaldehyde Derivatization of the Primary Amino Group-containing Compounds in Biological Tissues, (**poszter**: 2004 – 28th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Philadelphia, Pennsylvania, USA)
- R. Hanczkó, I. Molnár-Perl: Derivatization, Stability and Chromatographic Behavior of o-Phthalaldehyde Amino Acid and Amine Derivatives: o-Phthalaldehyde/Ethanethiol Reagent (**absztrakt**: 25th International Symposium on Chromatography, Párizs, Franciaország)
- R. Hanczkó, Á. Kőrös, I. Molnár-Perl: Characteristics and stability of amino acids and C1-C5 aliphatic amines as their o-phthalaldehyde/ethanethiol derivatives (**poszter**: 2005 – 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Stockholm, Svédország)

5.3. Szakmai előadások

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