

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.**

**Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia
programvezető:**

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

ELTE Analitikai és Szervetlen Kémiai Tanszék

2006

BEVEZETÉS

Az élő szervezet legfontosabb alkotóelemei a természetes aminosavak. Az aminosavak a fehérjék és peptidek építőkövei, s mint ilyenek alapvető biológiai és biokémiai folyamatokban vesznek részt. Fontos szerepük van a nitrogén-anyagcserében és a nitrogén raktározásában. Napjainkban 20, illetőleg 21 aminosavat tartanak számon, mint alapvető építőelemeket, jóllehet, ezeken kívül még számos élő szervezetekből izolált természetes aminosav létezik (mint például a β -aminosavak, ornitin, hidroxiprolin stb.). Az aminosavak, kvalitatív és kvantitatív elemzése rég felmerült igény, lehetőség adva a peptidek és fehérjék aminosav-összetételének megállapítására. Ezzel párhuzamosan az egyes biokémiai folyamatok vizsgálatát, különféle anyagcsere-folyamatok zavarának nyomonkövetését is szolgálják. Az aminosavak bomlási termékei, az abiogén illetőleg a biogén aminok, számos élelmiszeripari ellenőrzés fontos célpontjai. Az aminosav-amin átalakulási folyamatainak nyomon követése számos természetes mátrix (borok, szőlők és sörök, sajtok) esetében mindennapos analitikai feladat. Az aminosav/amin arány minőségi és mennyiségi meghatározása élelmiszerek minőségi jellemzésére és eredetére adnak felvilágosítást. Fontos megemlíteni, hogy a bűnügyi korbonctan esetében is ezek az adatok segítenek a halál beálltának becsléséhez. Érthető tehát, hogy az aminosavak és aminok gáz és ioncsere (IEC) kromatográfiás elemzését már igen korán megoldották.

A származékképzés optimális feltételeinek kutatása jelenleg is folyik az Analitikai Kémiai Tanszéken. A disszertációm során a folyadékkromatográfiás (HPLC) származékképzések egy népszerű módjának az OPA/MPA és a OPA/NAC reagens optimalizálásával foglalkoztam, majd az optimált módszer alkalmazhatóságát mutattam be.

CÉLKITŰZÉSEK

Az OPA/tiol származékképző szer nagy népszerűségnek örvend az aminosavak analitikájában, amit az 1992 és 1998 között megjelent 141, ezzel foglalkozó publikáció is igazol. Számos példa mutatja, hogy ez az igen közkedvelt és hatékony származékkészítő reagens bizonyos aminosavak esetében jelentősen bomlékony OPA/tiol-származékokat adott, és a termékek kis stabilitása a meghatározások reprodukálhatósága szempontjából hátrányos. Doktori munkám céljaként az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. Elsődleges feladatommak tartottam, hogy az irodalom alapján kitüntetett, kis stabilitásúnak minősített glicin, γ -amino vajsav, β -alanin, hisztidin, ornitin és lizin viselkedésének okát megtaláljam.
2. Vizsgálataim a kölcsönhatások sztöchiometriájának megismerésével indultak. Szigorúan azonos kísérleti körülmények között a termékek UV abszorbanciájának és fluoreszcenciás intenzitásának egyidejű nyomonkövetése útján.
3. Folytatásként, a reakciótermékek azonosítást HPLC-MS módszerrel készítettük.
4. A termékek összetételének ismeretében a kölcsönhatás mechanizmusára tettünk javaslatot.
5. A kölcsönhatások sztöchiometriai feltételeinek ismeretében, mind az aminosavak, mind az aminok mérési feltételeit optimaltam.
6. Az aminosavak és aminok külön-külön optimált származékkészítése és kromatográfiás elválasztása eredményeként az aminosavak és aminok egy oldatból, egyetlen felvételtől történő meghatározásnak feltételeit teremtettem meg.
7. Kutatásaim gyakorlati hasznosításaként 20 aminosavat és 17 aminosavat tartalmazó modell oldatot, valamint borok és sörök összetételét elemeztem.

A dolgozat két részben taglalja az elért eredményeket. Az első részben a OPA/tiol származék képzési módszer optimalizálásának folyamatát és a keletkező termékek szerkezetének felderítését és a termékek átalakulási mechanizmusát mutatom be külön az aminosavakra és az aminokra, majd az első részben ismertetett eredmények és következtetések alkalmazásával egy új HPLC-s módszert dolgoztunk ki 20 aminosav és 17 amin elválasztására.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FOGLALT ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Sokoldalúan bizonyítottuk 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 származékok bomlékonyságának függvényében két fő csoportba sorolhatjuk. Az első csoportba az egy, míg a második csoportba a HPLC vizsgálat során több csúcsban eluálódó aminosavak tartoznak. Az utóbbi csoportba hat aminosav tartozik: a glicin, β -alanin, lizin, orinitin, γ -amino-vajsav és a hisztidin. Elsőként készítettük el az OPA/MPA~NAC/aminosav-származékok stabilitásának és HPLC tulajdonságainak azonos feltételek közötti, részletes összehasonlítását.

2. A második csoportba tartozó aminosavak esetében sikerült az elsődlegesen keletkező OPA/tiol-aminosavszármazékok átalakulásának időbeli változását meghatározni. Az elsődleges származék jele csökken, míg a másodlagos termékeké nő. Megállapítottuk, hogy a második 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 származékok átalakulásából keletkeznek. Ez az eredmény lehetővé teszi a második csoportba tartozó, bomlékonynak tartott aminosavak esetében is a kvantitatív és megbízható meghatározást.

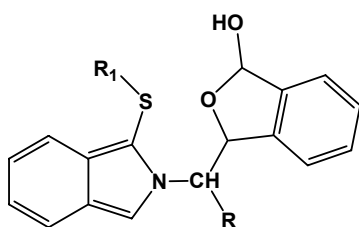
3. Megállapítottuk, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék átalakulási sebessége számottevően nem függ a reagens és az aminocsoport molarányától.

4. Bizonyítottuk, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék válaszjele/stabilitása nagymértékben függ a reakcióközeg pH-értékétől: a savas tartományban nagyobb, míg lúgos tartományban kisebb az átalakulás sebessége. Eredményeink alapján, a pH=9,3 a kölcsönhatások optimális pH értéke.

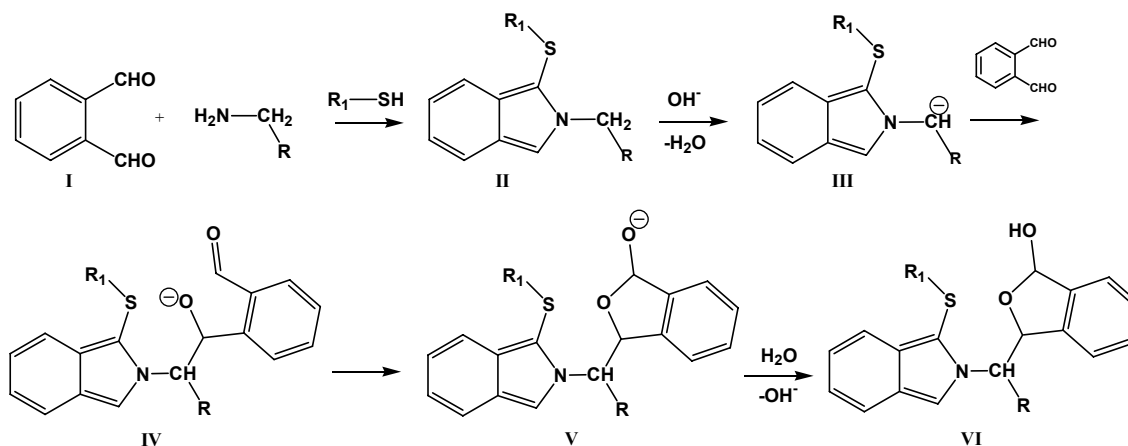
5. Megállapítottuk, hogy az elsődlegesen keletkező OPA/tiol/aminosav-származék stabilitása az [OPA] : [tiol] reagensaránytól függ. Míg az [OPA] : [tiol] = 1 : 3 arány esetében az átalakulás igen jelentős (7 perc alatt már jelentős mértékű), addig az 1 : 10-es illetve az 1 : 50-es reagensarány mellett az átalakulás 6 óra múlva számottevően kisebb.

Ez, az általunk elsőként leírt tapasztalat lehetőséget nyújtott arra, hogy az aminok esetében az elsődleges OPA/tiol/aminosav-származékot stabilizáljuk.

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



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



8. Megállapítottuk és bizonyítottuk, hogy számos amin esetében a már ismert szerkezetű és keletkezési mechanizmusú, másodlagos termék megjelenését a jelenlévő magas tiolkoncentráció jelentősen csökkenti, így vizsgálataink szerint, számos amin esetében, az $[\text{OPA}] : [\text{tiol}] = 1 : 50$ reagensarány és a $\text{pH} = 9,3$ -as reakcióközeg az optimális.

9. Az aminosavak OPA/tiol-származékképzési reakciójának tanulmányozása során elért eredmények ismeretében a még bomlékonyabb OPA/tiol-származékot adó mono-, di- és polyaminok OPA/tiol-származékait stabilizálni tudtuk.

10. Egy 51 perces kromatográfiás elválasztással megoldottuk 20 aminosav és 17 amin egyidejű minőségi-mennyiségi meghatározását egy kvaterner eluens rendszer segítségével.

11. Végül, az általunk kidolgozott OPA/MPA-származékészítést és kromatográfiás elválasztást borok és sörök aminosav- és amintartalmának mérésére hasznosítottuk.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI ALKALMAZÁSA

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.

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 derivative 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 phenylethylamines 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)