

Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma I. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása fordított fázisú folyadékkromatográfiával⁺

Csapó János és Stefan Einarsson***

*PANNON Agrártudományi Egyetem Állattenyésztési Kar, Kaposvár

**Marine Research Institute, Reykjavik, Izland

Érkezett: 1993. január 12.

Az optikai aktivitás szerepének fontosságát az élő szervezetben már régóta ismerjük. A biológiailag aktív molekulák nagy csoportja - mint amilyenek pl. az aminosavak - optikailag aktívak, ezért az élő szervezetben betöltött szerepük megismeréséhez feltétlenül szükséges tudnunk enantiomerjeik szétválasztását és mennyiségi meghatározását. Az utóbbi időben több területen intenzív kutatómunka folyt az aminosav enantiomerek elválasztása és meghatározása terén. Ezek közül említést érdemel a fehérjetartalmu régészeti leletek korának meghatározása az aminosavak racemizációja, illetve az izoleucin epimerizációja alapján (Wehmiller & Hare, 1971; Williams & Smith, 1977; Miller & Hare, 1980; Csapó et al., 1990), az élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalmának meghatározása (Masters & Friedman, 1980; Man & Bada, 1987; Csapó & Henics, 1991) és a földönkívüli anyagok összetételének tanulmányozása (Cronin & Pizzarello, 1983).

A peptidszintézis során igen lényeges annak ismerete, hogy a szintézishez felhasznált aminosavak optikailag tiszták-e, és hogy előfordul-e racemizáció a szintézis folyamán. Nagyon fontos annak ismerete is, hogy a fehérje hidrolízise során történik-e racemizáció, hisz - amennyiben igen - az a mérési eredményeket meghamisíthatja. Különböző tanulmányok beszámoltak arról, hogy a racemizáció foka a hidrolízis folyamán függ a peptid, ill. a fehérje típusától, az aminosav környezetében lévő többi aminosavtól, és megállapították, hogy a peptidkötésben lévő aminosavak általában gyorsabban racemizálódnak a szabad aminosavaknál (Frank et al., 1981).

Az aminosav enantiomerek mennyiségi meghatározásához nem elég csak az enantiomereket egymástól elválasztani, de ügyelni kell arra is, hogy az enantiomerek a többi aminosavtól vagy azok származékaitól is jól elkülönüljenek. Ezen túl, a megfelelő érzékenység elérésére kis

⁺ A munkát az Országos Tudományos Kutatási Alap támogatta, a szerzők ezúton is köszönik az Alap segítségét.

mennyiségben is jól detektálható aminosav származékot kell képezni. Az utóbbi időben erre a célra széles körűen alkalmazták a fluoreszcens reagensekkel történő oszlop előtti származékképzést és a származékok fordított fázisú kromatográfiáját (RPC). E módszereknél a kimutathatóság határa a meghatározni kívánt aminosavaknál igen kicsi, és az analitikai rendszer flexibilitása is rendkívüli előnyöket rejt magában (Lindroth & Mopper, 1979; Taphui et al., 1981; Einarsson et al., 1983). Így többek között automatikus módszereket fejlesztettek ki az optikailag inaktív o-ftálaldehid / merkapto-etanollal (OPA) az α -aminosavak (Smith & Panico, 1985), a 9-fluorenil-metil-kloro-formiáttal (FMOC) pedig az α -aminosavak és az iminosavak együttes meghatározására (Cunico et al., 1986; Betner & Földi, 1988). Az optikailag aktív (királis) aminosavak reakciója királis reagensekkel diasztereomer vegyületet eredményez, melyek elvben nem királis oszlopon is szétválaszthatók. Amennyiben a királis reagens egy másik aminosav, akkor a diasztereomer dipeptidek elválasztása és meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával is megoldható (Hirschmann et al., 1967; Manning & Moore, 1968; Csapó et al., 1990; Csapó et al., 1991).

A királis reagenssel történő származékképzés után lehetőség van a fehérjeépítő aminosavak enantiomerjeinek szétválasztására és meghatározására egyetlen analízis során RCP-vel. Mivel a kromatográfiás elválasztás általában 50-70 percet is igénybe vesz, nagyon fontos, hogy a kidolgozott analitikai módszer teljesen automatikus legyen. Előfeltétel még az egyszerű származékképzési reakció, mely szobahőmérsékleten rövid idő alatt végbemegy. Az optikailag aktív tiolok és az OPA valamint a meghatározni kívánt aminosavak közti reakciót felhasználták aminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására (Aswad, 1984; Buck & Krummen, 1987). Az így kidolgozott automatikus módszert és a vele elért eredményeket a közleménysorozat következő része ismertetni.

A királis 1-(9-fluorenil)-1-etil-kloro-formiát (FLEC) használata az enantiomerek szétválasztására azzal az előnnyel is jár, hogy az nemcsak az α -aminosavakkal, de az iminosavakkal is stabil származékot képez (Einarsson et al., 1987). E közleményünkben a FLEC segítségével képzett α -aminosav és iminosav enantiomerek szétválasztására és meghatározására kidolgozott eljárást ismertetjük. E módszert alkalmaztuk többek között élelmiszer- és takarmányfehérjék hidrolizátumában lévő D- és L-aminosavak szétválasztására és meghatározására, valamint a fosszilis csontleletek és a baktériumok által szintetizált fehérje analízisére.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Készülékek

Az alkalmazott Varian 5500 LC gradiens képzésre alkalmas rendszerrel, Varian 9090 mintaadagolóval és 10 µl-es hurokkal ellátott Valco injektorral rendelkezett. Shimadzu RF-535 fluoreszcenciás detektort használtunk a származékok mennyiségének mérésére; a gerjesztési és az emissziós hullámhossz 260 és 315 nm volt. Az elválasztás folyamatának és az automatikus mintaadagoló munkájának ellenőrzésére, a mintafelvételre és a kromatogramok tárolására a Varian DS 651 vezérlő rendszert használtuk.

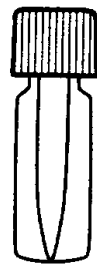
2.2. Vegyszerek

A FLEC reagenst az EKA-Nobel (Surte, Sweden), az aminosav standardot a Sigma (St. Louis, MO), a bórsavat és az OPA reagenst a Merck (Darmstadt, D), a jódecetsav-nátriumsóját és a jódezidot pedig a Fluca (Buchs, D) cégtől vásároltuk. Az acetonitrilt, a tetrahidrofuránt, az acetont, a pentánt és az etil-acetátot (mind HPLC minőség) a Rathburn cégtől (Walkerburn, UK) szereztük be.

2.3. Származékképzés

2.3.1. Az α -aminosavak és az iminosavak származékképzése (A. módszer)

A reakciót és az extrakciós lépéseket 190 µl-es mikrofiolában végeztük, melyet egy teflon membránnal ellátott csavaros tetejű üvegsébe helyeztünk (1. ábra). Az automatikus mintaadagolót úgy programoztuk, hogy keverjen össze 25 µl pufferben (0.2M borát puffer, pH=9.0) oldott mintát 25 µl FLEC reagenssel (5M acetonban) a mikrofiolában. Ezt követően a reakcióelegyet 80 µl levegő átbuborékolatásával jól összekevertük, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A reakció lejátszódása után 60 µl extraháló elegyet (pentán:etil-acetát, 85:15) adtunk hozzá, és levegő átbuborékolatásával hatszor összekevertük. Ezt követően 10 percig állni hagytuk, majd az alsó fázisból tápláltunk be az enantiomerek analízisére. Minden mintabetáplálást megelőzően és követően a rendszert aceton:víz 85:15 arányú elegyével hatszor átmostuk.



1. ábra: A reakcióhoz alkalmazott mikrofiola

2.3.2. Az iminosavak szelektív származékképzése (B módszer)

A 80 µl 9,5-es pH-ju 0,1 M borát-pufferben feloldott mintához az alábbi oldatokat adtuk hozzá: 8 µl OPA reagens (50 mg OPA és 25 µl merkapto-etanol / ml acetonitrilben), 8 µl jódecetát (1 M 0,1 M nátrium-hidroxidban) és 24 µl FLEC reagens (5 mM acetonban). Minden reagens hozzáadása után a reakcióelegyet 80 µl levegővel összekevertük, és az adagolótűt ötször átmostuk. A reakcióidő (beleértve az adagoló tű átmosási idejét is) az OPA és a jódecetsav esetében 4,5 perc, a FLEC reagens esetében pedig 7 perc volt. A reakcióelegyet ezt követően 50 µl dietil-éter ötszöri átbuborékolásával extraháltuk. 10 perc várakozás után az alsó fázist injektáltuk az oszlopra.

2.4. Fehérjehidrolízis

A Corning cégtől beszerzett, teflon zárókupakkal ellátott hidrolízis csöveket használtuk a fehérje folyadékfázisu hidrolízisére. A mintákat konstans forráspontú sósavval (6 M) hidrolizáltuk nitrogén atmoszférában (a csöveket négyszer öblítettük át nitrogénnel és vizsugárszivattyúval négyszer szívattuk le). A gázfázisú hidrolízis során a mintákat 0,7 ml-es csövekbe mértük, folyadék esetén vákuumban szárazra pároltuk, majd a Waters-től beszerzett, zárószeleppel ellátott hidrolízis edénybe helyeztük azokat. 70 µl konstans forráspontú (6 M) sósavat pipettáztunk a minták mellé, és a rendszer vizsugárszivattyúval történő evakuálása után (kb. 4-5 perc) a mintákat 24 órán át 110 °C-on hidrolizáltuk.

2.5. Az enantiomerek szétválasztása és meghatározása

A kromatográfiás rendszer egy tisztító oszlopból (C₁₈, 36x4,5 mm belső átmérő, 20 µm részecskeméretű Rsil) melyet a pumpa és a mintaadagoló közé helyeztünk, egy biztonsági oszlopból (RP-8, 15x3,2 mm belső átmérő, 7 µm részecskeméret, Brownlee) melyet a mintaadagoló és az analitikai oszlop közé kötöttük be, és az analitikai oszlopból (300x4,6 mm belső átmérő, 5 µm részecskeméret, Kromasil oktil töltet) állt. A bakteriális tevékenység meggátlására az eluensekhez 100 mg/liter mennyiségben nátrium-azidot adtunk. Az α-aminosavak szétválasztására egy három komponensből álló gradiens rendszert alkalmaztunk, melynek összetétele az alábbi volt: A: tetrahydro-furán; B: acetát-puffer (1 ml ecetsav / 1 l víz, pH beállítás 7,0-re nátrium-hidroxiddal); C: acetát-puffer (1,8 ml ecetsav / 1 l víz, pH beállítás 4,24-ra nátrium-hidroxiddal). Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt; a gradiens változását az 1. táblázat mutatja az idő függvényében.

1. táblázat: A gradiens változása az idő függvényében

Idő (perc)	A (%)	B (%)	C (%)
0	15	85	0
16,99	16	84	0
17	28	0	72
28	28	0	72
37	29	0	71
50,99	38	0	62
51	38	31	31
61	40	30	30
75	44	28	28
82	44	28	28
89,99	46	27	27
90	55	45	0
94,99	55	45	0
95	15	85	0

A: tetrahidro-furán; **B:** acetát-puffer, pH=7,0; **C:** acetát-puffer, pH=4,24

Az iminosavak szétválasztására és meghatározására ugyanazt az analitikai oszlopot alkalmaztuk mint az α -aminosavak esetében. Az acetonitril és a 0,1 M foszforsav elegyet használtuk mind a FMOG származékok (acetonitril:foszforsav, 39:61), mind a FLEC származékok (44:56) elválasztásánál. Az áramlási sebesség 1,5 ml/perc volt.

3. Eredmények és következtetések

Az aminosavak és a FLEC reakciójának sebessége egy adott hőmérsékleten a reagens koncentrációjától és a reakcióelegy pH-jától függ. A fenolos oldalláncú tirozinból a reakció körülményektől függően mono- vagy bisz-származék is keletkezhet. A módszer a tirozin bisz-származékának meghatározásán alapszik, a mono-származék pedig lehetővé teszi a reakció kontrollálását, mint ahogy arra azt már korábban a FMOG esetében alkalmazták (Mayer & Sheehan, 1988). Ha a reakció során nem áll megfelelő koncentrációjú reagens rendelkezésre, vagy a reakcióelegy pH-ja a még megfelelő szint alá csökken, akkor mindkét esetben nőni fog a tirozin mono-származékának a koncentrációja. A kísérleti részben leírt reakció feltételek esetén a tirozin 90%-a bisz-származéka alakjában fordul elő. A reakció lejátszódása után egy extrakciós lépést iktattunk közbe egyrészt a reagens feleslegének, másrészt a hidrolízissel keletkezett származékának eltávolítására.

Két különböző automatikus eljárást dolgoztunk ki az aminosav származékok előállítására. Az **A** módszert mind az α -aminosavak mind az iminosavak származékainak képzésére használtuk, a **B** módszert pedig csak az iminosavak szelektív derivatizálására alkalmaztuk. A szelektivitás az α -aminosavak és az OPA közötti reakción alapszik, melyet követ az iminosavak származékképzése FLEC-tal. Az OPA származékok különböző fluoreszcenciás tulajdonságának köszönhetően az iminosavakat az α -aminosavak zavaró hatása nélkül meg lehet határozni (Einarsson, 1985).

32 aminosav enantiomer linearitását vizsgálva az 1-100 $\mu\text{M/l}$ koncentráció tartományban megállapítottuk, hogy a linearitás - a D- és L-tirozin kivételével mely csak az 50 $\mu\text{M/l}$ koncentrációig mutatott linearitást - mindegyik aminosavra jónak mondható (az átlagos korrelációs koefficiens 0,9995 volt, mely érték 0,9988 és 0,9998 között változott). Meg kell azonban jegyezni, hogy az aminosavak és a reagens koncentrációja 1:1,3 arányú volt még a legnagyobb koncentrációk (100 $\mu\text{M/l}$) esetében is.

Az alkalmazott elúciós körülmények között mindegyik aminosav nagyon hasonló fluoreszcenciás jelet adott. A legkisebb fluoreszcenciát (a mono-származékok átlagának 78%-a) a treonin esetében, a legnagyobbat pedig a lizin (190%), az ornitin (170%) és a tirozin (150%) bisz-származékának esetében kaptuk.

Az iminosav enantiomerek szelektív meghatározásának módszere három gyors reakciólépést foglal magában. Az α -aminosavak szelektív blokkolása az OPA/merkaptó-etanol reakcióval történik, mely előkészíti a terepet az iminosavak FLEC-tal történő reakciójához. A jódoacetát szerepe csak az, hogy eltávolítsa a merkaptó-etanol fölösleget, megvédve a FLEC reagenst a tioloktól. Kevesebb mint egy perc szükséges az első két reakcióra, és kevesebb mint 5 perc, hogy a FLEC-tal a reakció tökéletesen végbemenjen. Az egész procedúra lejátszódásához szükséges időt nagyban befolyásolják a mosási ciklusok, melyek a különböző pipettázási lépések között szükségesek. A kalibrációs görbék a 0,1-100 $\mu\text{M/l}$ koncentráció tartományban kiváló linearitást mutattak (az átlagos korrelációs koefficiens 0,9991, $n=14$).

A retenciós idők átlagos szórása 35 aminosav enantiomerjét 7 napon keresztül elemezve 40 különböző minta átlagában 0,2 perc volt, a szélső értékek pedig 0,125 és 0,32 perc voltak. A kisebb különbséget a később eluáló származékok esetében kaptuk. Az egymáshoz közel eső aminosavak retenciós idejében tapasztalt szisztematikus változás lehetővé teszi a retenciós idők használatát a csúcsazonosítás megbízhatóságának növelésére.

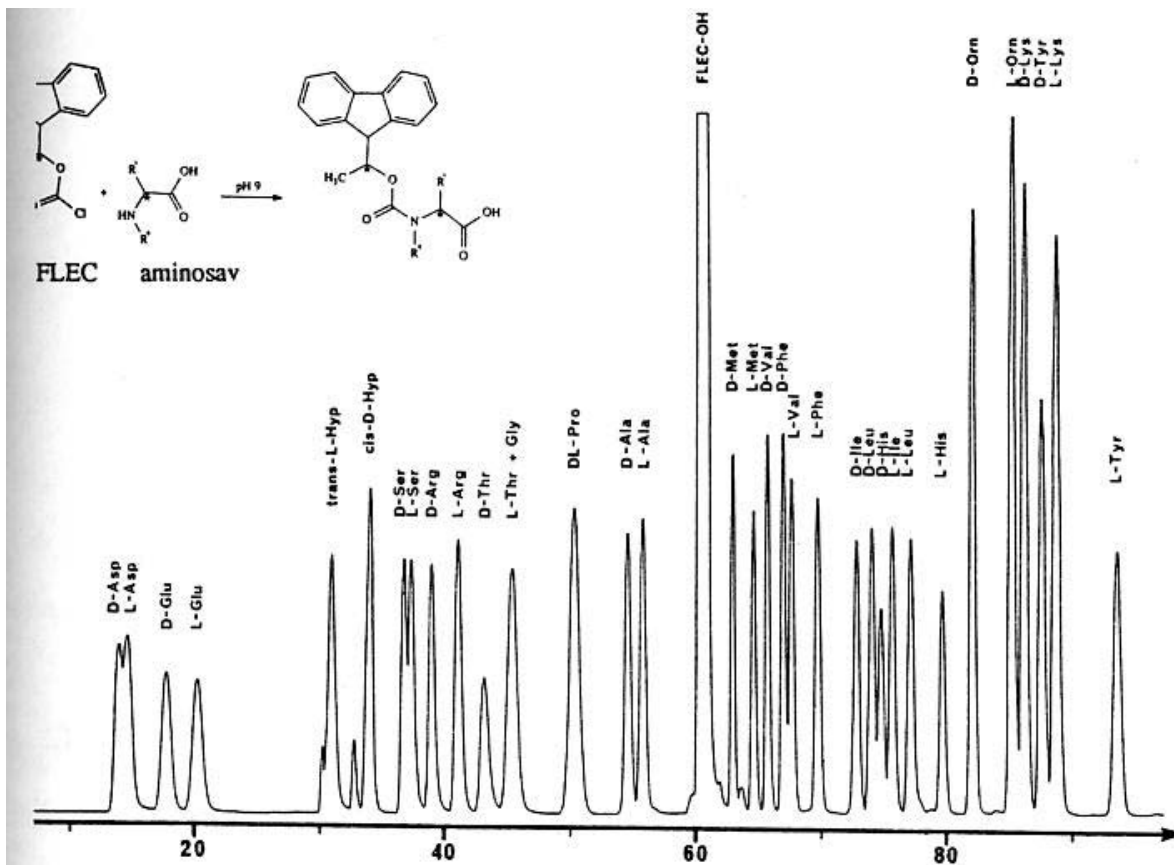
A peptid hidrolizátum-minták igen különböző koncentrációban tartalmazzák a meghatározni kívánt aminosav enantiomereket. Ezért a csúcs alatti területek ismételhetségét meghatároztuk a 20-80 $\mu\text{M/l}$ tartományban az L-aminosavakra és 0,3-2,8 $\mu\text{M/l}$ tartományban a D-aminosavakra. A relatív standard eltérés átlaga 3,6 % volt az L-aminosavakra és 6,2 % a D-aminosavakra. Egy referencia aminosav felhasználásával normalizálva a csúcs alatti területeket az RSD értékek az L-aminosavak esetében 2,2 %-ra, a D-aminosavak esetében pedig 5,3%-ra csökkentek.

Az iminosavak izokratikus elválasztásakor a retenciós idő szórása 10 minta analízise után 0,0082-0,040 perc között változott. 10 minta 5 μM koncentrációjú iminosav analízise után a csúcs alatti területek RSD átlaga 1,1% volt (szélső értékek 0,75-1,44%). Amennyiben az L-prolin koncentrációját a D-prolin koncentrációjának százszorosára megnöveltük, az nem volt hatással a D-prolin csúcs alatti területének RSD átlagára.

A mintaadagoló eredetileg 10 μl -es fixen beépített hurokkal volt ellátva. A célból, hogy az injektálást minél precízebbé tegyük, és hogy az elválasztott komponensek csúcs alatti területei minél pontosabbak legyenek, az eredeti hurkot 25 μl -esre cseréltük a hurok lineáristól eltérő hibáinak minél jobb kiküszöbölésére (Dolan, 1987).

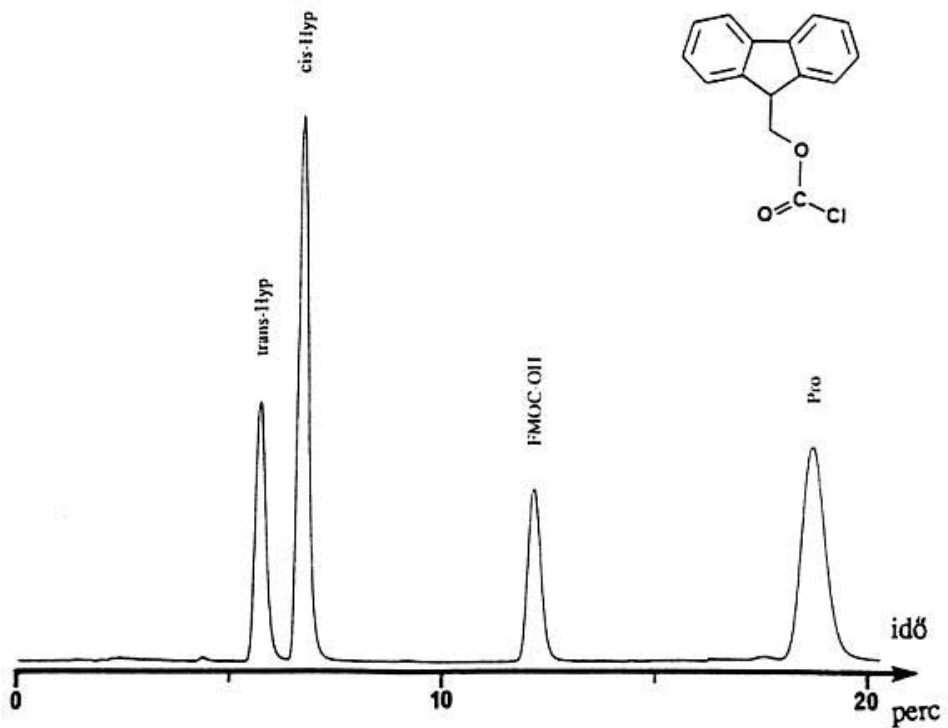
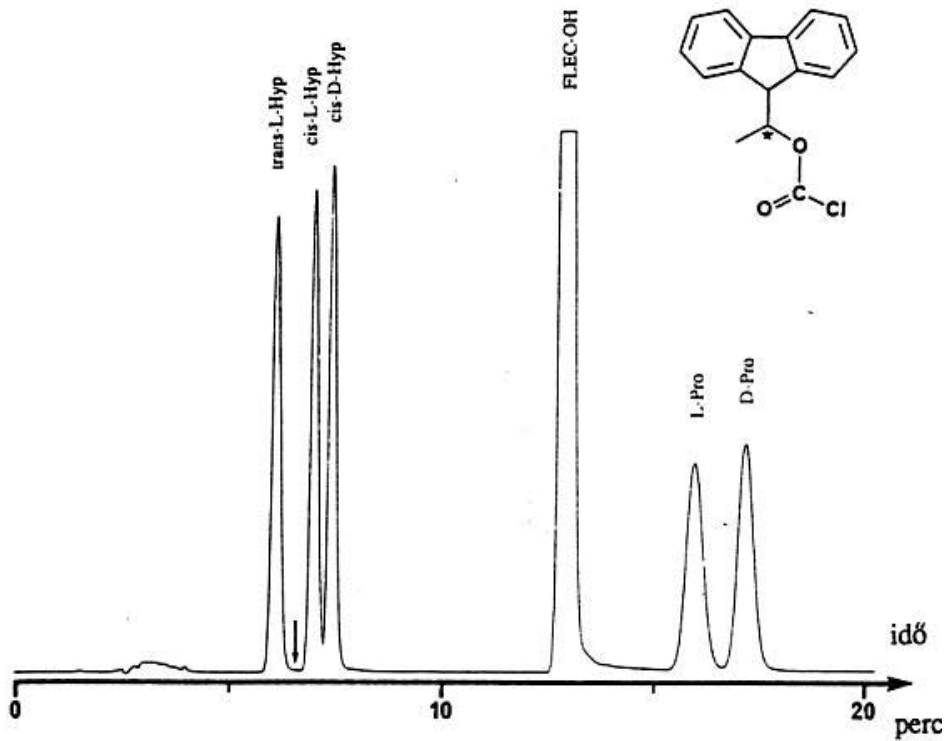
A csúcsok elválását a tatrahidrofuránhoz kevert acetát-puffer mennyiségének változtatásával értük el. A 7-es pH-ju pufferrel indítva az analízist az aszparaginsavat és a glutaminsavat elválasztottuk a többi aminosavtól. Ezt követően az eluens pH-ját 4,25-ra változtatva és az ionerősséget beállítva elértük, hogy az arginin a treonin és a szerin között eluált. A D-Phe/L-Val és a D-His/L-Ile enantiomer páros elválasztásának optimalizálására az eluens pH-ját a két puffer elegyítésével 4,78-ra növeltük. Az elválasztást ezen kívül optimalni lehet az álló fázis megváltoztatásával is. A szilanol-csoport jelenléte az álló fázison jelentősen befolyásolja pl. az arginin retencióját, melyet ellensúlyozni lehet 1-20 μM trietil-amin vagy tetrametil-ammóniumsó mozgó fázishoz történő keverésével. Az elválasztást a 2. ábrán mutatjuk be.

A hidroxiprolin és a prolin enantiomerek szétválasztásához alacsony pH-ju mozgó fázis szükséges. Amint azt a 3. ábrán bemutatjuk, egy egyszerű izokratikus elúcióval tökéletes elválasztás érhető el. Hasonló kromatográfiai körülmények között szét lehet választani a hidroxiprolin cisz és transz izomerét optikailag inaktív FMOC-Cl-dal történő származékképzés után.

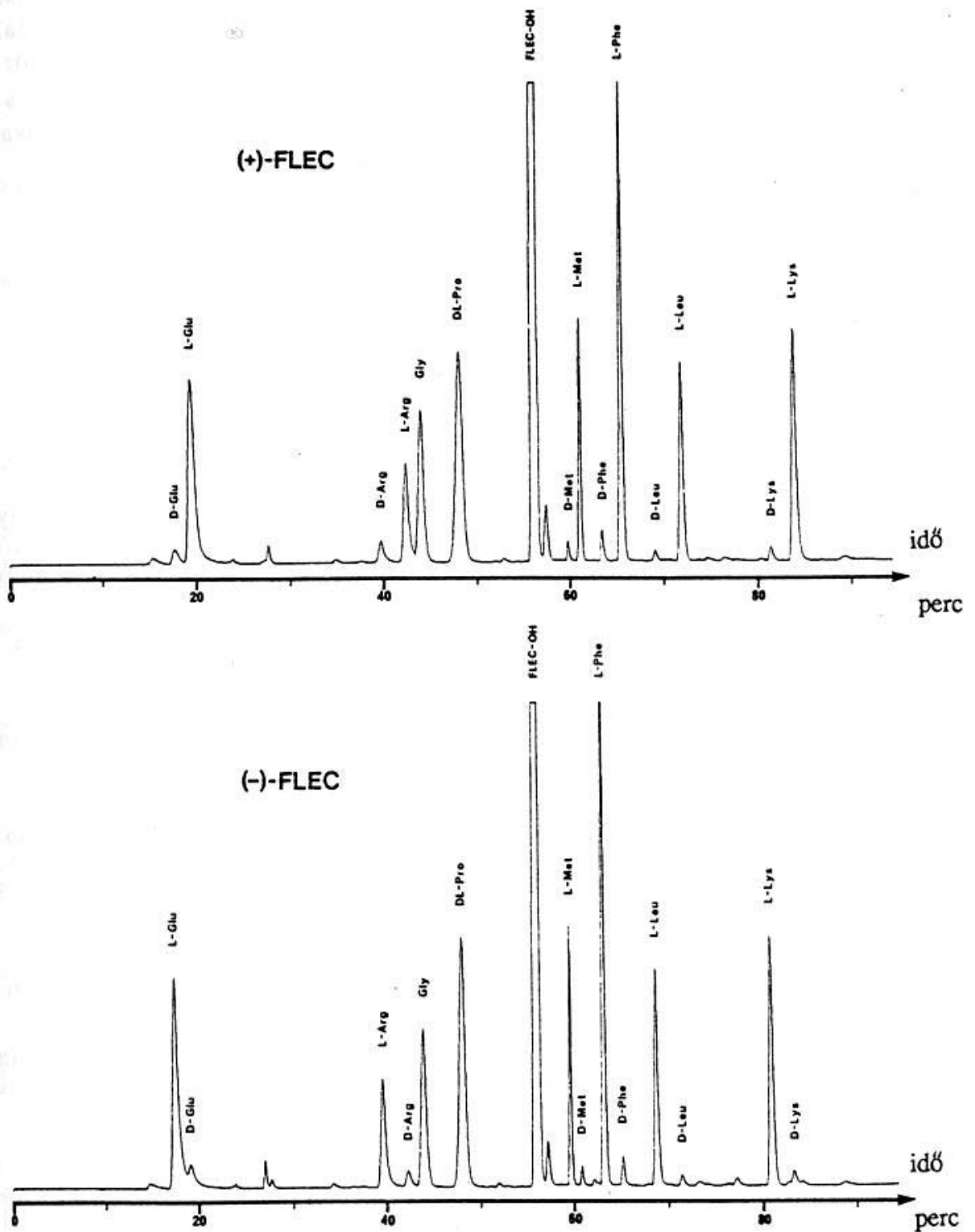


2. ábra: (+)-FLEC-tal képzett aminosav-származékok szétválasztása gradiens elúcióval

Az aminosav enantiomerek tisztaságának és a fehérjehidrolízis során lejátszódó racemizáció arányának mérése szükségessé teszi, hogy az enantiomereket széles koncentráció tartományban meg lehessen határozni. A D-aminosav nyomnyi mennyiségének detektálása a fehérje hidrolizátumból problematikus lehet a lehetséges átfedések miatt, amit okozhat pl. a reagensből vagy az egyéb aminosavakból eredő szennyeződés. Az enantiomerek tökéletes elválasztása ezért elengedhetetlen. Rendkívül előnyös az, ha a reagens mindkét enantiomerjét módunkban áll használni, mert ez megnöveli a csúcsok azonosításának megbízhatóságát, mivel a reagens másik enantiomerjével végezve el a származékképzést, megváltozik a diasztereomer származékok elúciós sorrendje (4. ábra). Másik előnye a reagens mindkét enantiomerje használatának az, hogy lehetőség van annak az aminosav enantiomer retenciójának a meghatározására is, amelyik nincs is jelen a mintában, elvégezve a kromatográfiát az ellentétes térszerkezetű reagenssel létrejött reakció után. A 3. ábrán e módszer alkalmazását mutatjuk be transz- D-hidroxi-prolinra. A felső kromatogramon a nyíl a transz-D-Hyp helyet jelöli a transz-L-Hyp (-)-FLEC-tal történő származékképzése után.



3. ábra: A 36 α -aminosavat és az iminosavakat tartalmazó aminosav standard (25 $\mu\text{m/l}$, mindegyik aminosav) izokratikus szétválasztása a B módszer szerint (+)-FLEC-tal (felső kromatogram) és a nem aszimmetriás FMOCC-dal történő származékképzés után (alsó kromatogram).



4. ábra: A hidrolizált (145 °C, 4 óra, 6 M sósav) peptid enantiomerjeinek szétválasztása (+)-FLEC-tal (felső kromatogram) és a (-)-FLEC-tal történő származékképzés után (alsó kromatogram)

Az aminosavak racemizációját meghatároztuk különböző fehérjék (neurotenzin, α -MSH, oxitocin) 6 M sósavas hidrolízise után, és ugyancsak meghatároztuk a szabad aminosavak racemizációját is. A peptidhidrolizátum kromatográfiás elválasztását a 4. ábra mutatja. A savas hidrolízis utáni racemizáció nagysága hasonló mérvű volt az előzetesen publikált adatokhoz. Összehasonlítva a gáz- és a folyadékfázisú hidrolízist 6 M sósavval 110 °C-on, az aminosavak racemizációjában lényeges különbséget nem tudtunk megállapítani.

Irodalom

- Aswad, D.W. (1984): Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high performance liquid chromatography after derivatization with chiral adduct of o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.*, **137**. 405
- Betner, I. & Földi, P. (1988): The FMOC-ADAM approach to amino acid analysis. *LC. GC.* 832
- Buck, R.H. & Kruppen, K. (1987): High-performance liquid chromatography determination of enantiomeric amino acids and amino alcohols after derivatization with o-phthalaldehyde and various chiral mercaptans. *J. Chromatogr.*, **387**. 255
- Cronin, J.R. & Pizzarello, S. (1983): Amino acids in meteorites. *Adv. Space. Res.*, 3. 5
- Csapó, J., Csapó-Kiss, Zs., Költő, L. & Papp, I. (1990): Age determination of fossil bone samples based on the ratio of amino acid racemization. *Archaeometry '90*, Birkhauser Verlag Basel, 627
- Csapó, J., Tóth-Pósfai, I. & Csapó-Kiss, Zs. (1990): Separation of D- and L-amino acids by ion exchange column chromatography in the form of 2-sulfonilic acid alanyl dipeptides. In Lubec, G. & Rosenthal, G.A. (Eds): *Amino Acids. Chemistry, Biology and Medicine*. ESCOM Sci. Publ. B.V. 96
- Csapó, J., Tóth-Pósfai, I. & Csapó-Kiss, Zs. (1991): Separation of D- and L-amino acids by ion exchange column chromatography in the form of alanyl dipeptides. *Amino Acids*. **1**. 331
- Csapó, J. & Henics, Z. (1991): Quantitative determination of bacterial protein from the diaminopimelic acid and D-alanine content of rumen liquor and intestines. *Acta Agronomica Hungarica*. **40**. 159
- Cunico, R. Majer, A.G. Wehr, C.T. & Sheehan, T.L. (1986): High sensitivity amino acid analysis using a novel automated precolumn derivatization system. *BioChromatography*, 1
- Dolan, J.W. (1987): Troubleshooting autosamplers. Part II. *LC. GC.* **5**. 224
- Einarsson, S., Josefsson, B. & Lagerkvist, S. (1983): Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **282**. 609

- Einarsson,S.(1985): Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* , **348**. 213
- Einarsson,S., Josefsson,B., Möller,P. & Sanchez,D.(1987): Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **59**. 1191
- Frank,H., Woiwode,W., Nicholson,G. & Bayer,E.(1981): Determination of the rate of acidic catalysed racemization of protein amino acids. *Liebigs Ann. Chem.*, 354
- Hirschmann,R., Strachan,R.G., Schwann,H., Schoenewaldt,E.F., Joshua,H., Barkenmeyer,B., Weber,D.F., Palevada,W.J., Jacob,T.A., Beesley, T.E. & Denkwalter,R.G.(1967): The controlled synthesis of peptides in aqueous medium. III. Use of Leuchs' anhydrides in the synthesis of dipeptides. Mechanism and control of side reactions. *J. Org. Chem.*, **32**. 3415
- Lindroth,P. & Mopper,K.(1979): High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.*, **51**. 1667
- Man,E.H. & Bada,J.L.(1987): Dietary D-amino acids. *Ann. Rev. Nutr.*, **7**. 209
- Manning,J.M. & Moore,S.(1968): Determination of D- and L-amino acids by ion exchange column chromatography as L-D and L-L dipeptides. *J. Biol. Chem.*, **243**. 5591
- Masters,P.M. & Friedman,M.(1980): Amino acid racemization in alkali-treated proteins -Chemistry, toxicology and nutritional consequences. In Whittaker,J.R. & Fujimaki,M. (Eds): *ACS Symp.*, 123. 165
- Miller,G.H. & Hare,P.E.(1980): Amino acid geochronology: Integrity of the carbonate matrix and potential of molluscan fossils. In Hare,P.E., Hoering,T.C. & King,K.Jr. (Eds): *Biogeochemistry of amino acids*. J. Wiley & Sons. NY, 415
- Mayer,A.G. & Sheehan,T.L.(1988): Fully automated HPLC analysis of amino acids using precolumn derivatization with fluorenylmethyl chloroformate. P72. 17th Int. Symp. Chrom., Vienna
- Smith,R.J. & Panico,K.A.(1985): Automated analysis of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids in physiological fluids by reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Liquid Chromatogr.*, **8**. 1873
- Tophui,Y. , Schmidt,D.E., Lindner,W. & Karger,B.L.(1981): Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis. *Anal. Biochem.*, **115**. 123
- Wehmiller,J.F. & Hare,P.E.(1971): Racemization of amino acids in marine sediments. *Science*, **173**. 907
- Williams,K.M. & Smith,G.G.(1977): A critical evaluation of the application of amino acid racemization to geochronology and geothermometry. *Origins of Life*, **8**. 91

Élelmiszerek és takarmányok D-aminosav tartalma I. Az aminosav enantiomerek szétválasztása és meghatározása fordított fázisú folyadékkromatográfiával

Csapó J. & Einarsson, S.

Egy módszert írtak le az α -aminosav szétválasztására és meghatározására, valamint az iminosavak szelektív meghatározására az 1-(9-fluorenil)-1-etil-kloro-formiáttal (FLEC) történő származékképzés után fordított fázisú kromatográfiával. Rendkívüli előnye az alkalmazott eljárásnak, hogy a reagens mindkét enantiomerjének (+FLEC és -FLEC) használatával megnő a csúcsok azonosításának megbízhatósága, mivel a reagens másik enantiomerjével végezve el a származékképzést, megváltozik a diasztereomer származékok elúciós sorrendje. A D- és az L-hidroxi-prolin cisz és transz módosulatát a módszerrel tökéletesen el lehet választani egymástól. A módszer segítségével meghatározták a szabad aminosavak, valamint a fehérjék racemizációját a folyadék- és gázfázisú hidrolízis során.

D-Amino Acid Content of Foodstuffs and Feeds I. Separation and Determination of Amino Acid Enantiomers by Reverse Phase Liquid Chromatography

Csapó, J. and Einarson, S.

A reverse phase chromatographic method is described for the separation and determination of d-amino acids after derivatization with 1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformiate. The extraordinary advantage of the procedure given is the enhanced reliability of peak identification using both enantiomers of the reagent (+FLEC and -FLEC). Derivatization with the other enantiomer of the reagent changes the elution order of diastereomeric derivatives. Cis and trans modification of D- and L-hydroxy proline can be perfectly separated by this method. The racemisation of free amino acids and proteins during liquid and gas phase hydrolysis was determined using the method.

D-Aminosäuregehalt von Lebensmitteln und Futtermitteln I. Trennung und Bestimmung von Aminosäureenantiomeren mit Umkehrphase-Flüssigkeitschromatographie

Csapó, J. und S. Einarson

Verfasser haben eine Methode zur Trennung und Bestimmung von D-Aminosäureenantiomeren sowie zur selektiven Bestimmung von Iminosäuren nach Derivatbildung mit 1-(9-Fluorenyl)-Äthyl-kloroformiat bei Anwendung beider Enantiomere (+ FLEC und - FLEC) die Zuverlässigkeit der Identifizierbarkeit der Peaks zunimmt, da durch die Derivatbildung mit der anderen Enantiomere der Reagenz die Elutionsreihenfolge der Diastereomerderivate verändert wird. Die Cis- und Trans-Varianten des D- und L- Hydroxiprolins können voneinander vollkommen getrennt werden. Mit Hilfe der Methode wurden die freien Aminosäuren sowie die Rasemisation der Eiweißstoffe bei der Flüssig- und Gasphasen-Hydrolyse bestimmt.