

MŰSZAKI SZEMLE 39–40. szám, 2007.

Szerkesztőbizottság elnöke / President of Editing Committee

Dr. Köllő Gábor

Szerkesztőbizottság tagjai / Editing Committee

Dr. Balázs L. György – HU,
Dr. Biró Károly Ágoston – RO,
Dr. Csibi Vencel-József – RO,
Dr. Fedák László – UA,
Dr. Kása Zoltán – RO,
Dr. Kászonyi Gábor – HU,
Dr. Majdik Kornélia – RO,
Dr. Maros Dezső – RO,
Dr. Nagy László – RO,
Dr. Péics Hajnalka – YU,
Dr. Pungor Ernő – HU,
Dr. Puskás Ferenc – RO,
Dr. Szalay György – SK,
Dr. Turchany Guy – CH

Kiadja / Editor

Erdélyi Magyar Műszaki
Tudományos Társaság – EMT
Societatea Maghiară Tehnico-Științifică
din Transilvania
Ungarische Technisch-Wissenschaftliche
Gesellschaft in Siebenbürgen
Hungarian Technical Scientific Society
of Transylvania

Felelős kiadó / Managing Editor

Dr. Köllő Gábor

A szerkesztőség címe / Address

Romania
400604 Cluj, Kolozsvar
B-dul 21. Decembrie 1989., nr. 116.
Tel/fax: 40-264-590825, 594042
Levél cím: RO – 400750 Cluj, C.P. 1-140.

Nyomda / Printing

Incitato Kft.

ISSN 1454-0746

CNCSIS által elismert folyóirat
Revistă acreditată de CNCSIS

A kiadvány megjelenését
támogatta



COMMUNITAS
ALAPÍTVÁNY

Communitas Alapítvány
Kolozsvar

Tartalomjegyzék – Content – Cuprins

- A miccs aminosav-összetételének változása különböző idejű és hőmérsékletű hőkezelés hatására
The Changing of Amino Acid Composition in Miccs Samples Under the Effect of Heat-treating of Different Times and Temperature
Modificarea compoziției de aminoacizi a mititeilor sub influența tratării termice la diferite temperaturi și intervale de timp
ALBERT Csilla, LÓKI Katalin, BÍRÓ Melinda, SALAMON Szidónia, SÁRA Péter, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna, CSAPÓ János 5
- Arzénmentesítés adszorpciók technikával
Removal of Arsenic by Adsorption
Îndepărtarea arsenului prin metode de adsorbție
BUJDOSÓ Tamás, PATZKÓ Ágnes, GALBÁCS Zoltán, LICSKÓ István, DÉKÁNY Imre 8
- Racém (Z)-2,3-epoxibutanol-származékok enzimkatalizált kinetikus rezolválása
Kinetic Resolution of Racemic (Z)-2,3-epoxybutanol Derivatives
Rezoluția cinetică a (Z)-2,3-epoxibutanol derivațiilor
FARKAS Ferenc, BATTANCS Melinda, THURNER Angelika, SIMÁNDI Béla, POPPE László, FAIGL Ferenc 13
- Új, optikailag aktív 1-(szubsztituált aril)pirrol-2-karbonsavak szintézise
Synthesis of New, Optical Active 1-(substituted aryl)pyrrole-2-carboxylic Acids
Sinteza unor noi acizi 1-(aril substituiți)pyrrole-2-carboxilici cu activitate optică
FELDHOFFERNÉ VAS Bernadett Éva, THURNER Angelika, CZUGLER Máttyás, TÁRKÁNYI Gábor, FAIGL Ferenc 17
- Nitrát szennyezés eloszlása a Nyárád vízgyűjtőjében
Distribution of the Nitrate Pollution in the Niraj River Catchments Area
Distribuția poluării în bazinul hidrografic al râului Niraj
HAJDU Zoltán, FÜLEKY György 20
- Csomagolóanyagok környezeti hatásvizsgálata
The Environmental Effects of Plastic Packaging Materials
Studiul efectelor de mediu a unor materiale de ambalaj
HORVÁTH Anikó, STIPTA József 25
- Az azometinek termikus viselkedése
The Thermal Behavior of the Azomethines
Comportarea termică a azometinelor
KEREKES Katalin, BÁLDEA Ioan, ifj. VÁRHELYI Csaba, POKOL György, VÁRHELYI Csaba 31
- A szabad és fehérjében kötött triptofán-enantiomerek meghatározása különböző hidrolízismódszerek alkalmazásával
The Determination of the Free and Protein-bound Tryptophan Enantiomers by Using Different Hydrolysis Methods
Determinarea enantiomerilor a triptofanului liber și legat în proteine folosind diferite metode hidrolitice
LÓKI Katalin, ALBERT Csilla, VARGÁNÉ VISI Éva, BÍRÓ Melinda, SALAMON Szidónia, SÁRA Péter, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna, CSAPÓ János 35
- Élelmiszerek biológiailag felvehető króm(III) és króm(VI) tartalmának modellezése
Modeling of Uptake of Biologically Available Cr(III) and Cr(VI) in Foodstuffs
Modelarea absorbției ionilor de Cr(III) și Cr(VI) biologic disponibili în alimente
MURÁNYI Zoltán, KOZÁK Imre Olivér, OLDAL Vince 40
- Bevezető gondolatok az asszociált víz szerkezetének és építőköveinek gráfelméletéhez (I)
Introducing Thoughts to the Graph Theory of Associated Water Structure and the Simplest Constitutive Clusters
Idei introductive în teoria grafurilor privind structura apei asociate și a clasterelor constitutive cele mai mici
MUZNAY Csaba 43

Rokon szerkezetű molekulák hatása az enantiomer felismerésre a rezolválás folyamataiban III. The Effect of Structurally Related Molecules on the Enantiomer Recognition During the Resolution III. Efectul moleculelor cu structura înrudită în recunoașterea enantiomerilor în procesul de rezoluție PÁLOVICS Emese, SCHINDLER József, BORSODI János, BERECZKI Laura, MARTHI Katalin, FAIGL Ferenc, FOGASSY Elemér	48
A konjugált linolsav antioxidáns hatásának vizsgálata egy modell kísérletben Examination of the Antioxidant Effect of Conjugated Linoleic Acid During a Model Experiment Analiza efectului antioxidant al acidului linoleic conjugat printr-un experiment model SALAMON Rozália, GYÓRI Anikó, GYÓRI Zoltán, LÓKI Katalin, SÁRA Péter, SALAMON Szidónia, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna, CSAPÓ János	52
Halványítási eljárások eredményességének vizsgálata a faiparban Study of Results of Bleaching Procedures in Woodworking Industry Studiul rezultatelor procedeeilor de albire din industria prelucrării lemnului STIPTA József, NÉMETH Viktória	56
Természetes aromaanyagok biokatalitikus előállítása Biocatalytic Production of Natural Flavour Compounds Sinteza aromelor naturale prin metode biocatalitice SZ. NÉMETH Ágnes, SZ. MÁRCZY Judit, SAMU Zsuzsa, HÁGER-VERESS Ádám, SZAJÁNI Béla, SISAK Csaba	63
Az őrölt hulladék-kalcium-karbonát szuszpenzió, mint kéndioxid lekötő The Milled Residual Calcium Carbonate Suspension as Sulphur Dioxide Capture Agent Carbonatul de calciu rezidual măcinat ca agent de reținere a dioxidului de sulf SZÉP AI. Sándor, HARJA Maria	69
Összehasonlító morfológiai és elektrokémia vizsgálatok földigiliszták izomzatának szerotonerg beidegzésében Correlative Morphometric and Electrochemical Measurements of Serotonergic Innervation in Earthworm Muscles Determinări morfometrice și electrochimice corelative ale inervațiilor serotoninergice în mușchii rămelor TAKÁCS Boglárka, CSOKNYA Mária, GÁBRIEL Róbert, Dr. NAGY Géza	73
Újabb eredményeink a növényi hormonok hatásmechanizmusának kutatásában New Results in the Research of the Activity Mechanism of Phytohormones Rezultate noi în cercetarea mecanismului de acțiune a fitohormonilor TŐKÉS Béla, BĀLAN Júlia, BODÓ Erzsébet, DONÁTH-NAGY Gabriella, SZAKÁCS János	78
A templát reakciók Template Reactions Reacții templat ifj. VÁRHELYI Csaba, POKOL György, LIPTAY György, MAJDIK Kornélia, FARKAS György, VÁRHELYI Csaba	83
Élelmiszer minták mérésére alkalmas aszkorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben Developing of Ascorbic Acid Biosensor in FIA (Flow Injection Analysis) System Suitable for the Analysis of Food Samples Dezvoltarea unor biosenzori în sistem FIA de acid ascorbic utilizați în determinări din probe de alimente VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYI Nóra, BÓKA Beáta, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila	88

www.emt.ro

emt@emt.ro



In memoriam Pungor Ernő
(1923 – 2007)

Pungor Ernő akadémikus meghatározó egyénisége volt a magyar tudományos életnek. Egész életútja, munkássága azt bizonyítja, hogy kitartó munkával, tehetséggel, emberi tartással eljuthat az ember a szakma legmagasabb csúcsaira. Tudós, oktató, kutató, iskolateremtő, olyan tanár akire felnéztek a kollégák, akire mindig emlékeztek és emlékezni fognak a hallgatók és a barátok. Élete, tudományos és oktatói munkássága során mindent elért, amit egy egyetemi oktató elérhetett. Elismerését nemcsak díszdoktori oklevelek, diplomák és kitüntetések sokasága jelenti, hanem munkatársai, barátai, ismerősei elnemmúló szeretete, megbecsülése. Számunkra, az Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság számára, Pungor Ernő igazi támogató, segítő, munkánkra odafigyelő barát volt. A kezdetektől támogatta, atyai szeretettel figyelte tevékenységünket. Szervezetünk útján mindig ott éreztük biztató, útmutató, segítő, őszinte együttérző munkáját. Eltávozásával egy igazi, jó barátot veszítettünk el. Emléke legyen áldott, nyugalma békés.

Dr. Köllő Gábor
EMT elnök

A miccs aminosav-összetételének változása különböző idejű és hőmérsékletű hőkezelés hatására

The Changing of Amino Acid Composition in Miccs Samples Under the Effect of Heat-treating of Different Times and Temperature

ALBERT Csilla¹, LÓKI Katalin², BÍRÓ Melinda¹, SALAMON Szidónia², SÁRA Péter¹,
CSAPÓ KISS Zsuzsanna², CSAPÓ János^{1,2}

¹EMTE Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék,
RO-4100 Csíkszereda, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-314-657, fax: 40-266-372-099;
albertcsilla@sapientia.siccolorum.ro, www.emte.ro

²Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai-Biokémiai Tanszék,
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40., Tel.: 36-82-314-155, fax: 36-82-321-749;
csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu; www.u-kaposvar.hu

ABSTRACT

The amino acid composition of "mici" samples of different temperature, heat-treated for different times was determined by the authors, including Trp-content. After 6 M HCl hydrolysis, the amino acid composition was determined with amino acid analyzer, and after a hydrolysis of barium-hydroxide, the Trp-content was determined by photometry. They established that under the effect of 10, 25 and 40 minute long roasting at 190 and 225 °C, the amino acid composition did not change, except for cystin, the reason of which is the high level of protein content and the low level of carbohydrate content of the samples.

Keywords: amino acid composition, ion exchange column chromatography, heat treatment, protein qualification

1. BEVEZETÉS

A szakirodalomban több közlemény jelent meg arról, hogy a mikrohullámú kezelés károsan befolyásolhatja az élelmiszereink vitamintartalmát. Ugyancsak ismeretesek olyan közlemények, melyek szerint a mikrohullámú kezelés elősegítheti az aminosavak racemizációját. Csecsemőtápszer esetében beszámoltak arról, hogy mikrohullámú kezelés hatására jelentős koncentrációban keletkezett D-allo-hidroxi-prolin. Japán kutatók beszámoltak arról is, hogy L-aminosavak oldata mikrohullámú kezelés hatására teljes mértékben racemizálódott, melyet kihasználtak az L-aminosavakból keletkező D-aminosavak előállítására. Korábban mi is [1] vizsgáltuk a mikrohullámú hőkezelés hatását különböző idő- és energia kombinációkban a hamburgerhez használt húspogácsa aminosav-összetételére, D-aminosav-, valamint vízoldható vitamintartalmára. Megállapítottuk, hogy a hőmérséklet és az idő függvényében a vitaminvesztés számottevő lehet, de vizsgálataink szerint jelentős lehet az aminosavak racemizációja is. Eredményeink birtokában elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a miccs aminosav-összetételének változását, valamint az aminosavak racemizációját ezen speciális élelmiszer esetében. Kísérleteink jelenlegi szakaszában a miccs aminosav-összetételének vizsgálatát végeztük el, melynek eredményéről szeretnénk közleményünkben beszámolni. Kísérletünk célja az volt, hogy vizsgáljuk az elektromos grillezővel hőkezelt húsminták aminosav-összetételének változását.

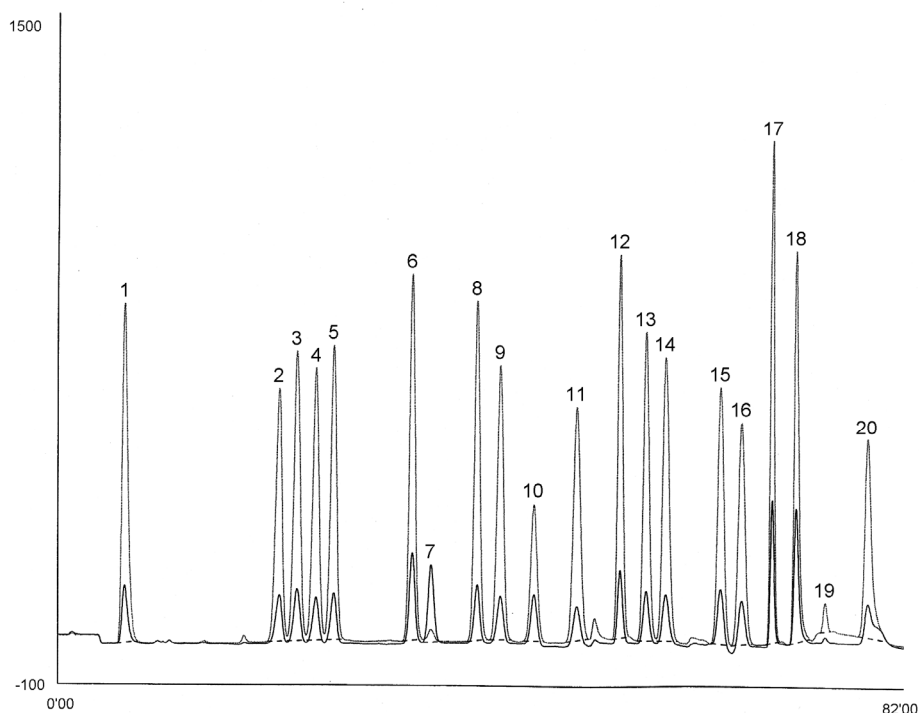
2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A vizsgált anyagok és azok hőkezelése

A kísérleteink során a kereskedelmi forgalomban beszerzett sertéskaraj és miccsmintákat többfunkciós grill sütővel különböző ideig hőkezeltük. A sertéskaraj esetében 225 °C-on 10, 25 és 40 percig, a miccs esetében pedig ugyanezen időtartamig 190 °C-on végeztük a hőkezelést. Minden kezelt anyagból három mintát vettünk: a minták külső részéből, mely a külső 3 mm-es réteget jelentette, a belső részből, mely a külső rész eltávolítása után megmaradt részt jelentette, és a minta átlagából, melyet a külső és belső rész homogénezálásával kaptunk. A mintákat mélyhűtőpultban -25 °C-on tároltuk az analízisre történő előkészítésig.

2.2. A minták kémiai analízise

A szárazanyag-tartalom meghatározást a Magyar Szabvány szerint végeztük 105 °C-on, tömegállandóságig végzett szárítással. A fehérjetartalmat Kjeltac gyors nitrogénelemzővel analizáltuk a Magyar Szabvány szerint, az aminosav-összetételt AA400 INGOS automata aminosav-analizátorral határoztuk meg. A mintákat az analízist megelőzően 6 M-os sósavval 110 °C-on 24 órán át hidrolizáltuk, majd a hidrolízist követően a sósavat – a hidrolizátumot só-jég hűtőkeverékben tartva – 4 M nátrium-hidroxiddal közömbösítettük. Az aminosav-analizátor érzékenysége lehetővé tette, hogy a minták kellő hígítása után a megnövelt nátriumion-koncentráció nem okozott problémát. Egy tipikus kromatogramot mutat – perhangyasavas oxidációt követően – az 1. ábra.



1. ábra

Az aminosavak kromatogramja perhangyasavas oxidációt követően

Az aminosavak sorrendje: 1. ciszteinsav, 2. metionin-szulfon, 3. aszparaginsav, 4. treonin, 5. szerin, 6. glutaminsav, 7. prolin, 8. glicin, 9. alanin, 10. cisztin, 11. valin, 12. metionin, 13. izoleucin, 14. leucin, 15. tirozin, 16. fenilalanin, 17. hisztidin, 18. lizin, 19. ammónia, 20. arginin. Készülék: INGOS AAA400, oszloptöltet: OSTION Lg ANB, oszlopmagasság: 35 x 0,37 cm, pufferek: 1: pH 2,7; 0,2 M Na⁺; 2: pH 4,25; 0,5 M Na⁺; 3: pH 6,9; 1,12 M Na⁺; 4: 0,2 M NaOH.

A mintákat mind perhangyasavval oxidált, mind oxidálatlan módon hidrolizáltuk. A triptofánmeghatározás esetében a mintákat p-dimetil-amino-benzaladehid-kénsav-oldattal 48 órán át sötétben kezeltük, majd a nártium-nitrittel előhívott kék színű terméket spektrofotometriásan mértük. A mérést hidrolizálatlan, és bárium-hidroxiddal 24 órán át, 125 °C-on végzett hidrolízist követően is elvégeztük, ez utóbbi esetében a báriumot semlegesített oldatból szulfát formában csapattuk ki.

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Megállapítottuk, hogy hőkezelés hatására valamennyi minta szárazanyag-tartalma nőtt, mely változás a külső részek esetében jelentősebb volt, mint a belső részeknél. A magasabb zsirtartalmú miccsmintáknál a változás kevésbé volt szembevetendő, mint a sertéskarajnál. A sütés során a víz mellett a zsír is kifolyt a mintából, melynek következtében az analízisre felhasznált minta zsirtartalma is csökkent. A minták aminosav-összetételét vizsgálva megállapítható, hogy 190 °C-on végzett hőkezelés egyik aminosav esetében sem okozott

jelentős változást 40 perces hőkezelés alatt. A 225 °C-on végzett sütés hatására a cisztintartalom (g cisztin/100 g fehérje) a sütés előtti 1,2%-ról 10 perc alatt 0,9%-ra, 25 perc alatt 0,7%-ra, 40 perc alatt pedig 0,6%-ra csökkent. A hőkezelésre érzékeny többi aminosav (metionin, triptofán, treonin) sem 190 °C-on, sem 225 °C-on nem mutattak lényeges változást a nyers alapanyaghoz képest.

Külön figyelmet fordítottunk az értékelés során a lizintartalomra, hisz a lizin mind az ember, mind a gazdasági állataink legtöbbje számára rendkívül fontos esszenciális aminosav. Azért is érdemes még a lizinre figyelni, mert szabad ε-aminocsoportja rendkívül reakcióképes, és különösen nagy szénhidrát-tartalmú minták esetében – a Maillard-reakció miatt – jelentős lizinvesztéssel lehet számolni. Egy korábbi kísérletünkben, melynél a liszt, a kenyérbél és a kenyérhéj lizintartalmát hasonlítottuk össze, megállapítottuk, hogy a lisztben lévő fehérje 2,7%-os lizintartalma a kenyérhéjában 0,6%-ra csökken. Az általunk vizsgált minták esetében a lizintartalom sem 190, sem 225 °C-on még 40 perces hőkezelés hatására sem mutatott lényeges változást, ami az igen alacsony szénhidrát-tartalmú mintákban a Maillard-reakció elmaradásával magyarázható.

Összefoglalásul tehát elmondható, hogy ami várható volt a hőkezelés hatására a minták szárazanyag-tartalma csökkent, fehérjetartalma viszont nem változott. A különböző hőmérsékleteken, eltérő ideig sütött húsminták aminosav-összetételében csak a cisztin esetében tudunk szignifikáns csökkenésről beszélni a hőkezelés idejének növekedésének hatására. Megállapítottuk, hogy a minták alacsony szénhidrát-tartalmának köszönhetően a Maillard-reakció nem játszódott le, ezért az általunk alkalmazott körülmények között a lizin elbomlásával nem kell számolni.

Elképzelhető, hogy a különböző ideig magas hőmérsékleten végzett hőkezelés során az aminosavak egy része racemizálódott. Kísérleteink további részében szeretnénk megvizsgálni a minták D-aminosav-tartalmát, melyek közül elsőként a D-aszparaginsavat és a D-glutaminsavat szeretnénk meghatározni. Jelentős mennyiségű D-glutaminsav és D-aszparaginsav esetében a többi aminosav D-enantiomereit is meghatározzuk, és próbáljuk kideríteni az aminosavbomlás és a racemizáció okait a két vizsgált speciális húsétel esetében.

4. IRODALOM

- [1] Csapó J. – Pohn G. – Vargáné Visi É.: A mikrohullámú kezelés hatása húspogácsák vízdoldható vitamin- és D-aminosav-tartalmára. *Műszaki Kémiai Napok '01*. Veszprém, 2001. április 24-26. 200-204.

Arzénmentesítés adszorpciós technikával

Removal of Arsenic by Adsorption

BUJDOSÓ Tamás PhD hallgató¹, Dr. PATZKÓ Ágnes¹, Dr. GALBÁCS Zoltán²,
Dr. LICSKÓ István³, Dr. DÉKÁNY Imre¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Kolloidkémiai Tanszék, 6720 Szeged,
Aradi Vértanúk tere 1., E-mail: tomika@chem.u-szeged.hu

² Szegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 6720 Szeged, Dóm tér 7.

³ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vízi Közmű és Környezetmérnöki Tanszék,
1111 Budapest, Budafoki út 4.

ABSTRACT

The European limit of arsenic content of drinking water is 10 µg/L. That is why we have to lower the arsenic content of drinking water of more than 400 water supplying works in Hungary. The aim is to remove the arsenic by a quick method using non toxic, well filterable additives. The best one is the adsorption technique with LDH (layered double-hydroxides).

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az arzén jellemzése

Az arzén mérge, mely bizonyítottan felelős az ember esetében magzati károsodásért, örökletes rendellenességekért és a rák kialakulásáért. A szervetlen formák közül a +3 oxidációs állapotú a fehérjék szulfhidril csoportjához kötődve enzimgátlóként működik, míg a +5 oxidációs állapotú megzavarja a cukor anyagcserét a foszfátion kiszorításával az élőszervezetekben energiatárolóként funkcionáló ATP molekulákból. Az oxidációs szám csökkenésével az arzén toxicitása nő, és a szervetlen formák mérgezőbbek (pl. AsO_3 : LD_{50} = 0,0345 g/kg) a szerves eredetűeknél (pl. arzénkolin: LD_{50} = 6,5 g/kg). Statisztikai adatokból kialakított összefüggés alapján 0,3 µg/kg/nap (nem rákos) határértéket fogadtak el (USEPA), amely 70 kg-os ember esetében, és napi 2 liter vízbevitelt alapul véve, ivóvízre 10,5 µg/L határértéket jelent. Az arzén átlagos előfordulása a Földön 1,8 ppm. Az arzén egyes vizekben és egyes geológiai képződmények közeteiben feldúsul. A kőzetek igen magas arzéntartalma abból ered, hogy az arzén helyettesítheti a szilícium, vas és alumínium elemeket a rácsszerkezetben [1.]. A Kárpát medencében a kőzetekből mobilizált és felszíni, illetve felszínalatti áramlások által felhalmozódott arzén a lerakódó negyedidőszaki üledékekhez kötődött. Ma a visszaoldódás révén a sekély rétegvizeink (átlagosan a 100–300 m mélységben lévő vízadók) természetes arzéntartalma ennek köszönhető. Mélységi vizeinkben az arzén +3 és +5 állapotú szervetlen formában fordul elő. Az alacsonyabb oxidációs állapot az oxigénhiányos környezettel magyarázható. A nagy arzéntartalmú felszín alatti vizek általában enyhén lúgosak (pH=6,5-9,5). Ebben a pH tartományban az arsenit természetes formája zömmel nem disszociált arzénessav (H_3AsO_3), az arsenát pedig anionos ($\text{H}_2\text{AsO}_4^{1-}$ ill. HAsO_4^{2-}) [2.].

1.2. Ivóvizek arzénmentesítése

Az arzénformák határozzák meg az alkalmazható víztisztítási technológiát. Hazánkban néhány technológia terjedt el. Az egyik arsenát vas(III)-hidroxiddal történő eltávolítása, szükség szerinti derítőszer adagolása mellett. A jellemző arzén-eltávolítási hatásfok 60-80%, mely optimalizálással 95%-ra növelhető. A gyakorlatban alkalmazott másik eljárás a GEH töltet adszorpciós képességét hasznosítja. Ennél a GEH töltetet, amely $\text{Fe}(\text{OH})_3$ és $\beta\text{-FeOOH}$ hatóanyagú, oszlopba töltve, rögzített adszorbensként használják. Hátránya, hogy a foszfát-, szilikát-, borát-tartalmú vizekben az adszorbens felületén rosszul oldódó vasvegyület képződik, amely az arzén adszorpcióját meggátolja, s így az arzénmentesítő hamar kimerül. A huminsavas vizekben a huminsavak is elfoglalják az aktív helyeket ezért a rögzített adszorbensek (oszlopok) kapacitása általában lecsökken, a tisztító hatás erősen korlátozottá válik. Szennyezés eltávolítására széles körben alkalmazzák az alumínium-hidroxidot (alumínium sókból vagy poli-alumínium-kloridból képezve). Sajnos épp az arzéneltávolítási hatásfoka alacsony, különösen As(III)-tartalmú vizeknél. Újabban szerves ioncserélő gyantákkal is távolítanak el arzént. Ilyen, pl. az N-metil-D-glükamin hatóanyagú gyanták előállí-

tása szerves anyagú hordozón. Ezek az As(V)–formákat nagy affinitással kötik meg (55 mgAs/gNMDG), és más anionok jelenlétében is hatékonyak [3.]. Polisztirolra felvitt mangán–dioxiddal mind az As(III)–, mind az As(V)–formák eltávolíthatók (MnO₂ segít az As(III)–nak As(V)–té történő oxidálásában is) [4.]. A szerves ioncserélők vagy szerves anyagú hordozók hátránya, hogy alkalmazásuk esetén patogén baktériumok is elszaporodhatnak a gyantán, amely az ivóvizet emberi fogyasztásra alkalmatlanná tenné. Újabban folynak kutatások a vas különböző mesterségesen előállított módosulataival is. A vas–szulfátból előállított és Na–lauril–szulfáttal, illetve Na–karbonáttal kezelt goetit (103 m²/g fajlagos felület és 0,5 cm³/g pórus térfogat) 5 mg arsenátot köt meg grammonként, de ehhez pH=5 értéket kell fenntartani [5.]. Fehér cementtel borított vas-oxid (IOCC) viszont széles pH tartományban viszonylag hatékony arzenit–megkötő. Szelektivitása mind pozitív, mind negatív töltésű ionok mellett is (melyek a természetes vízben általában előfordulnak) kiváló, és a regenerálása is megoldott [6.].

1.3. Kettőshidroxidok alkalmazása arzéneltávolításra

Az eddigi módszerek vagy arzenit eltávolítására nem alkalmasak, vagy nem kielégítő a szűrési hatékonyságuk, esetleg veszélyforrás lehet alkalmazásuk az ivóvizekben. Ezen okból arzenmentesítés terén egy teljesen új anyagcsoporttal, az úgynevezett kettőshidroxidokkal kezdtünk foglalkozni. Az adszorbensként, katalizátorként széles körben használatos LDH (általános formula: $[M^{2+}_{1-x} M^{3+}_x (OH)_2]^{x+} A^{m-}_{x/m} x nH_2O$) nagy adszorpciós kapacitása alkalmas lehet arra is, hogy egyidejűleg többféle szennyezést, pl. a szerves szennyezést is eltávolítsa az ivóvízből [7.]. A réteges szerkezetű kettőshidroxidok oktaédes rácsában fellépő pozitív felületi töltéstöbblet alapján feltételezhető, hogy a rétegvizekben előforduló negatív töltésű arzenationok eltávolítására alkalmasak lehetnek. A viszonylag nagy, általában 200–500 nm–es hatszöges lemezek (de lehetnek ennél nagyobb néhány µm-es részek is) gyors ülepedést és jó szűrhetőséget eredményeznek [8.]. Mivel gyógyszerként és töltőanyagként is alkalmazzák egyes élelmiszereinkben, így az emberre ártalmatlan anyaggal végeznénk az arzéneltávolítást.

2. KÍSÉRLETI RÉSZ

2.1. Anyagok és módszerek

2.1.1. A kettőshidroxidok előállítása

A kísérleteknél felhasznált kettőshidroxidokat a megfelelő nitrát sókból állítottuk elő Al(NO₃)₃·9H₂O (Fluka, puriss), Ca(NO₃)₂·4H₂O (REANAL, purum) és Mg(NO₃)₂·6H₂O (Fluka, a.r.) desztillált vizes közegben 1:1, 2:1, 3:1 és 4:1 kettő–, illetve háromértékű ionarányoknak megfelelő oldásával. Az előre feloldott sók (Mg– és Al–, vagy Ca– és Al–sók) oldatához kevertetés közben folyamatosan adagoltunk NaOH tartalmú oldatot, az optimális pH beállítása céljából. Az előállított anyagokat kiszáritott por és vizes szuszpenzió formájában tároltuk. A porminták röntgen diffraktogramjai az LDH–ra jellemző 0,7–0,9 nm–es bázislap távolságot mutattak.

2.1.2. Az arzén analitikája

Az arzén meghatározása spektrofotometriás eljárással történt. Az 50 mL–es mintákat tömény sósavval (MOLAR, a.r.) savanyítottuk, majd szilárd KI (MOLAR, puriss) és aszkorbinsav (MOLAR, a.r.) hozzáadásával történt a félóra időtartamú elő–redukció. Az elő–redukció során az As(V) As(III)– má redukálódott, és így a későbbi borohidrides arzinfejlesztés hatékonyabbá vált. Külön készülékben Radelkis OP–936 típusú automata–bürettával 0,53 M NaBH₄ (Fluka) oldatot (melyet 0,1 M nátrium–hidroxiddal és 4 M kálium–karbonáttal lúgosítottunk) adagoltunk az előredukált vízmintához. A képződött arzin a savas közegben a nátrium–karbonátból fejlődő szén–dioxid vivőgáz által hajtva átáramlott egy piridines ezüst–dietyl–ditio–karbamát oldatú elnyelőbe. Az eredetileg sárga színű piridines oldat az arzin mennyiségével arányosan elvörösödött. A színváltozást SPEKOL 11 spektrofotométerrel mértük 540 nm–nél, az elnyelési maximumnál. A hitelesítő 100 mg/L töménységű arsenát törzsoldatot AsHNa₂O₄·7H₂O (Fluka, >98,5 %) desztillált vízben történő feloldásával készítettük. A törzsoldattal 7 pontos kalibrációs függvényt vettünk fel 0–200 µgAs/L koncentráció tartományban. A spektrofotometriás mérések során 5 cm-es üveg küvetákat alkalmaztunk a nagyobb pontosság elérése érdekében.

2.1.3. Arzén-eltávolítási vizsgálatok különböző vizekben

Az arzénmegkötési vizsgálatokat különböző ionarányban előállított Ca/Al– és Mg/Al–tartalmú kettőshidroxidokkal végeztük desztillált vízben, szegedi vezetékes vízben és gyulai artézi vízben. A szegedi vezetékes ivóvizet jellemző értékek: pH= 7,65; 1,1 mg K⁺/L, 63,2 mg Na⁺/L, 38,2 mg Ca²⁺/L, 18,8 mg Mg²⁺/L, 6,7

mg Cl⁻/L, 372,1 mg HCO₃⁻/L, 2,4 mg SO₄²⁻/L, 10 µg As/L, KOI=1,5 mg/L, 331 mg szárazanyag/L. A gyulai artézi vízre jellemző adatok: pH= 8,33; 1,0 mg K⁺/L, 100 mg Na⁺/L, 10,0 mg Ca²⁺/L, 2,0 mg Mg²⁺/L, 27,7 mg Cl⁻/L, 360 mg HCO₃⁻/L, 7,7 mg SO₄²⁻/L, 105 µg As/L, KOI= 5,6 mg/L, 396,6 mg Szárazanyag/L. A vizek kiindulási arzénkoncentrációját, az összehasonlíthatóság érdekében ~100 µg/L töménységűre állítottuk be, amely a gyulai artézi kút természetes arzéntartalmának felel meg. Az LDH adszorbenst 0,10–2,00 g/L mennyiségben, szárított por, vagy vizes szuszpenzió formában adagoltuk a tisztítandó vízhez.

2.2. Eredmények

A desztillált vízben végzett kísérletekből jól látható, hogy Mg-tartalmú LDH esetén 0,1 g/L-nél kevesebb is elegendő az arzéntartalom határérték alá csökkentéséhez, míg Ca esetében 0,5 és 1,0 g/L közötti mennyiség szükséges (1. táblázat).

1. táblázat

Arzénmentesítés desztillált vízben különböző ionarányú Ca/, illetve Mg/Al-LDH adszorbensekkel.

LDH g/L	As(V) koncentráció µg/L-ben					
	1:1 Mg/Al-LDH	3:1 Mg/Al-LDH	4:1 Mg/Al-LDH	1:1 Ca/Al-LDH	3:1 Ca/Al-LDH	4:1 Ca/Al-LDH
0,0	105,2	105,2	105,2	105,1	105,1	105,1
0,1	7,9	3,6	5,6	71,6	68,4	62,5
0,5	4,9	2,4	2,0	14,4	14,5	10,8
1,0	2,4	2,6	4,0	4,1	4,7	4,6

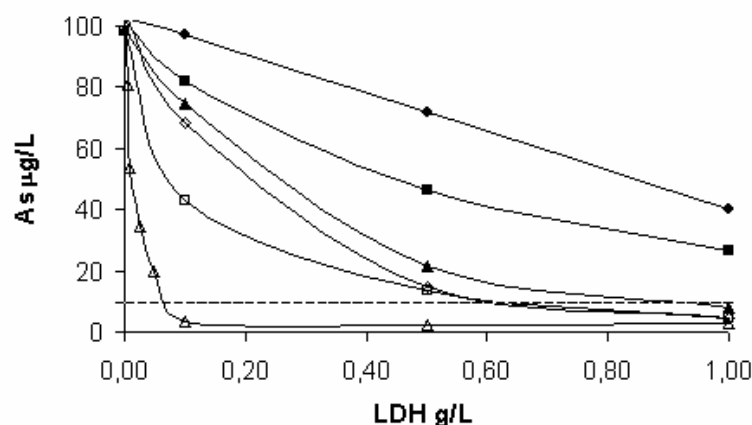
Továbbiak során természetes vízben is vizsgáltuk az LDH hatékonyságát. Az eredmények azt mutatják, hogy az egyes ionarányok között –mint desztillált vízben is– nincs számottevő különbség. Megállapítható, hogy a Mg/Al-LDH-t 0,5–1,0 g/L koncentráció tartományban kell alkalmazni a gyulai vízben a 10 µg /L arzéntartalom határérték biztosításához. A Ca/Al-LDH esetében 1,0 g/L adszorbens koncentráció átlagosan a jelenlévő arzén felét távolítja el a vízből (2. táblázat).

1. táblázat

Arzénmegkötés gyulai artézi vízben Ca/, és Mg/Al-kettőshidroxidokkal különböző ionarányok mellett

LDH g/L	As(V) koncentráció µg/L-ben					
	1:1 Mg/Al-LDH	3:1 Mg/Al-LDH	4:1 Mg/Al-LDH	1:1 Ca/Al-LDH	3:1 Ca/Al-LDH	4:1 Ca/Al-LDH
0,00	98,9	98,9	98,9	99,8	102,9	99,8
0,10	74,7	74,6	74,6	98,8	97,1	96,7
0,50	21,3	21,6	26,5	68,8	71,5	67,1
1,00	5,4	8,1	8,0	68,0	40,2	38,3

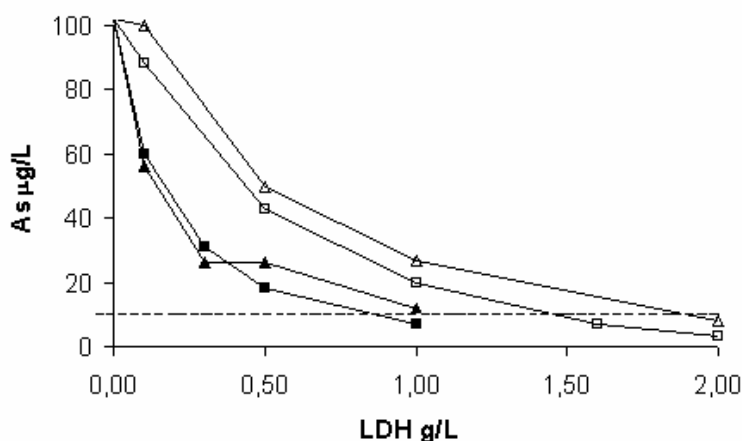
Ha összehasonlítjuk a háromféle vízben a két különböző összetételű kettőshidroxid arzéneltávolítási mértékét, látható, hogy desztillált vízben a leghatékonyabbak. A gyulai artézi vízben (amely erősen huminsavas) a legkevésbé eredményes. A kevés huminsavat tartalmazó szegedi vezetékes vízben talált értékek a desztillált vizes és a gyulai vizes kísérletek közé esnek. Valószínű, hogy az arzéneltávolítás hatását döntően befolyásolja a szervesanyag tartalom. A pH is befolyásoló tényező lehet, mert egyes vizsgálatok szerint pH= 6 értékig nő az arzén adszorpciója, majd pH= 8-ig változatlan, e fölött, pedig csökken [8].



1. ábra

Arzén eltávolítása Ca/Al- (telt forma), illetve Mg/Al-LDH (üres forma) adszorbensekkel desztillált (háromszög), vezetékes szegedi (négyzet) és gyulai artézi vízben (kör)

Az előállított 2:1 Mg/Al-LDH vizes szuszpenzió és száraz por formájában tárolt alakjait összehasonlítva nem tapasztaltunk releváns különbséget az arzéneltávolítás mértékében. Ezért az előállított anyag mindkét formája alkalmazható a víztisztítási technológiában (2. ábra).



2. ábra

Arzén megkötése 2:1 Mg/Al-LDH vizes szuszpenzió (négyzet), vagy száraz por formái (háromszög), gyulai artézi- (üres forma), és szegedi vezetékes (telt forma) vízben

3. ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgált LDH adszorbensekkel ivóvíz-minőségi határérték alá csökkenthető az arzén-koncentráció, az arzéneltávolító hatásokban azonban eltérés mutatkozott attól függően, hogy milyen az ivóvíz típusa, vagy milyen az adszorbens összetétele és adagolt mennyisége. Kimutattuk, hogy növekvő kétértékű ionarányval előállított LDH adszorbensek között nincs számottevő különbség az arzéneltávolítás mértékében. Megállapítottuk, hogy az LDH arzéneltávolító hatékonysága vizes szuszpenzió és szárított porforma esetében közel azonos. Az eredményekből kitűnt, hogy a Mg-tartalmú adszorbensek arzéneltávolítási hatékonysága sokkal nagyobb, mint a Ca-ot tartalmazóké.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatás a Gazdasági Versenyképesség Operatív Program: Mélységi vizek tisztítására alkalmas technológia kidolgozása a megfelelő ivóvíz biztonságos szolgáltatása érdekében című projekt keretében valósulhatott meg (GVOP-3.1.1.-2004-05-0186/3.0).

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1.] Galbács Zoltán: Az alföldi rétegvizek arzéntartalmával kapcsolatos problémák. VI. Országos Laboratóriumvezetői Értekezlet (kiadvány), Víz és Csatornaművek Országos Szakmai Szövetsége, Békéscsaba, 2000, 3–9
- [2.] P.L. Smedley, D.G. Kinniburgh: A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 2002/17, 517–568
- [3.] L. Dambies, R. Salinaro, and S. D. Alexandratos: Immobilized N-Methyl-D-glucamine as an Arsenate-Selective Resin, *Environ. Sci. Technol.*, 2004/38, 6139–6146
- [4.] V. Lenoble, C. Chabrouillet, R. al Shukry, B. Serpaud, V. Deluchat, J.-C. Bollinger: Dynamic arsenic removal on a MnO₂-loaded resin, *Journal of Coll. And Int. Sci.*, 2004/280, 62–67
- [5.] P. Lakshminathiraj, B.R.V. Narasimhan, S. Prabhakar, G. Bhaskar Raju: Adsorption of arsenate on synthetic goethite from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 2006/B136, 281–287
- [6.] Sanghamitra Kundu, A.K. Gupta: Adsorptive removal of As(III) from aqueous solution using iron oxide coated cement (IOCC): Evaluation of kinetic, equilibrium and thermodynamic models. *Separation and Purification Technology*, 2006/51, 165–172
- [7.] Bhaumik, S. Samanta and N.K. Mal: Efficient Removal of Arsenic from Polluted Ground Water. *Journal of Applied Sciences*, 2004/4 (3), 467–471
- [8.] N.K.Lazaridis, A.Hourzemanoglou, K.A.Matis: Flotation of metal-loaded clay anion exchangers. Part II: the case of arsenates. *Chemosphere*, 2002/47, 319–324
- [9.] Sahimi, Muhammad and Theodore T. Tsotsis.: Novel Approaches for the Reclamation and Reuse of Power Plant Effluents. California Energy Commission, PIER Energy-Related Environmental Research. CEC-500-2005-125., 2005

Racém (Z)-2,3-epoxibutanol-származékok enzimkatalizált kinetikus rezolválása

Kinetic Resolution of Racemic (Z)-2,3-epoxybutanol Derivatives

FARKAS Ferenc¹, BATTANCS Melinda¹, THURNER Angelika²,
SIMÁNDI Béla³, POPPE László⁴, FAIGL Ferenc²

¹ BME Szerves Kémiai Technológia Tanszék, H-1111 Budapest, Budafoki út 8.

² MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport, H-1111 Budapest, Budafoki út 8.,

³ BME Vegyipari Műveletek Tanszék, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3.,

⁴ BME Szerves Kémia Tanszék, H-1111 Budapest, Szt. Gellért tér 4.

ABSTRACT

A new enzyme catalysed kinetic resolution of cis-4-benzyloxy-2,3-epoxybutanol and cis-4-trityloxy-2,3-epoxybutanol has been reported. In the first case an efficient and scalable separation of the optically active alcohol from its ester derivative has been solved with liquid-liquid and solid-liquid extraction methods using commercial organic solvents and supercritical carbon dioxide. Enantiomeric enrichment of the optically active cis-4-trityloxy-2,3-epoxybutanol acetate was accomplished by selective crystallization of the racemic part of the ester. Optically pure oxiranols have been obtained by the enzyme catalysed hydrolysis of the acetate derivatives, too.

ELŐZMÉNYEK

Az optikailag aktív oxiránok fontos gyógyszeripari intermedierek. Az Andeno-DSM cég például több tonnás méretben hajtja végre a 2-hidroximetiloxirán rezolválását [1]. A 2,3-diszubsztituált oxiránok fémorganikus vegyületek által indukált sztereoselektív átrendeződési reakcióival optikailag aktív alkohol-, oxetán- és *cisz*-but-2-én-1,4-diol-származékokat állíthatunk elő [2-4]. Ezek a vegyületek olyan biológiailag aktív vegyületek szintézisének kiinduló anyagai lehetnek, mint az Oxetanocin A [5]. Optikailag aktív oxiránokat többféle módon állítottak már elő, ezek közül az egyik legismertebb a Sharpless oxidáció, mikor allil-alkoholokat oxidálnak *terc*-butil-hidroperoxiddal, titán-izopropoxid és királis katalizátor jelenlétében [6]. Egy korábbi közleményünkben beszámoltunk két, amino-csoportot tartalmazó oxirano-éter diasztereomer sóképzéses rezolválásáról. A módszer hátránya, hogy minden amino-oxirán-származék rezolválására új eljárást kell kidolgozni. A probléma megoldása a (Z)-4-benziloxi-2,3-epoxibutanol (**1**) optikai izomerjeinek szétválasztása lehet, ugyanis az enantiomertiszta **1**-vegyületből előállíthatunk számos optikailag aktív oxiranil-étert. Azt tapasztaltuk azonban, hogy a kutatócsoport számára szükséges (Z)-1-benziloxi-4-trifenilmetoxi-2,3-epoxibután (**2**) az **1** alkohol tritilezésével nem állítható elő, valószínűleg a tritilcsoport nagy térkitöltése miatt. A fordított sorrendű reakció, vagyis a *cisz*-2-butén-1,4-diol monotritilezését követő epoxidálás, és a kapott (Z)-4-tritiloxi-2,3-epoxibutanol (**3**) benzilezése jó hozammal szolgáltatja a **2** vegyületet. Emiatt célul tűztük ki mind a racém **1**, mind pedig a racém **2** alkohol enzimkatalizált szelektív észteressítéssel történő rezolválásának vizsgálatát.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A racém **1**-alkoholt irodalomból ismert úton állítottuk elő a kereskedelemben kapható *cisz*-2-butén-1,4-diolból kiindulva nátrium-hidrides monoalkoholát-képzést követő benzilbromidos reakcióval, majd *meta*-klórperbenzoesavas oxidációval. A megfelelő szelektivitású enzim kiválasztásához modellkísérleteket hajtottunk végre. A következő enzimeket teszteltük 20 mg-os reakciókban: *Amano lipázok* (AK, AZ, F, M, PS és R), *Novozym 435*, *Lipase IM 20*, *Lipase TL IM*, *porcine liver észteráz*, *Candida rugosa lipáz*, *Pseudomas fluorescens lipáz*, *α -kimotripszin*, *papain*, *Candida cylindraceae lipáz* és *porcine pancreatic lipáz*. Acilező ágensként vinil acetátot használtunk hexán oldószerben. Királis állófázisú kolonnán végzett gázkromatográfiás vizsgálattal követtük a reakciókat. A **2a** acetát termelésének és a maradék **1** alkohol ee értékeinek összehason-

4b észtert. Ezért, az enzim kiszűrését követően a szűrletbe különböző szilárd hordozóanyagokat (Szilikagél, Celit, Perfil, Florisil) szuszpendáltunk és az oldószert lepároltuk, majd a szilárd maradékot hexánnal kevertük és újra szűrtük. A **4b** propionátot a hexános szűrletből nyertük ki, az **1** alkoholt a szilárd fázisról mostuk le diklórmetánnal. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Ebből látható, hogy szilikagél hordozó esetén 69%-os termeléssel kapjuk meg a tiszta **4b** propionátot, celit hordozó alkalmazásakor pedig 55% termeléssel nyerhetjük az ugyancsak tiszta **1** alkoholt.

1. táblázat

A hexános és diklórmetános oldat összetétele szilárd-folyadék extrakció esetén

Hordozó (1g)		Perfil	Florisil	Celit	Szilikagél
Kiindulási elegy	1 (g)	0,1900	0,1900	0,1900	0,1900
	4b (g)	0,3100	0,3100	0,3100	0,3100
Hexános oldat	1 (g)	0,0662	0,0482	0,0687	0,2131
	4b (g)	0,2638	0,2418	0,2954	----
Diklórmetános oldat	1 (g)	0,1187	0,1057	0,1041	0,0754
	4b (g)	0,0313	0,0143	----	0,0780

Közismert, hogy a szuperkritikus szén-dioxid a hexánhoz hasonló oldóképességű apoláris oldószert, így az észtereket (**4a-c**) szuperkritikus extrakcióval is ki lehet nyerni. A módszert először **1** és **4a** szétválasztására próbáltuk ki 39 °C-on és különböző nyomásokon (90 bar, 160 bar), de az elválasztás nem volt kellő hatékonyságú. Sokkal jobb eredmény értünk el amikor acetát helyett propionátot alkalmaztunk, ugyanis az acilcsoport szénláncának növelésével nő a polaritáskülönbség az alkohol és az észter között. Az enzimatis reakcióból származó, **1** és **4b** keverékét tartalmazó reakcióelegyet szilikagélre pároltuk, majd extraktor csöbe töltöttük és szuperkritikus szén-dioxiddal 33 °C-on, 100 bar nyomáson extraháltuk. A szilárd fázist metanollal extrahálva kaptuk meg az alkoholt. Mind az **1** alkoholt, mind a **4b** észtert jó hozammal és jó enantioselektivitással nyertük ki (2. táblázat). Megjegyzendő, hogy szuperkritikus széndioxidban végzett enzimatis reakciók ismertek az irodalomból, de az általunk kidolgozott elválasztási módszer az első példa arra, hogy a reszolválás eredményeként kapott alkohol/észter keverékét szuperkritikus állapotú széndioxiddal választjuk szét.

2. táblázat

*Az **1** alkohol és **4b** észter szétválasztása szuperkritikus extrakcióval*

	Kiindulási keverék	I. Extraktum (CO ₂)	II. Extraktum (CO ₂)	Maradék (MeOH)
Tömeg (g)	2,13	1,01	0,17	0,81
Alkohol 1 (%)	38	7	17	97
Propionát 4b (%)	62	93	83	3

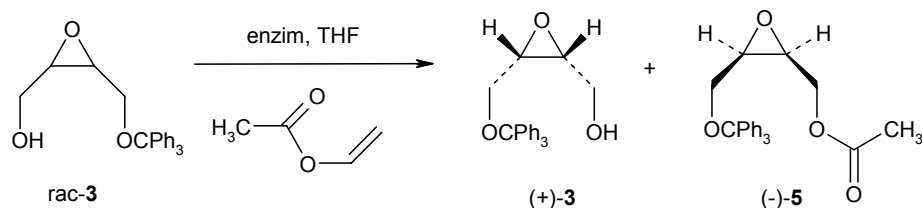
A racém **3** epoxialkohol előállítása hasonló az előzőhöz, azzal a különbséggel, hogy itt a nátriumhidrides sóképzés után tritilkloriddal reagáltattuk az alkoholátot. A **3** alkohol enantiomerjeinek elválasztására legmegfelelőbb enzim kiválasztása céljából ugyancsak tesztreakciókat hajtottunk végre az **1** esetben is vizsgált lipáz enzimekkel. Ebben az esetben tetrahydrofuranban vinil-acetátot alkalmaztunk acilezőszerként és a reakciótermékeket (**3**, **5**) királis állófázisú HPLC-vel analizáltuk. A legjobb eredményeket a *Lipozim TL IM* és *Amano Lipáz PS* enzimekkel értük el. Preparatív méretben először a *Lipozim TL IM* enzimet próbáltuk ki, optimális oldószernek a tetrahydrofuran és vinil-acetát 2 : 1 arányú elegye bizonyult (3. táblázat).

3. táblázat

*A **3** alkohol észtersítése Lipozim TL IM enzim jelenlétében*

idő (óra)	5 észter (mol%)	3 alkohol (mol%)	3 alkohol ee (%)
5	48	52	66
7	51	49	80
18	75	25	100

A táblázatból látható, hogy akkor érünk el jó enantioszelektivitást, ha az alkohol több mint 50%-át észtereszítjük. Az Amano Lipáz PS használata esetén hasonló körülmények között jobb enantioszelektivitást érünk el, 24 óra reakcióidő után 51%-os konverzióval képződött az **5** acetát, míg a reagálatlan alkohol enantiomertisztasága ee 93% volt.



3. ábra

A (Z)-4-tritiloxi-2,3-epoxibutanol (**3**) enzimkatalizált kinetikus rezolválása

A **3** alkoholt és az **5** acetátot oszlopkromatográfiával választottuk szét, a szuperkritikus extrakció itt nem vezetett eredményre. Lipozim TL IM enzim használatakor a (-)-**5** acetát enantiomertisztasága (ee) 80% volt, ezért átkristályosítással próbáltunk enantiomerdúsulást elérni. Megállapítottuk, hogy az etanolból kiszűrt kristály csaknem racém, míg a szűrletben gyakorlatilag enantiomertiszta (-)-**5** maradt (ee > 99%). Az **5** acetát erős racemátképző hajlamát a racém (op.: 121-122 °C) és az optikailag tiszta (op.: 39-41 °C) formák közötti jelentős olvadáspont-különbség is jelzi.

Az optikailag tiszta (-)-**3** alkoholt a (-)-**5** észter enzimkatalizált hidrolízisével állítottuk elő, ugyanis a báziskatalizált hidrolízisnél az oxirángyűrű felnyílhat. Az optimalizálás során kiderült, hogy Amano Lipáz PS enzim jelenlétében, acetonitril és foszfát-puffer keverékében a hidrolízis sebessége függ a lipáz/észter aránytól, és a hőmérséklettől is (4. táblázat).

4. táblázat

A (-)-**5** észter hidrolízise különböző mennyiségű Amano Lipase PS jelenlétében

Amano Lipase PS/(-)- 5 [mol/mol]	Reakció idő [nap]	Hőmérséklet [°C]	Termelés (-)- 3 [%]	(-)- 3 ee [%]
0.9	8	23-25	71.4 ^a (56) ^b	100
1.7	5	23-25	91.2 ^a (68) ^b	100
0.9	5	35-40	93.2 ^a (77) ^b	100

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatásokat az OTKA támogatásával, a CNR (Firenze)-MTA kétoldalú együttműködés keretében végeztük (OTKA projektek száma: T 048362 és T 42805).

IRODALOMI HIVATKOZÁSOK

- [1] W.E. Ladner, G.M. Whitesides: *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7250 (1984).
- [2] A. Mordini, S. Bindi, S. Pecchi, A. Degl'Innocenti, G. Reginato, A. Serci: *J. Org. Chem.*, **61**, 4374 (1996).
- [3] A. Thurner, F. Faigl, L. Tőke, A. Mordini, M. Vallachi, G. Reginato, G. Czira: *Tetrahedron*, **57**, 8173.(2001)
- [4] A. Thurner,; F. Faigl,; A. Mordini,; A. Bigi,; G. Reginato,;L. Tőke, *Tetrahedron*, **54**, 11597 (1998).
- [5] D.M. Huryn, M. Okabe: *Chemical Reviews*, **92** (8), 1745 (1992).
- [6] Y. Gao, R.M. Hanson, J.M. Klunder, S.Y. Ko, H. Masamune, K.B. Sharpless: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5765 (1987).
- [7] F. Faigl, A. Thurner, G. Tárkányi, J. Kovári, A. Mordini: *Tetrahedron: Asymetry*, **13**, 59 (2002).

Új, optikailag aktív 1-(szubsztituált aril)pirrol-2-karbonsavak szintézise

Synthesis of New, Optical Active 1-(substituted aryl)pyrrole-2-carboxylic Acids

FELDHOFFERNÉ VAS Bernadett Éva¹, THURNER Angelika², CZUGLER Mátyás³,
TÁRKÁNYI Gábor³, FAIGL Ferenc^{1,2}

¹ BME Szerves Kémiai Technológia Tanszék, H-1111 Budapest, Budafoki út 8,

² MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport, H-1111 Budapest, Budafoki út 8,

³ MTA Kémiai Kutatóközpont H-1025 Budapest, Pusztaszeri út 59-67.

ABSTRACT

Novel, efficient synthesis and optical resolution of 1-(2-ethyl-6-carboxymethylphenyl)pyrrole-2-carboxylic acid and 1-(2-phenyl-6-carboxyphenyl)pyrrole-2-carboxylic acid has been developed. The prepared optically active carboxylic acids are new members of 1-arylpyrrole type atropisomers. Steric arrangements of these compounds were monitored by single crystal X-ray diffraction measurements.

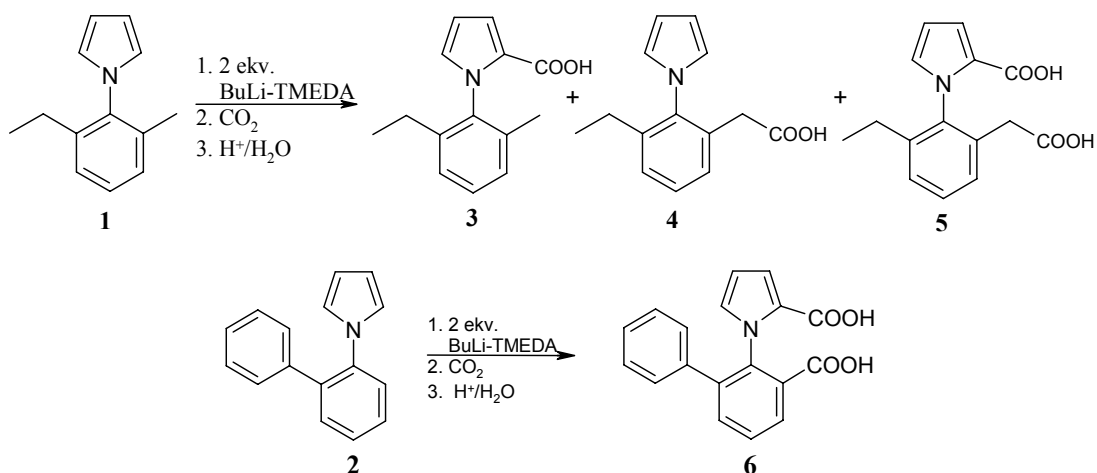
ELŐZMÉNYEK

A királis ligandumként alkalmazható, C₁ szimmetriával rendelkező, gátolt rotációjú 1-[2-karboxi-6-(trifluormetil)fenil]pirrol-2-karbonsavat hat évvel ezelőtt állította elő kutatócsoportunk [1]. Az optikailag aktív dikarbonsavból kapott félészter-félamid származék hidrides redukciója során azonban a trifluormetil-csoporton részleges defluorozódás történt. Ezért a továbbiakban olyan 1-fenilpirrolokat választottunk ki kutatásra, amelyek ütöző csoportként alkil- és/vagy aril-szubsztituenseket tartalmaznak. A korábbiakban már vizsgáltunk az 1-(2-metilfenil)pirrol [2] és 1-(2-etilfenil)pirrol metallálási lehetőségeit. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a dilítálásra a kétfogó N,N,N',N'-tetrametil-dietilén-triaminnal (TMEDA) aktivált butil-lítium (BuLi) a legalkalmasabb. Ezeknek a vegyületeknek a dikarbonsav származékainál azonban nem tapasztaltunk optikai aktivitást. Ezért a továbbiakban a fenil gyűrű *orto* helyzetében nagyobb térkitöltésű szubsztituenseket tartalmazó modellvegyületeket vizsgáltunk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az 1-(2-etil-6-metilfenil)pirrolt (**1**) és az 1-[(1,1'-bifenil)-2-il]pirrolt (**2**) az irodalomból ismert módon, a megfelelő anilin származékból és *cisz,transz*-2,5-dimetoxi-tetrahidrofuranból állítottuk elő, jégecetben (oldószer és katalizátor egyben) forralva [3]. A kapott termékeket vákuumdesztillációval tisztítottuk. Vizsgáltuk **1** és **2** vegyület dimetallálási reakcióit. Bázisként minden alkalommal N,N,N',N'-tetrametil-dietilén-triaminnal aktivált butil-lítiumot használtunk, abszolútizált éter oldószerben. A kísérletek során a reakcióidőt és a hőmérsékletet változtattuk. A metallálás után a lítium vegyületeket szén-dioxiddal stabil karbonsavvá alakítottuk és ¹H-NMR spektrumuk alapján azonosítottuk.

Az 1-(2-etil-6-metilfenil)pirrol esetében az elektonküldő alkil csoportok dezaktiváló hatása miatt 0°C-on még 4 órás reakcióidő alkalmazásával is csak közepes termelést tudtunk elérni. A hőmérséklet emelésének hatására viszont csökkent a monometallált termékek mennyisége és nőtt a hozam is. A **3** és **4** karbonsavak lítium intermedierjei nem melléktermékek, ugyanis egy újabb metalláló ágenssel találkozáskor a másik pozícióban is lejátszódik a fém-hidrogén csere ami **5** termék keletkezéséhez vezet. Az 1-(2-etil-6-metilfenil)pirrol-2-karbonsav (**3**) kis mennyisége azt mutatja, hogy ha a lítium először a pirrol gyűrű α hidrogénjét cseréli le a második metallálási lépés szinte azonnal lejátszódik, míg benzil helyzetű monolítálás esetén a második lépés lassabb.



1. ábra

Az 1-(2-etil-6-metilfenil)pirrol (1) és az 1-[(1,1'-bifenil)-2-il]pirrol (2) dimetallálása.

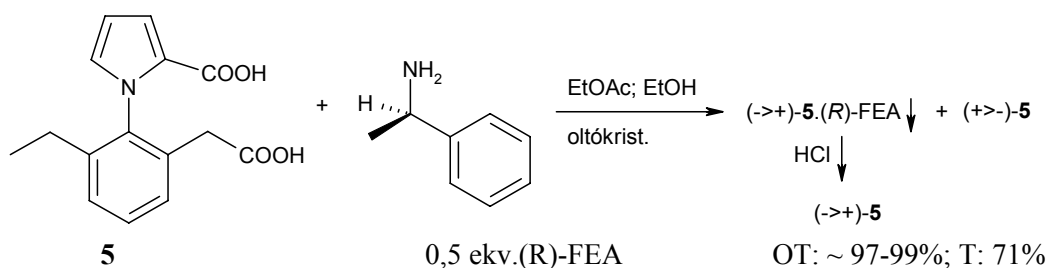
Az 1 és 2 vegyületek dimetallálásának körülményei és eredményei.

1. táblázat

Körülmények	Modellvegyület	Termék (arány ^a)	Hozam ^b
Et ₂ O, 0°C, 2h	1	3+4+5 (3:35:62)	19 %
Et ₂ O, 0°C, 4h	1	4+5 (23:77)	49 %
Et ₂ O, 22°C, 2h	1	3+4+5 (1:6:93)	77 %
Et ₂ O, 23°C, 3h	1	3+4+5 (1:7:92)	80 %
Et ₂ O, 20°C, 4h	2	6 (100)	84 %
Et ₂ O; 24°C, 4h	2	6 (100)	94%

Az 1-[(1,1'-bifenil)-2-il]pirrol (2) reakcióját a fenil gyűrű mezomer effektusa lassíthatja, ezért szoba-hőmérsékleten 4 órán át kevertettük a vegyületet a bázissal, így egyedüli termékként kaptuk a 1-[(1,1'-bifenil)-2-il-6-karboxi]pirrol-2-karbonsavat (6). Ez az eredmény egybevág a monometallálási kísérleti tapasztalatokkal, ugyanis 1 pirrolszármazék vizsgálata során a reagensek minden alkalommal a benzil-helyzetet részesítették előnyben, így 3 származék nem vagy csak minor komponensként jelent meg a termékelegyen. Ezzel szemben 2 reakciónál a reagensek mindig a pirrol gyűrű α hidrogénjét preferálták és a második metallálási lépés gyors.

Az 5 vegyület reszolválását 40x mennyiségű etilacetát és 0,1x etanol oldószerkeletben hajtottuk végre fél ekvivalensnyi mennyiségű (R)-feniletilaminnal ((R)-FEA, 2. ábra)



2. ábra

Az 1-(2-etil-6-karboximetilfenil)pirrol-2-karbonsav reszolválása.

A sókiválás megindításához szükség volt oltókristály hozzáadására, az így kivált diasztereomer só tiszta sósavval bontottuk el. A módszer kidolgozása során azt tapasztaltuk, hogy etanol hozzáadása nélkül racém kristály válik ki, ha viszont több alkoholt használunk, a kivált só optikai tisztasága romlik.

Nitrát szennyezés eloszlása a Nyárad vízgyűjtőjében

Distribution of the Nitrate Pollution in the Niraj River Catchments Area

HAJDU Zoltán, MSc, Dipl. Eng., drd.,
Dr. FÜLEKY György, professzor

Szent István Egyetem Gödöllő, 2103 Gödöllő Páter Károly utca 1
Tel: 36 28 810200/1817, Fax: 36 28 810804
e-mail: Fuleky.Gyorgy@mkk.szie.hu, zhajdu@rdslink.ro
web: www.szie.hu

ABSTRACT

The pollution of the groundwater with nitrate is an important problem in whole Europe, as well in Romania. In the Niraj River catchments area the groundwater is polluted with nitrate by agriculture and by the untreated waste water from the households. The distribution of the nitrate pollution of the groundwater depends on the location of the pollution sources, on the geographical situation and on the level of the groundwater.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A talajvíz és a felszíni vizek nitráttal történő szennyezését tanulmányozni egy adott vízgyűjtő területén igen komplex feladat, mivel nagyon sok szempontot kell figyelembe vennünk és a nitrátszennyezés eredetét szükséges tanulmányozni. Jelenleg a vizek nitráttal történő szennyezésének két főbb formáját azonosíthatjuk, egyrészt a mezőgazdaság (főleg állattartás illetve a mezőgazdasági területek trágyázása, műtrágyázása) másrészt a háztartásokból származó tisztítatlan szennyvíz okozza a talajvíz és a felszíni vizek nitráttal történő szennyeződését. A talajban lejátszódó átalakulási és transzport folyamatokban (így a nitrogén transzport és átalakulási folyamatokban is) legnagyobb szerepe a talaj felső, humuszban és élőszervezetekben gazdag rétegének van. A talaj humuszos rétegére jellemző, hogy éves ciklusban a nedvességtartalma változó, ezáltal a vízmozgás is különböző irányú lehet. Normál talajok esetében telített állapot is előfordulhat hosszabb-rövidebb ideig (pl. belvíz), de az a jellemző, hogy az év döntő többségében a felső rétegük telítetlen. A humuszos réteg gazdag szerves és szervesetlen talajalkotókban és élőszervezetekben, amelyek mindegyike részt vesz az e talajrétegben zajló tápelemforgalomban. A mezőgazdasági termeléshez kapcsolódó nitrogén körforgalomban veszteség jelentkezik a betakarítás, a kimosódás, az erózió és a denitrifikáció révén. A nitrogén körforgalommal kapcsolatban két fontos tényezőt külön is ki kell emelnünk:

- a talajban a biokémiai és biológiai folyamatok még műtrágyázás esetében is jelentősen befolyásolják az ásványi formában lévő nitrogén mennyiségét
- kimosódás jelentős mértékben csak a nitrát formában lévő nitrogént érinti, bár friss szerves-, ill. hígtrágyázást követően, valamint rövid idejű, nagy intenzitású csapadékot követően kis molekulájú szerves nitrogénvegyületek is kimosódhatnak. A trágyázás hatására nő a talajok ásványi nitrogén, különösen a nitrát nitrogén tartalma. A nitrogén trágya adagok megállapításánál ezt hosszú ideig nem vették figyelembe. Így adott körülmények között e többlet nitrát a talaj mélyebb rétegeibe, a gyökérszóna alá mosódva, a talajvizet elérve, azt szennyezheti. A talajvíz szempontjából legfontosabb nitrogén vegyület a telítetlen zónában nitrát. A nitrátok legnagyobb része oldott állapotban van, mivel sói - egy speciális uránsó kivételével- jól oldódnak. A negatív töltésű nitrátió adszorbeálódni sem tud a főleg szintén negatív töltésű talajkolloidok felületén. A nitrát jellemzője a negatív adszorbción, ami azt jelenti, hogy nitrátadagolás után a talaj vizes kivonatában több nitrát mérhető, mint amennyi az eredeti talaj kivonatában mért és a hozzáadott nitrát összege volt. Az utóbbi években egyre több információ van arról, hogy adott környezeti feltételek mellett a nitrát is képes felhalmozódni a talaj mélyebb rétegeiben. A talajba az emberi tevékenység révén nagy mennyiségű szerves anyag kerül és a talaj szerves anyagának mineralizációja –más nitrogénátalakulási folyamatokhoz viszonyítva lassú. Egy vegetációs periódus alatt –környezeti feltételektől függően –

a szerves anyag 1-3 %-a képes mineralizálódni (STEFANOVITS, 1975). A keletkezett ammóniumot a növények közvetlenül fel tudják venni, vagy ismét beépül a mikroorganizmusok testébe, illetve nitríté, majd nitráttá oxidálódik. Az ammónium másik része adszorbeálódik illetve az agyag-ásványok kristályrácsába épül. A nitrát kimosódik és a kimosódást tekinthetjük a legkárosabb nitrogénvesztességnek mivel nagyrésze ennek a veszteségnek egyenesen a vízrendszerbe jut. Egyes szerzők véleménye szerint (JORGEN F.HANSEN, 1982) a nitrogén kimosódás mértéke a talaj típusától, az illető területen termesztett növényfajtauktól, illetve az alkalmazott nitrogén mennyiségétől függ, IGNAZI (1987) a nitrátszennyeződés okai között említi azt az állapotot, amikor a területre az evaporációt és az evapotranszpirációt jelentősen meghaladó vízmennyiség érkezik és azt amikor tavasszal vagy nyár végén a növényi fedettség hiányában nagy a mineralizáció. Tartamkísérletek során kimutatták (FÜLEKY, 2004), hogy az egyre nagyobb műtrágya adagolás esetén 3 m-nél nagyobb mélységben is jelentős nitrát felhalmozódás található amelynek oka az is, hogy a növekvő műtrágyaadagoknál a növények egyre inkább a műtrágyából származó nitrogént veszik fel és a talaj szerves anyagából ásványosodó nitrát nagyrésze szabadon mozdulhat el a lefele mozgó csapadékvízzel. Kisebb folyók vízgyűjtő területén végzett kutatások (DUGAST, 1998) kimutatták, hogy a felszíni vizekbe jutó nitrát mennyisége függ a csapadék mennyiségétől, a mezőgazdasági gyakorlattól és a táj szerkezetétől, a puffer zónák jelentős mértékben csökkentik a nitrát kimosódást.

2. A VIZSGÁLT TERÜLET JELLEMZÉSE

A Nyárad a Maros baloldali mellékfolyója, forrása 1300 m-en a vulkánikus eredetű Görgényi havasokban található, hossza 79 km, Nyárádtőnél, 300 m-en, torkollik a Marosba. A Nyárad vízgyűjtőjének területe 625 km², 63 település található rajta, ezzel tradicionálisan Erdély egyik legsűrűbben lakott területének számít. A terület kontinentális klímájú, az átlaghőmérséklet 8,5 C, az évi csapadék 700-1200 mm, jelentős különbség mutatkozik a hegyvidéki felső szakasz (a forrás 1300 m-en található) és az alsó szakasz (torkolat 300 m) között. Ugyanez a jelenség megfigyelhető az evapotranszpiráció esetében is amely 600-450 mm között változik (alsó-felső szakasz). A Nyárad völgye a középső és alsó szakaszon kb. 2 km széles ami az átlagos vízhozamot figyelembe véve (3,6 m³/s) szokatlanul szélesnek számít. A völgy asszimétrikus jellegű, a folyó a völgy jobb oldalán helyezkedik el. A vízgyűjtőre jellemző, hogy hóolvadás, vagy áradások esetén a vízhozam jóval meghaladja a sokéves átlagot (a maximális mért hozam 330 m³/s, 1970 május 14-én). A Nyárad vízgyűjtő területén a téves vízgazdálkodás, a mezőgazdasági tevékenység, valamint a sűrű településszerkezet a talajvíz nagymértékű elszennyeződéséhez vezetett, ami több methemoglobinemia általi csecsemőhalálozást okozott. A talajvíz nitráttal történő szennyeződésének felmérése a vízgyűjtő területén levő kutakban indokolt, mivel a lakosság ivóvízellátását a kútak biztosítják. A nitrát eloszlása nem egyenletes a vízgyűjtő területén, hanem nagymértékben függ számos tényezőtől ezért indokolt módszeresen kutatni a nitrátszennyezés eloszlását a Nyárad vízgyűjtőjében és azokat a tényezőket amelyek befolyásolják a nitrátszennyezés eloszlását. Indokolt megvizsgálni hogy mintaterületen a talajvíz nitrátszennyeződését milyen mértékben okozza a mezőgazdasági tevékenység és milyen mértékben származik ez a szennyezés a települések szennyvizéből.

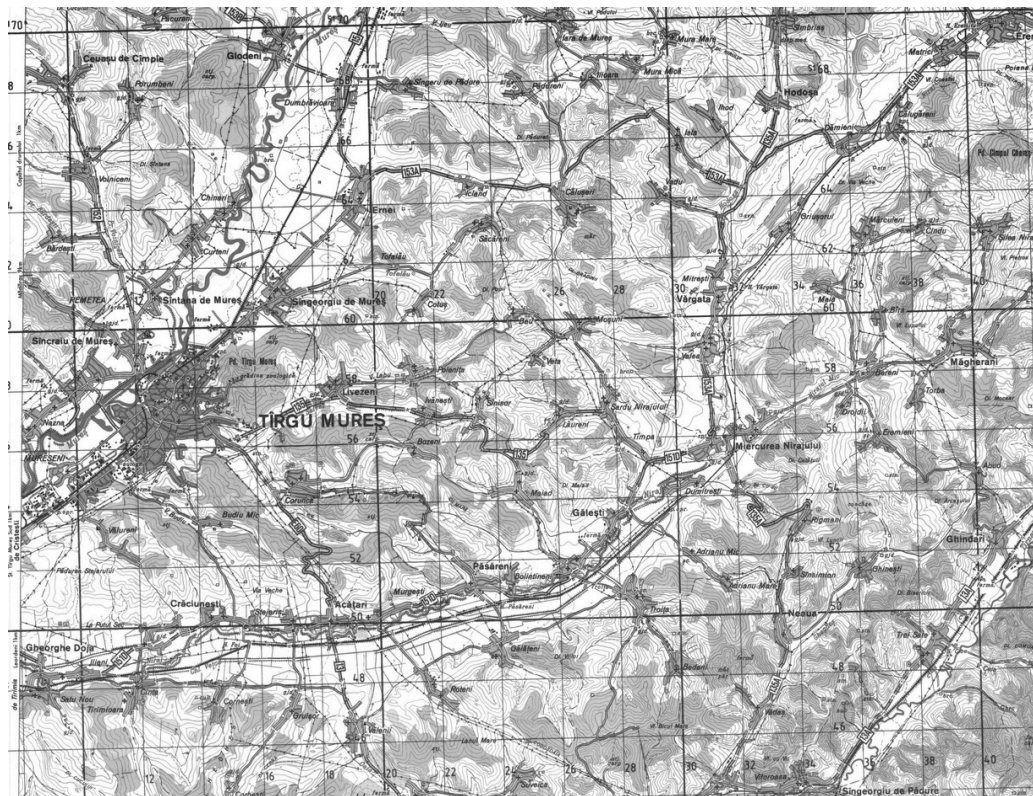
3. A KUTATÁS MÓDSZERTANA

A mintákat a Nyárad vízgyűjtő területén, a fő völgyben illetve a mellékvölgyekben elhelyezkedő települések kútjaiból, valamint a településen átfolyó patakból a (települések előtt és után) vettük.

A mintavétel minden esetben 50 ml-es polietilén flakonokban történt, kutakból, illetve felszíni vizekből.

A nitrát koncentrációt minden esetben a Közegészségügyi Intézet laboratóriumában határoztuk meg, spektrofotometriás módszerrel, 2,4 dimetilfenolt használva (SR ISO 7890-1)

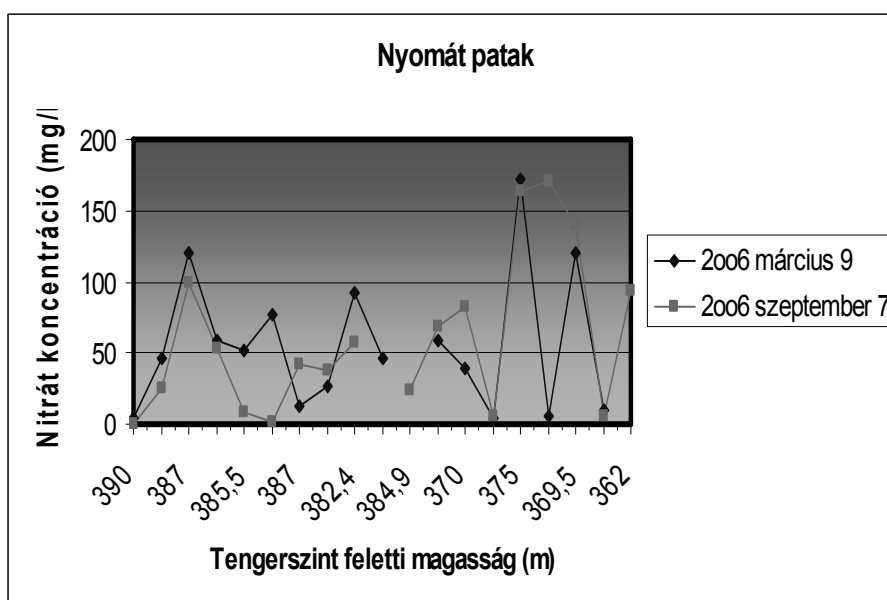
A talajvíz tengerszint feletti magasságát Garmin márkájú GPS-el határoztuk meg.



1. ábra
A Nyárád vízgyűjtő területe

4. EREDMÉNYEK

Két mérésorozatot végeztünk a Nyomát patak völgyében, az első mérésorozatot a tavasi hóolvadás idején márciusban, a következő mérésorozatot szeptemberben, több hétig tartó szárazság után. Az első mérésorozat esetében magas, míg a második mérésorozat esetében alacsony talajvízszintet tapasztaltunk. A végzett mérések esetében vízmintát vettünk a Nyomát patakából a település előtt és a település után és azt tapasztaltuk, hogy a márciusban vett minta esetében a patakvíz nitrát tartalma hatszor magasabb értéket mutatott, mint a szeptemberben vett minta esetében, ez a mezőgazdasági területekről a tavasi hólével bemosódó nagyobb nitrát mennyiséggel magyarázható. A település alatt mért nitrát érték márciusban háromszor, míg szeptemberben harminchatszor volt nagyobb a település felett mért nitrát értéknél. Meghatároztuk a kutakban található vízfel-szín tengerszint feletti magasságát és meghatároztuk a potenciális szennyező forrásokat, amelyek magyarázatot adhatnak a szennyeződésre. Az első és az utolsó mérési pont között 28 m volt a szintkülömbőség. A mérési területen két terasz található.



2. ábra

A nitrát koncentráció változása Nyomát patak mentén található kutakban

A méréseket ábrázoló grafikont követve a következő következtetést vonhatjuk le:

A kutak nitrátszennyezése tavasszal, magas talajvízszint esetén nagyobb értéket mutat, mint a szeptemberben, alacsony talajvízszint esetén, és a két mérésorozatot ábrázoló görbe követi egymást. A nitrátszennyeződés magasabb értéket mutat a teraszokon, mint a meredek szakaszon, tehát azt tapasztalhatjuk, hogy a teraszokon felhalmozódik a nitrát. Az ötödik mérési pont talajvizet összegyűjtő halastó, amelyben sokkal magasabb nitrát értéket találunk tavasszal, mint ősszel, a felszíni bemosódások következtében. A hatodik mérési pont esetében a kút alatt istálló található és a magas talajvízszint következtében a kútba jut az istállóból kimosódott nitrát. A szeptemberi mérések esetében mindkét esetben alacsony és egymáshoz közelálló nitrát értéket mértünk. A hetes és nyolcas mérési pontok esetében a tavaszi mérések kisebb nitrát értéket mutatnak, mivel ezek a mérési pontok a meredek szakaszon helyezkednek el ahol nagyobb talajvíz mennyiség esetében jelentősebb hígítással számolhatunk. A tizenötödik minta esetében a kút a patak mellett helyezkedik el és tavasszal magas vízállás esetén a talajvíz kapcsolatban van a patak vizével így ebben az esetben a kútvíz nitráttartalma alacsony, míg szeptemberben, amikor a patak szinte teljesen kiszárad a kút vize az azonos szinten levő kutakhoz hasonlóan magas nitrátszennyezettséget mutat. A Nyomát patak völgyének tanulmányozása mellett a Nyárád több mellékvölgyében végeztünk vizsgálatokat. Ezekben az esetekben is a mérési módszer azonos volt a Nyomát patak völgyében végzett vizsgálatokéval, viszont a kutak vízszintjének tengerszint feletti magasságát még nem tudtuk megmérni. Az eredmények értelmezhetősége érdekében a következő táblázatban a mérések eredményeit hegy-völgy irányban mutatjuk be, vagyis az első minta a völgy legmagasabb pontjáról származik, míg az utolsó a völgy legalacsonyabb pontjától.

Nitrát koncentráció a Nyárád vízgyűjtőjében vett mintákban

1. táblázat

Mintavétel helye	NO ₃ c	1	2	3	4	5	6	7	8
Hodos patak	mg/l	20.16	14.16	83.68	37.44	50.56	20.00	49.52	34.00
Iszló patak	mg/l	7.52	2.72	46.00	34.00	14.88	34.24	50.72	13.28
Seprőd patak	mg/l	6.08	40.08	16.96	143.20	8.00	0.20		
Szentimrei patak	mg/l	7.44	34.08	10.24	42.00	10.72	10.88		
Bő patak	mg/l	28.72	3.04	95.60	1.60	118.60	8.96	7.36	68.96
Sárdi patak	mg/l	7.52	17.20	182.90	4.24	98.80	105.40	11.60	7.20
Kisgörgényi patak	mg/l	6,02	74,06	16,38	5,21	17,92	41,44	36,74	17,78
Szentháromsági patak	mg/l	3,38	2,28	25,64	4,34	9,33			

Mintavétel helye	NO ₃ c	9	10	11	12	13	14	15	16
Hodos patak	mg/l	17.76	4.96	10.64	103.00	9.36	21.12	74.56	4.76
Iszló patak	mg/l	153.90	112.10	17.68	84.32	84.32	12.48		
Seprőd patak	mg/l								
Szentimrei patak	mg/l								
Bő patak	mg/l								
Sárdi patak	mg/l	2.48	17.16	25.60	158.20				
Kisgörgényi patak	mg/l	15,28	0,00						
Szentháromsági patak	mg/l								

A Nyárad vízgyűjtőjében található és vizsgálatunknak alávetett többi mellékpatak esetében is a Nyomát patakhhoz hasonló helyzetet találunk. Azon mellékpatakok esetében ahol teraszokat találunk, (Hodos patak, Iszló patak) kimutatható a teraszokon a nagyobb nitrátkoncentráció. Azon mellékpatakok esetében ahol nincs jelentős gazdasági tevékenység nem találunk jelentős nitrát szennyezettséget csak kivételes pontszerű szennyezést (Seprőd patak, Szentimrei patak). A felszíni vizek esetében azt tapasztalhatjuk, hogy a településeken átfolyó patakoknak esetében létezik bizonyos nitrát terhelés, ez azonban nem annyira jelentős mint a talajvíz nitrát terhelése.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A Nyárad vízgyűjtő területén végzett felmérések azt igazolják, hogy közvetlen kapcsolat mutatkozik a talajvíz nitrát szennyezése és helyi szennyező források, a domborzati viszonyok és a talajvízszint között. Azt tapasztalhatjuk, hogy a tanulmányozott területen a talajvíz nitrát szennyezése bizonyos esetekben jelentős. A nitrátszennyezés eloszlása nem egyenletes a települések alatt elhelyezkedő talajvízrétegben és a potenciális nitrátszennyezésre vonatkozó következtetéseket, csak a talajvízszint, az aktuális és történelmi szennyező források, a domborzati formák valamint a talajszerkezet együttes figyelembe vételével vonhatunk le.

IRODALOM

- [1.] PRÉM Krisztina, FÜLEKY György, Hazai tartamkísérletekből levonható következtetések, „Az EU-s nitrát direktíva”, Környezetkímélő Agrokémiáért Alapítvány, 2004, p 43-49
- [2.] NÉMETH Tamás, Talajaink szervesanyag-tartalma és nitrogénforgalma, MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest, 1996
- [3.] J.C.GERMON, Management systems to reduce impact of nitrates, Elsevier Applied Science, London and New York, 1993
- [4.] DUGAST Philippe, Reducing nitrate losses through a large scale catchment field experiment, IFA Agricultural-Conference on Managing Plant Nutrition, Barcelona, 1999

Csomagolóanyagok környezeti hatásvizsgálata

The Environmental Effects of Plastic Packaging Materials

HORVÁTH Anikó¹, STIPTA József²

¹Nyugat-Magyarországi Egyetem, 9400. Sopron, Bajcsy-Zsilinszky u. 4. Magyarország

²INNO-NATURA Környezetvédelmi és Innovációs Közhasznú Társaság,

9471. Nemeskér, Fő u. 18. Magyarország

sjozsi@freemail.hu

ABSTRACT

The environmental effects of plastic packaging materials are analyzed by Life Cycle Assessment (LCA) method. The life cycle of packaging materials could be followed „From Cradle to Grave” by the application of this method. Nowadays this method has developed, today the environmental effects of recycling have also been taken into consideration on „From Cradle to Cradle” theory.

1. A CSOMAGOLÁS HELYZETE MAGYARORSZÁGON

Magyarországon az élelmiszerek előállításával, tárolásával és forgalmazásával együtt változó csomagolási kultúra három, egymástól elhatárolható szakaszra bontható:

- a házi tárolás kora (a XIX. század közepéig);
- az iparosodás időszaka (a XX. század közepéig);
- a tömeges használat, a mindent becsomagolás időszaka (napjaink).

A csomagolásoknak hagyományosan három funkciót kell teljesíteni: az áru szállíthatóságának, tárolhatóságának a biztosítása; az áru minőségének megőrzése és az áru reklámozása, melyek az egyes szakaszokban eltérő hangsúllyal érvényesültek.

A csomagolóeszközök óriási méretű fejlődése a városiasodásra és a fogyasztási szerkezet nagymértékű átalakulására vezethető vissza. A XX. század középső harmadában két szálon futott a csomagolási technológiák története: egyrészt folytatódott a korábban kialakult csomagolási rendszerek (üveg, konzervdoboz, papír) kiteljesedése és térhódítása, másrészt a vegyipar óriási méretű fejlődése következtében kialakult a műanyag csomagolóeszközök bevezetésének lehetősége.

Napjainkban általános irányzat az újrahasználati és újratöltési rendszerek visszaszorulása. Ez a folyamat az 1988. évtől, a rendszerváltozással bontakozott ki és egyes hullámai összhangban vannak a privatizáció alakulásával. Korábban az újrahasználati rendszereket nem környezetvédelmi, hanem kizárólag gazdasági okokból hozták létre a szocialista hiánygazdaság körülményeire való tekintettel. Napjainkra az újrahasználati rendszerek számos eleme megszűnt vagy arányaiban jelentősen lecsökkent. Helyettük egyutas (egyszer használható, eldobandó) papír-, üveg-, illetve műanyag csomagolások jelentek meg.

2. CSOMAGOLÁSTECHNIKAI FOGALMAK

Amikor a csomagolásról beszélünk, szükséges megkülönböztetni a csomagolóanyagok és a csomagolóeszközök fogalmát. A csomagolóanyag a csomagolásra használt fém, fa, üveg, papír, műanyagfélések összessége; a csomagolóeszközök a csomagolóanyagokból kialakított zárható tasakok, csészék, üreges testek, poharak, dobozok, hordók stb., melyek a csomagolt termékek felhasználását követően hulladékká válnak. [1]

A csomagolóeszköz korlátozott időtartamú felhasználásra szánt termék. A csomagolás alapvető feladata az áru védelme, az áru eljuttatásának megkönnyítése az előállítótól a felhasználóhoz, valamint figyelemkeltő és információközlő szerepe is van. Feladata többnyire megszűnik, amint az áru eljut a végső felhasználóhoz, s általában ekkor hulladékká válik. A háztartásoknál a keletkező települési hulladékok növekvő mennyiségének és a szeméttelpek telítődésének egyik jelentős előidézőjeként joggal említhető a csomagolóipar.

A csomagolások jellegük, a termék életében betöltött szerepük alapján három csoportba sorolhatók:

- szállítási (hordók, ládák, zsákok) és gyűjtőcsomagolások (dobozok, papír- és fóliaburkolatok), amelyeket a szállítás biztonsága érdekében a gyártó és a forgalmazó között használnak;
- fogyasztói csomagolások (poharak, dobozok, palackok), amelyekben a végső felhasználó hazaviszi az árut, és az esetleg felhasználásáig abban is tárolja;
- járulékos csomagolások (fóliák, alátétlapok, díszdobozok), amelyek az önkiszolgáló üzletben való értékesítést segítik vagy reklámot hordoznak.

A csomagolás használatát tekintve lehet eldobható vagy elsősorban a fogyasztási és szállítási csomagolásnál ismételten felhasználható, visszatérő. Szokás ezeket egyutas vagy többutas csomagolásoknak is nevezni.

- *Egyutas (eldobó) csomagolás:* Használat után azonnal a szemétkerébe kerül, így rengeteg nyersanyag, energia, pénz megy veszendőbe, ráadásul a környezetet is terheli (fémdobozos üdítők, műanyagpalackos italok, a fém-műanyag-karton összetételű üdítő- és tejesdobozok /társított csomagolóanyagok/, kiporciózott sajtok, felvágottak csomagolására szolgáló habtálcák, tejfölös-joghurtos műanyagpohárkák stb.).
- *Többutas csomagolás:* Ennek tipikus példája a betétes üveg. Az ital 50-60 alkalommal újratölthető palackban van, majd eloregedése esetén anyagában újrahasznosítható.

3. A CSOMAGOLÁS ÉS A KÖRNYEZET VISZONYA

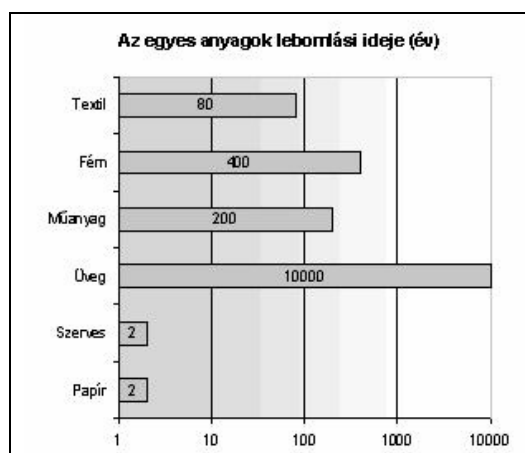
A csomagolás és a környezet viszonyát napjainkban alapvetően a csomagolási hulladék mennyisége és sorsa határozza meg (1. ábra). [2]



1. ábra

A csomagolási hulladékok kezelésének lehetőségei

Minél nagyobb a visszagyűjtött hulladék aránya, és ennek minél nagyobb hányadát viszik vissza az anyagok körforgásába, annál kevésbé terheli a csomagolás a környezetet (2. ábra).



2. ábra

A csomagolóanyagok lebomlási ideje

Az ismételt felhasználás mellett megoldást csak a feleslegessé vált csomagoló anyagok visszagyűjtése és újrahasznosítása hozhat. Ennek három alapvető iránya van:

- energetikai célú hasznosítás, amelynek során a hulladék elégetésével hőt termelnek;
- az ismételt feldolgozás;
- a részleges lebontás után vegyipari alapanyagként való újrahasznosítás.

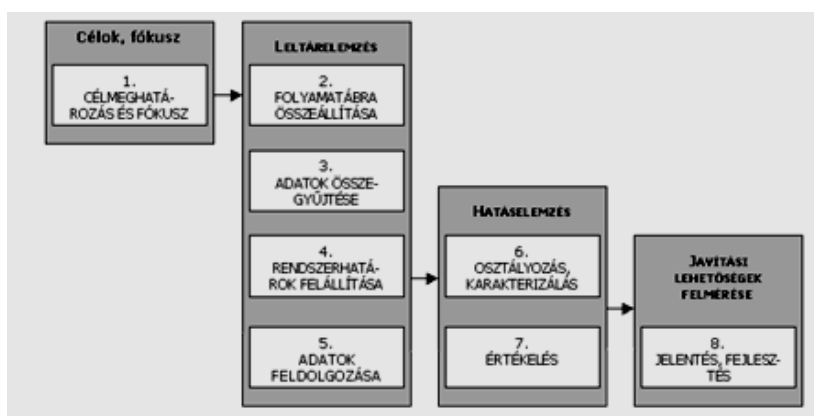
A két utóbbi eljárás azon alapul, hogy a másodlagos hasznosításhoz kevesebb energia szükséges, mint az eredeti nyersanyagokból készülő elsődleges alapanyagok előállításához. [3]

A jövő útja a környezetet legkevésbé terhelő csomagolóanyagok kiválasztása és alkalmazása. A legkedvezőbb csomagolóanyagok kiválasztása az életciklus vizsgálatával történhet. Az életciklus a nyersanyagok kitermelésétől a termék felhasználása után visszamaradó hulladékok végső „sorsáig” terjed. A csomagolóanyagok környezetvédelem oldaláról történő megítélésében a következő szempontokat érvényesíthetjük:

- a csomagolóanyag gyártása a természeti erőforrásokat (pl. energiaforrások, víz, erdő) a lehető legkisebb mértékben vegye igénybe;
- a csomagolóanyag és -eszköz gyártása ne okozzon környezeti terhelést (pl. a műanyagok feldolgozásánál az egészségre ártalmas gázok emissziója, a cellulóz fehérítésénél az elfolyó szulfid-szennylég károsítja a környezetet);
- a csomagolás kialakításánál és a csomagolóanyag megválasztásánál a lehető legtakarékosabb megoldást kövessék;
- a használt csomagolóeszköz legyen ismételtlen felhasználható (öblös konzervüveg), vagy anyagában újra hasznosítható, recikálható (ilyen az „újrapapír”, vagy a PE hulladékból készülő rakodólap, virágtartó);
- ha az újrahasznosítás nem megoldható, a csomagolás anyaga legyen káros emissziók nélkül elégethető (pl. egyes műanyagok) vagy komposztálható (pl. természetes szálas anyagok).

4. AZ LCA-MÓDSZER ALKALMAZÁSA CSOMAGOLÓANYAGOK KÖRNYEZETI HATÁSAINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSÁRA

Az életciklus-elemzés (Life Cycle Assessment, angol rövidítéssel LCA) célja, hogy számszerűsített információt nyújtson a környezetkímélő terméktervezéshez, -fejlesztéshez, -címkezéshez, összehasonlító elemzéshez, vagy vásárlási döntéshez. Alapja a termék életciklusa a nyersanyagok kitermelésétől a hulladékok ártalmatlanításáig, illetve ennek kiválasztott, lényeges elemei. Ezt termék rendszernek nevezzük, lehatárolása az első fő lépés. Ezután következik a teljes anyag- és energiamérlegek felállítása a kiválasztott folyamatokra, majd az információ összesítése és értékelése (3. ábra). Az ISO 14040-es szabványcsalád foglalkozik az életciklus-elemzés részleteivel.



3. ábra
Az életciklus-elemzés lépései

A folyamatábra, valamint az anyag- és energiamérlegek felállítása után néhány lépésben olyan lista készíthető, ami a termék minden értékelt folyamatának összesített be- és kimeneti anyagáramait tartalmazza. A kilogrammban, joule-ban, köbméterben megjelenő mennyiségek (az ISO 14001 szóhasználatával élve: környezeti tényezők) csak akkor összehasonlíthatók egymással, ha azokat átszámítják környezeti problémákká (az

ISO 14001 szóhasználatával élve: környezeti hatásokká). Összesen tíz globális környezeti probléma került meghatározásra, az 1. táblázat szerinti mértékegységekkel. Az egyes vegyületek hozzájárulását a környezeti problémákhoz ekvivalencia arányszámokkal határozhatók meg.

A környezetvédelem globális problémái

1. táblázat

Környezeti probléma	Mértékegység, viszonyítási alap
Nem megújuló erőforrások kimerülése	teljes készlet a világon
Energiaforrások kimerülése	MJ/kg vagy MJ/m ³
Globális felmelegedés	szén-dioxid egyenérték (1 kg CO ₂ üvegház hatása)
Fotokémiai oxidáció	etilén egyenérték (1 kg etilén hatása)
Savasodás	kén-dioxid egyenérték (1 kg SO ₂ hatása)
Emberi toxikusság	az a testsúly, ami képes károsodás nélkül elviselni 1 kg anyagnak az expozícióját
Ökotoxikusság, víz	az a vízmennyiség, amelyet 1 kg anyag kritikus szintre szennyez
Ökotoxikusság, talajbeli	azon talajmennyiség, amelyet 1 kg anyag kritikus szintre szennyez
Tápanyagfeldúsulás	foszfát egyenérték (1 kg foszfát hatása)
Ózonfogyás	CFC-11 egyenérték (1 kg CFC-11 hatása)

4.1. Az üveg és PET csomagolóanyagok környezeti hatásainak összehasonlítása

Kutatók az ásványvíz-csomagolások közül a visszaváltható üveg- és az eldobható PET-palackok életciklusát vizsgálták LCA-módszerrel. A vizsgálat során két italcsomagolást: 0,7 literes visszaváltható, zöld üveget és 1,5 literes, egyszer használatos PET-palackot hasonlítottak össze.

Az üveg és a PET összehasonlítása

2. táblázat

Környezeti hatás	Üveg				PET (egyutas)	
	40 x	20 x	1 x	égetés	lerakás	újrahasznosítás
Energiafelhasználás	362	441	1699	411	573	609
Fafelhasználás	23	23	31	13	13	13
Hozzájárulás a globális felmelegedéshez	853	879	1222	2124	1483	1735
Hozzájárulás a savas esőkhöz	11	14	45	58	58	62
Élőlényekre káros légszennyezés	555	739	2375	3100	3100	3100
Teljes káros vízszennyezés	0,8	0,79	0,06	0,18	0,18	0,28
Szilárd hulladék	58	72	6660	119	399	159
Teljes negatív hatás (TNI)	1863	2169	12032	5825	5626	5678
Arányszám	1	1,16	6,46	3,13	3,02	3,05

A vizsgálat foglalkozik azzal a kérdéssel is, hogy az üvegek többszöri mosása nem jobban környezetkárosító, mint az eldobható palackot használata. A technológia szerint a mosáshoz lúgot és e lúg mennyiségének tizedét kitevő egyéb tisztítószerrel használnak, a szennyvizet pedig tisztítóművön keresztül engedik át az élővízbe.

A 2. táblázat a vizsgálat összefoglaló eredményeit mutatja be: látható, hogy a vizek szennyezése ugyan az üvegnél jelentősebb, mint a PET esetében, ugyanakkor az összes többi környezeti hatás nagyságrendekkel nagyobb mértékben határozza meg az életciklus teljes szennyezését. (A táblázat dimenziómentes számokat tartalmaz, bár megfeleltethetőek az egyes mértékegységeknek; például az energia MJ-ban, a fa kg-ban, a szilárd hulladék kg-ban került feltüntetésre.)

4.2. Az üveg és PET csomagolóanyagok energiaszükségletének összehasonlítása

Az életciklus elemzés tárgya az üvegpalackok környezetterhelésének kiszámítása az energiafelhasználás területén (szén-dioxid kibocsátás). Az elemzés időbeni határa teljes életciklus elemzés, melynek során nem veszik figyelembe a töltőanyag gyártását, valamint nem vizsgálják az újrahasznosítás lehetőségét sem. A felhasznált adatok 1 darab 0,6 kg tömegű palackra vonatkoznak. Leltárelemzés készítésével meghatározható az

üvegpalack-használat energiaszükséglete (3. táblázat). A 0,6 kg tömegű, 1 liter térfogatú üvegpalack teljes életciklusa alatti CO₂ kibocsátás értékét a 4. táblázat szemlélteti.

Az üvegpalackok használatának energiaszükséglete

3. táblázat

Anyag /folyamat	Mennyiség (kg)	Villamos energia (MJ)	Olaj (MJ)	Gáz (MJ)	Kokszt (MJ)	Összesen (MJ)
NaCl	0,162	0,0438	0,1608			0,2046
Na ₂ CO ₃	0,144	0,4770	1,131		0,7092	2,3172
SiO ₂	0,372	0,0822	0,0372			0,1194
CaCO ₃	0,102	0,0258	0,324			0,3498
szállítás			0,258			0,258
palackgyártás		2,784	3,0	2,934		8,718
elosztás és töltés		0,01	0,503			0,513
ártalmatlanítás			0,320			0,320
Teljes életciklus	0,780	3,4228	5,734	2,934	0,7092	12,80

Az üvegpalackok használata során felszabaduló szén-dioxid mennyisége

4. táblázat

Folyamat	CO ₂ kibocsátás (kg)
üvegyártás	0,053
szállítás	0,01
palackgyártás	0,893
töltés és elosztás	0,038
ártalmatlanítás	0,014
Teljes életciklus	1,016

A PET-palackok használatának energiaszükséglete

5. táblázat

Anyag/folyamat	Mennyiség (kg)	Villamos energia (MJ)	Olaj (MJ)	Összesen (MJ)
dimetilbenzol-1, 4-dikarbonát	0,865	41,55	45,51	87,06
(tereftálsav) etán-1,2-diol	0,484	5,87	19,62	25,49
(etilén-glikol)előkészítés a PET-hez		3,77	5,98	9,75
az összes PET-hez felhasznált	1,000	51,19	71,11	122,30
előkészítés a palackhoz		13,88		13,88
palackok előállítás	1,000	65,07	71,11	136,18
elosztás és töltés	1,0	0,2	5,4	5,6
ártalmatlanítás	1,0		- 3,8	- 0,2
Teljes életciklus	1,0	65,2	72,8	141,6

Hasonló elemzés készíthető a nem visszaváltható PET-palackok környezetterhelésének kiszámítására az energiafelhasználás területén. A felhasznált adatok 1 kg palacktömegre vonatkoznak (20 darab 1 literes nem visszaváltható PET-palack). Leltárelemzés készítésével meghatározható a PET-palack használatának energiaszükséglete (5. táblázat). Az 1 kg, összesen 20 liter térfogatú PET-palack teljes életciklusa alatti CO₂ kibocsátás értékét a 6. táblázat szemlélteti.

A PET-palackok használata során felszabaduló szén-dioxid mennyisége

6. táblázat

Folyamat	CO ₂ kibocsátás (kg)
palackgyártás	10,06
töltés és elosztás	0,38
ártalmatlanítás	- 0,28
Teljes életciklus	10,16

4.3. Az üveg- és a PET-palack környezetterhelésének vizsgálata

Tényleges összehasonlítási alapot az jelent, ha azonos térfogategyre (1 liter) vonatkoztatott adatokat helyezik egymás mellé. Az egyszer használatos üveg- és PET-palackok mellett a visszaváltható üvegpalackok életciklusa során felhasznált energia mennyiségét, illetve az ennek eredményeképpen kibocsátott szén-dioxid mennyiségét szemlélteti a 7. táblázat.

Típus (1 liter töltő térfogatra vonatkoztatva)	Energia (MJ)	CO ₂ -kibocsátás (kg)
PET-palack (nem visszaváltható)	7,08	0,508
Üvegpalack (nem visszaváltható)	12,82	1,02
PET-palack (visszaváltható, tízszeri használat esetén)	1,856	0,119
Üvegpalack (visszaváltható, tízszeri használat esetén)	2,43	0,17

A fentiekből látható, hogy a nem visszaváltható PET-palackok életciklusa jóval kevesebb energiafelhasználással jár, mint a nem visszaváltható üvegpalackoké; ezáltal a kibocsátott szén-dioxid mennyisége is jóval kisebb. Az üvegpalack tízszeri használatával járó többlet energia igény 11,48 MJ, a többlet CO₂-kibocsátás pedig 0,68 kg. Feltételezve, hogy mindkét csomagolóeszköz szállítása, tisztítása, töltése ugyanakkora energia igénnyel és szén-dioxid kibocsátással jár, a PET-palack tízszeri használat után lényegesen kedvezőbbnek tűnik a vizsgált szempontok alapján. (És ekkor még nem lett figyelembe véve, hogy egy darab PET-palack lényegesen könnyebb tömegű, mint egy ugyanolyan térfogatú üveg. Anyagszükséglet, szállított tömeg, törékenység, stb. további szempontok lehetnek a kiválasztásban.)

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az életciklus-elemzés olyan korszerű, a környezeti hatásokat összegző vizsgálati módszer, amely alkalmas két vagy több termék összehasonlítására. A „Bölcsőtől a sírig” elv alapján a teljes életciklus, míg a „Bölcsőtől a bölcsőig” elv alapján a hulladék újrahasznosítás környezeti hatásai is megjelennek.

Az életciklus-elemzés akkor tekinthető objektív értékelési módszernek, ha a „bölcső” meghatározása kellő körültekintéssel történik. A „sír” ugyanakkor lehet egy új termék „bölcsője” is.

Napjainkban a környezeti értékek, erőforrások még nem kaptak valós értéket. Ezért fordulhat elő, mint a fentiekben bemutatott példa is igazolja, hogy a véges fosszilis készletekből előállított PET palack használata környezeti (és gazdasági) szempontból is kedvezőbb az üveg felhasználásánál.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Farkas, F. (2000): A műanyagok és a környezet. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [2] Kerényi A. (1998): Általános környezetvédelem. Mozaik Oktatási Stúdió, Szeged.
- [3] Vermes, L. (1988): Hulladékgazdálkodás, hulladékhasznosítás. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Az azometinek termikus viselkedése

The Thermal Behavior of the Azomethines

KEREKES Katalin¹, Dr. BÂLDEA Ioan¹, ifj. Dr. VÁRHELYI Csaba¹,
Dr. POKOL György², Dr. VÁRHELYI Csaba¹

¹Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia kar, Kolozsvár

²Budapesti Műszaki és Közgazdasági Egyetem, Budapest

ABSTRACT

The azomethines (oximes, semi-, thiosemicarbazones, Schiff-bases) were studied, generally, with various spectroscopic, magnetic and X-ray methods. The thermal behavior of these compounds was the subject of investigations only in few cases (decomposition, melting points, temperature range of the thermal stability). This article is a part of the thermal analytical studies of the authors (TG, DTA, DTG) and mass spectra, upon various types of free azomethines and their Ni, Pd and Cu derivatives: comparative measurements upon the thermal stability, the kinetics and mechanism of the thermal decomposition, determination of the byproducts.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Amint ismeretes, az azometinek olyan vegyületek, melyek molekulájában legalább egy >C=N–csoport, s többnyire egy vagy több más funkciós csoport található. Ide sorolhatjuk az oximokat, hidrazonokat, azinokat, szemi- és tioszemikarbazonokat, Schiff-bázisokat, sőt még a makrociklusos vegyületeket és a ftalocianineket is.

E vegyületek kémiája sokat fejlődött az elmúlt évtizedek során. Új szintézis-módok kidolgozása, valamint különböző technikai, ipari, analitikai kémiai alkalmazások terén. E vegyületek tisztítására a klasszikus átkristályosítás, ritkán szublimációs, extrakciós, valamint kromatográfiás módszereket alkalmaznak.

Fizikai-kémiai jellemzésükre főleg különböző spektroszkópiai (látható-, ultraibolya, elektronszinképek, közepes és távoli infravörös-, újabban Raman spektroszkópiai és különböző átmenetifémek NMR mérései) módszereket alkalmaztak, egyes esetekben ESR (elektronspin-rezonancia) és Mössbauer-spektrumokkal (⁵⁷Fe, ¹¹⁹Sn) is vizsgáltak egyes szerkezeti problémákat, valamint a kémiai kötések jellegének és viszonylagos erősségének megállapítását.

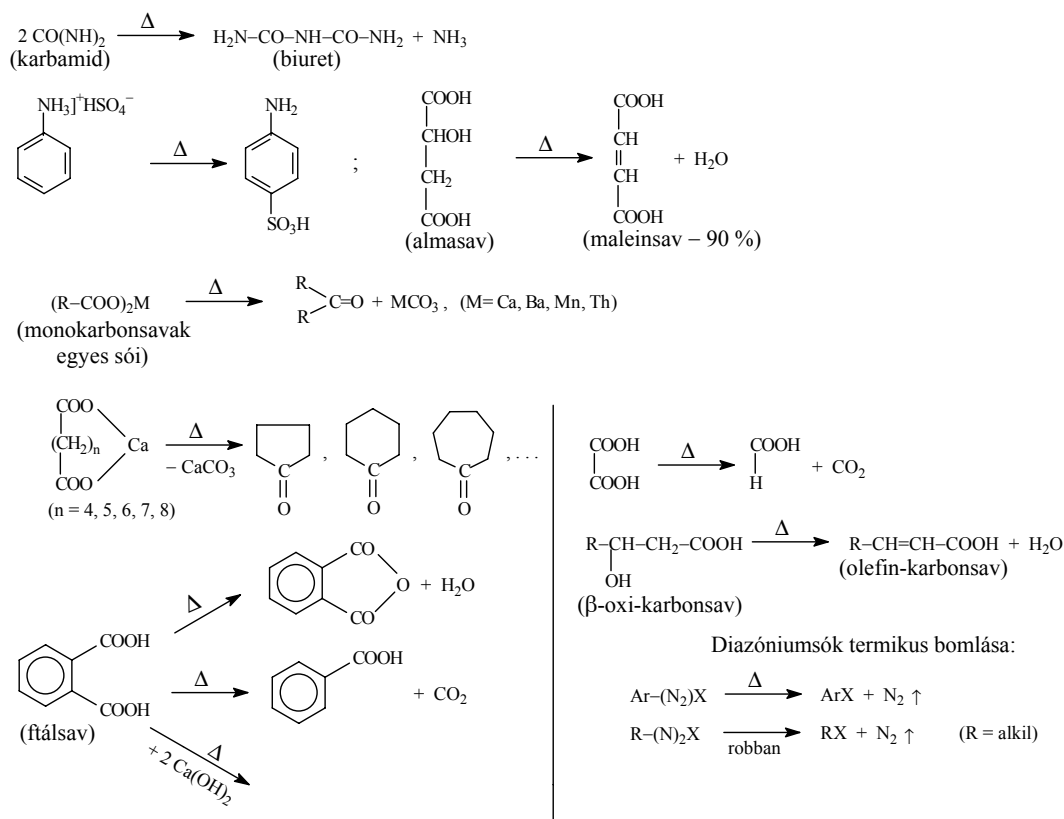
E vegyületek termikus viselkedésének vizsgálatára ritkább esetekben került sor (bomlás, olvadáspont, szublimációs hő, a hőállandóság hőmérséklet-intervallumának megállapítása, főleg termogravimetriás és gravimetriás mérések alapján).

Érdekesség kedvéért megjegyezzük, hogy egyes porfirinek és ftalocianinok nehézfém származékainak termikus stabilitása, szerves vegyületekről lévén szó, hihetetlenül magas. Pl. Zirkónium- és Hafnium-származékaik 500 – 600°C körül szublimálnak és 650 – 700°C-on bomlanak, ami TG-mérésekkel jól igazolható.

A szerves kémiában elég nagyszámú olyan szilárd halmazállapotban végbemenő folyamat van (dehidratáció, kisebb molekulák lehasadása sztöchiometriai arányban, pl. dekarboxilálás, amin-vesztés), amik jól tanulmányozhatók klasszikus termoanalitikai módszerekkel.

A tömegvesztés nélkül lejátszódó izomer átalakulásnak vizsgálatára a DTA-mérések a legalkalmasabbak, a szerves kémián kívül a koordinációs kémiában is (cisz-transz átalakulások).

A termikus reakciók főbb típusai a következők: oxidáció, redukció, addíció, kondenzáció, szubsztitúció, izomerizáció és más típusú átrendeződések (**1. ábra**).



1. ábra
A termikus reakciók főbb típusai

Az eliminációs reakciók során a kérdéses molekula darabokra hasad, és különböző bomlástermékek távoznak el. Néhány esetben a bomlástermékek keletkezése sztöchiometriai egyenlettel is leírható. Az eliminációs reakciók fajtái között megemlítettük az olyan bomlási reakciókat, mint a dekarboxilezés, dehidrogénezés, a diasav vegyületek szétesése, a savanhidridek keletkezése. Ezek során kisebb molekulák: H_2O , CO , CO_2 , N_2 , H_2 , NH_3 molekulák hasadnak le. E folyamatok TG-mérések útján gyakran elég jól követhetők.

Az irodalomban megjelent néhány számítási módszer e bomlási folyamatok kinetikai tanulmányozására, a látszólagos kinetikai paraméterek (aktiválási energia, reakció rendűség, stb.) meghatározására.

Az oldatban lejátszódó folyamatok kinetikáját olyan egyenletek írják le, mely az egyes reakciókomponensek koncentrációja és a reakciósebesség közötti összefüggést adja meg.

A szilárd halmazállapotban lejátszódó folyamatok nagyon sokrétűek, és a kinetikai paramétereket nagyon sok tényező befolyásolja. Itt nem is beszélhetünk koncentrációról, hanem csak átalakulási fokról (α). Ezt a TG-görbék alapján számíthatjuk ki.

Az átalakulási fok (α) a következő egyenlettel számítható ki:

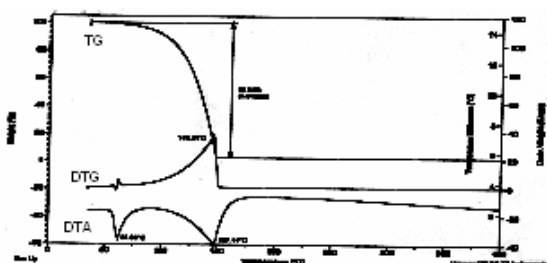
$$\alpha_1 = (W_{01} - W_i) / (W_{01} - W_j)$$

Ha állandó fűtési sebességgel dolgozunk, a legegyszerűbb esetben, pl. kalcium-oxalát-monohidrát dehidratációjánál, akkor a $\text{CaCrO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ TG-görbéjének első szakasza a dehidratáció alkalmával a próba tömegét adja a hőmérséklet függvényében. Ez a fenti egyenletnek felel meg, mely megfelel a vízmentes CaCrO_4 tömegének. W_{01} a bemért próba, W_i és W_j a különböző hőmérsékleten bemért súlyokat jelent. Ezen az egyenleten alapszik jónéhány kinetikai számítási módszer (Horowitz-Metzger, Coates és Redfern, Zsakó eljárása).

A bomlási mechanizmus megállapítása céljából egyre több megjelent dolgozatban szerepelnek a termoanalitikai mérések mellett a különböző tömegspektrometriai adatok, melyek a bomlás során keletkező töredékionokra, valamint a molekulatömegekre adnak felvilágosítást, főleg az illékonyabb szerves- és komplexvegyületek esetén.

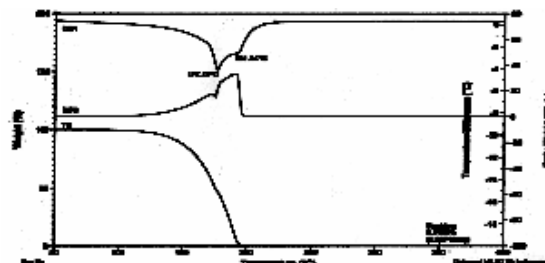
KÍSÉRLETI RÉSZ

Megvizsgáltunk néhány sorozat szabad oxim, Schiff-bázis, szemi- és tioszemi-karbazon, valamint ezek 3d – 4d-átmenetifém-komplexvegyületeinek termikus viselkedését klasszikus termoanalitikai módszerekkel (DTA, DTG) (2–4. ábra), valamint tömegspektrumok alapján (5. ábra). Megállapítottuk, hogy a szabad ligandumok stabilitása kisebb, mint a fémkomplexeké. E jelenség oka az, hogy szilárd halmazállapotban, a kristályrácsban O–H, N–H intermolekuláris hidrogénhidak is előfordulnak a szabad ligandumokban, ami csökkenti a hőállandóságot. A fémkomplexek esetén e hidrogénhidak hiányoznak.



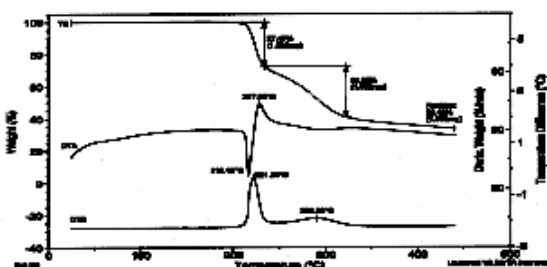
2. ábra

Ciklopentanon-monoxim hőbontása



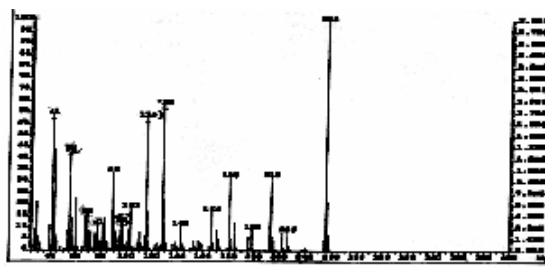
3. ábra

Metil-etil-dioxim hőbontása



4. ábra

Piridin-2-tioszemikarbazon hőbontása



Sor-szám	Vegyület	Q (atm)	j_1^*	\square (K ¹)	n	E	lg Z
1	Ciklododekán-monoxim	Ar	1942,7657	11,034483	0,8051573	12,875	-0,637
2	Benzil-dioxim	lev.	714,93581	6,3492063	1,2465922	38,304	1,571
3	Furfuril-dioxim	lev.	1216,7995	5,8394161	0,1268699	19,49	-1,565
4	TrioxH ₃	Ar	704,8792	5,7142857	0,7289345	38,304	0,878
5	Bis-diacetil-monoxim-azin	N ₂	3503,211 521,03758	10,666667 4,6715328	0,3602623 0,5538583	6 ÷ 7 53,45	-3 ÷ -4 2,041
6	Bis-diacetil-monoxim-azin	Ar	1785,4125 692,27053	10,096154 5,0122249	0,7961306 0,0578682	13,084 37,9	-0,966 0,117
7	C ₆ (NOH) ₂ -fenil-hidrazon	Ar	1866,4683	6,504065	-0,3285683	11,06	-2,817
8	Bis-diacetil-monoxim-en	Ar	1739,3142	9,0140845	0,5660589	14	-1,497

RÖVIDÍTÉSEK:Triox.H₃ – ciklohexán-1,2,3-trion-trioximC₆(NOH)₂ – ciklohexán-dioxim

en – etilén-diamin

lg Z – preexponenciális factor

SC – szemikarbazon

TSC – tioszemikarbazon

Aliciklusos szemi- és tioszemikarbazonok termoanalitikai vizsgálata

3. táblázat

Sor-szám	Vegyület	Q		Csúcs-hőmérsékletek
		C/min	atm	
1	Ciklopentanon-SC	10	Ar	214,78 e; 272,68e
2	Cikloheptanon-SC	10	Ar	116,3 e; 166,74 e; 215,35 e; 236,53 e; 325 E
3	Cikloheptanon-TSC	10	Ar	120,91 e; 166 e; 217,84 e; 235,21 e; 329,11 E
4	Ciklooktanon-SC	10	N ₂	174,77 e; 215,95 e; 240 e; 323,33 E
5	Ciklododekanon-SC	10	Ar	221,7 e; 302,67 e; 333,45 E
6	Ciklohexanon-TSC	10	N ₂	154,96 e; 193,33 E; 262,9 E
7	Cikloheptanon-TSC	10	Ar	129,36 e; 175,62 e; 211,53 e 216,34 E; 310,58 e
8	Ciklooktanon-TSC	10	Ar	182,22 e; 196,61 E
9	Ciklododekanon-TSC	10	Ar	184,91 e; 297,33 e
10	Benzil-aceton-TSC	10	Ar	99,92 e; 185,61 e; 230,1 E

Aliciklusos szemi- és tioszemikarbazonok termoanalitikai vizsgálata

4. táblázat

Sor-szám	Vegyület	Q (atm)	j_1^*	\square (K ¹)	n	E	lg Z
1	Ciklopentanon-SC	Ar	487,87797	5,08492	0,633	57,67	2,537
2	Cikloheptanon-SC	Ar	900,65202 538,29607	5,52486 4,03226	0,153 1,033	28,124	-0,643
3	Cikloheptanon-TSC	Ar	456,00035	3,97361	0,895	55 ÷ 60	0 ÷ 1
4	Ciklooktanon-SC	N ₂	471,63461	4	0,991	50 ÷ 55	0 ÷ 1
5	Ciklododekanon-SC	Ar	384,83415	2,98851	1,360	-	-
6	Ciklohexanon-TSC	N ₂	1610,8691	5,88235	0,703	13	-2,775
7	Cikloheptanon-TSC	Ar	1428,5889	6,75325	0,309	1,194	-1,933
8	Ciklooktanon-TSC	Ar	760,17991	7,27273	1,292	36,388	2,067
9	Ciklododekanon-TSC	Ar	1549,0479	5,71428	0,736	13,705	-1,633
10	Benzil-aceton-TSC	Ar	1041,2084	6,93333	0,657	24,454	-0,577

IRODALOM

- [1] Zsákó J., Szilágyi I., Simay Á., Várhelyi Cs., Kerekes K., Kinetic analysis of TG data, Part. 36, J. Thermal Anal. and Calorimetry, 2002, **69**, 125 – 132
- [2] Zsákó J., J. Thermal Anal., 1996, **47**, 1679 – 1688; 1998, **54**, 921 – 927
- [3] Keatch C. J., An Introduction to Thermogravimetry, Heyden & Son, Ltd, London 1969, 21 – 50
- [4] Horowitz H. H., Metzger G., Analyt. Chem., 1963, **35**, 1464 – 1469
- [5] Doyle C. D., J. Appl. Polymer Sci., 1961, **5**, 285 – 288; 1962, **6**, 639
- [6] Coats H. V., Redfern J. P., Nature, 1964, **201**, 68

A szabad és fehérjében kötött triptofán-enantiomerek meghatározása különböző hidrolízismódszerek alkalmazásával

The Determination of the Free and Protein-bound Tryptophan Enantiomers by Using Different Hydrolysis Methods

LÓKI Katalin¹, ALBERT Csilla², VARGÁNÉ VISI Éva¹, BÍRÓ Melinda², SALAMON Szidónia², SÁRA Péter¹, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna¹, CSAPÓ János^{1,2}

¹Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai-Biokémiai Tanszék, H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40. Tel.: 36-82-314-155, fax: 36-82-321-749, e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu; www.u-kaposvar.hu

²EMTE Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék, RO-4100 Csíkszereda, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-314-657, fax: 40-266-372-099; albertcsilla@sapientia.siccolorum.ro, www.emte.ro

ABSTRACT

Diastereoisomers of L- and D-tryptophan were formed with a chiral reagent 1-thio-β-D-glucose tetraacetate (TATG) and o-phthaldialdehyde (OPA) and they were separated from the derivatives of the other amino acids that occur in food proteins on an achiral column by high performance liquid chromatography. Mercaptoethanesulfonic acid, which is an adequate agent for hydrolyzing proteins, made the derivatization with OPA and TATG impossible, contrary the reaction completed in the presence of p-toluenesulfonic acid, but the oxidative losses during hydrolysis is significant.

Keywords: D-tryptophan, diastereoisomer, separation, high performance column chromatography

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer- és takarmányfehérjékben előforduló aminosavak közül talán a triptofán (Trp) mennyiségének pontos meghatározása a legnehezebb. A többi aminosavval szemben, a triptofán fehérjeláncból való felszabadításához nem alkalmazható az elterjedten használt 110 °C-on 24 óráig 6 M sósav-oldattal végzett hidrolízis, mivel a triptofán szinte teljesen elbomlik ilyen körülmények között. A triptofán oxidatív átalakulásának megelőzése céljából tiolcsoportot tartalmazó védőanyagokat lehet a sósavas elegyhez adni [5], [7]. Egy másik lehetőség, hogy sósav helyett p-toluolszulfonsavat alkalmazunk (PTS), és az indolcsoport védelme érdekében 3-(2-aminoetil)indol (triptamint) adunk a savas oldathoz [6]. A hidrolízist végre lehet hajtani merkapto-etán-szulfonsavval is (MES), ahol a hidrolizáló ágens egyben redukív csoportot is tartalmaz [9]. A legjobb Trp-kitermelést a lúgos közegű bárium-hidroxidos vagy nátrium-hidroxidos hidrolízismódszereknél mérték [8], [1]. Amennyiben nem feladatunk meghatározni a Trp-tartalmon belül a D- és az L-enantiomerek arányát, utóbbi módszereket célszerű alkalmazni a triptofán felszabadítására a fehérjeláncból. A hidrolízis során alkalmazott erősen lúgos közeg azonban az L/D-arány megváltozását okozhatja, ugyanis élelmiszer- és takarmányfehérjékben az aminosavak jelentős racemizációját figyelték meg lúgos kezelés hatására [4], ezért ha az enantiomerek meghatározása a cél, savas hidrolízismódszereket kell alkalmazni.

A triptofán fehérjeláncból történő felszabadítását követően az enantiomerek elválasztását és mennyiségük meghatározását kell megvalósítani. Egy lehetséges megoldás, hogy az analízis előtt az aminosav-enantiomerekből OPA (o-ftáldialdehid) és TATG (1-tio-β-D-glükóz-tetraacetát) reagensekkel diasztereoizomer-párokat képeztünk, melyek akirális állófázisú oszlopon is elválaszthatóak, és fluorescens jelük detektálható. A többi fehérjealkotó aminosav elválasztását már megvalósították a fenti módszerrel [3], [2].

A kutatás célja az volt, hogy egy folyadékkromatográfiás módszert dolgozzunk ki a D- és az L-Trp-tartalom meghatározására, valamint megvizsgáljuk, hogy melyik hidrolízismódszer alkalmazása a legcélravezetőbb a triptofán fehérjéből való felszabadítására, a racemizáció és az egyéb oxidációs veszteségek szempontjából. Továbbá célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy milyen mértékű az L-Trp racemizációja, illetve bomlása különböző pH-jú oldatokban történő melegítés hatására.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Származékképzés és analízis

A kémiai analízist a Kaposvári Egyetem Állattudományi Karának Kémiai-Biokémiai Tanszékén végeztük el. A triptofán-enantiomerekből OPA (o-ftálaldehid) és TATG (1-tio- β -D-glükóz-tetraacetát) reagensekkel diasztereoizomer-párokat képeztünk [3], [2], majd fordított fázisú oszlopokon (Superspher 60 RP-8e, vagy Purospher RP-18e állófázis, 125mmx4mm i.d.) választottuk el őket egymástól. A mozgó fázis foszfátpuffer (39 mM, pH=7)–metanol–acetonitril elegy volt, az optimalás utáni végső összetételt lásd a következő fejezetben. Az analíziseket MERCK-Hitachi gyártmányú, LaChrom típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal végeztük. A detektálás során a diasztereoizomerek fluoreszcens jelét mértük (λ_{ex} : 325nm, λ_{em} : 420nm).

2.2. A szulfonsavas hidrolízisek

A para-toluol-szulfonsavas (PTS) hidrolízisnél 5 cm³ 3 M 0,2% 3-(2-amino-etil)indol (triptamin) tartalmú PTS oldatot adtunk a kb. 15 mg fehérjét tartalmazó mintához (juh hemoglobin). Ezt követően az orvosi ampullába nitrogéngázt vezetünk két percig, leforrasztottuk, majd 110 \pm 2 °C-on tartottuk 24 órán keresztül. Ezt követően 4 M-os NaOH-oldattal semlegesítettük, majd 25 cm³-es mérőlombikba téve desztillált vízzel hígítottuk, ezt követően még ötszöröse hígítottuk. A hidrolízist elvégeztük triptamint nem, csak PTS-t tartalmazó oldatokkal is.

A merkapto-etán-szulfonsavas (MES) hidrolízist követően a MES-t el kell távolítani, hogy ne zavarja a származékképzési reakciót. Ennek érdekében három módszert próbáltunk ki. Először 5 cm³ 0,5 M-os CuSO₄-oldatot adtunk 5 cm³ MES oldathoz (0,01 mmol D- és 0,01 mmol L-Trp, 4,5 mmol MES), majd a szuszpenziót centrifugáltuk (4000 g, 20 perc). A felülúszó pH-ját 5 és 6 közé állítottuk be 4 M NaOH-oldattal.

A második próba során a MES-oldatot (3 cm³ 3 M MES; 0,01 mmol D- és 0,01 mmol L-Trp) háromszorosára hígítottuk, majd 3 cm³ oxidáló oldatot adtunk hozzá, mely 30 w/v %-os H₂O₂ és 85 w/v %-os hangyasav 1:9 arányú (v/v) elegyéből állt. Ezt követően 50 °C-on 5 percig melegítettük az oldatot, majd hűtést követően a visszamaradó perhangyasav megkötése céljából 0,52 g nátrium-metabiszulfítot adtunk hozzá.

A harmadik alkalommal a MES-oldat 1 cm³-ét (1 cm³ 3 M MES-oldat és 0,01 mmol D-, valamint 0,01 mmol L-Trp desztillált vízzel 5 cm³-re kiegészítve) 25 cm³-es lombikba tettük. A pH-t 2-re, 6-ra, illetve 9-re állítottuk be 4 M NaOH-oldattal (egy kontrollmintát is készítettünk pH-beállítás nélkül), majd 20 cm³ desztillált vizet és 1 cm³ 0,1138 g/cm³ (0,612 mmol) jódecetsav-oldatot adtunk hozzá.

2.3. A triptofántartalmú oldatok hőkezelése

Az 1 mg/cm³ L-Trp-t tartalmazó oldatok pH-ját (3; 5; 7; 9; 11) 6 M sósav oldattal, illetve 4 M NaOH-oldattal állítottuk be. Az oldatokat orvosi ampullába tettük és a leforrasztás előtt 2 percig nitrogéngázzal öblítettük, majd 100 \pm 1 °C-on 0; 5; 10; 20; 40; 60 percig, illetve 2; 4; 8; 12; 24; és 48 óráig melegítettük.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

3.1. A triptofán-enantiomerek elválasztása az élelmiszerfehérjében előforduló aminosavaktól

Annak ellenére, hogy az aminosavak analízisét megelőzi a hidrolízis, először egy analitikai módszert kellett kidolgozni a Trp-enantiomerek elválasztására, hiszen enélkül a hidrolízismódszereket sem tudtuk volna megvizsgálni. A Trp-enantiomerekből OPA-val és TATG-vel képeztünk származékokat, és az így létrejövő diasztereoizomereket akirális állófázisú oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfiás rendszerben választottuk el egymástól. A módszerfejlesztésnél kétféle standardoldattal dolgoztunk az egyéb aminosav-származékok interferenciájának kiszűrése érdekében. Az egyik oldat csak D- és L-Trp-t, a másik az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav L- és D-enantiomerjét tartalmazta. Az elválasztás optimalása során változtattuk az állófázis minőségét, a mozgófázis összetételét, ezen belül a szerves fázis arányát és minőségét (metanol, acetonitril, vagy mindkettő).

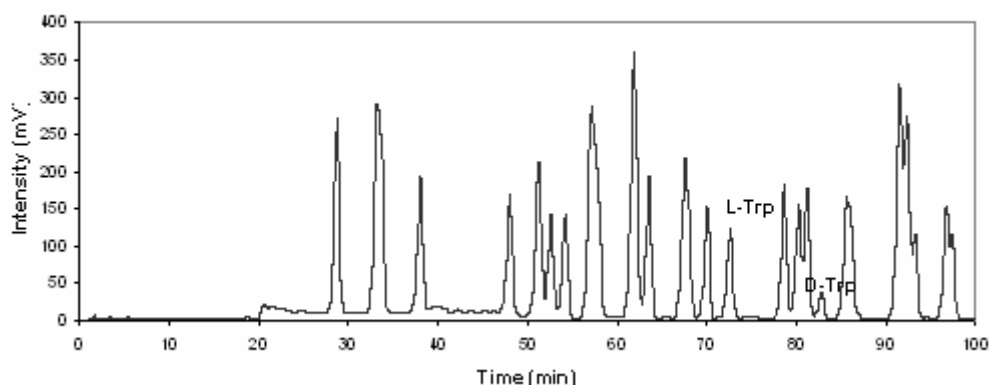
1. táblázat

Gradiens-összetétel az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztására az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól

Oszlop: Purospher RP-18e; 125 mm x 4 mm, áramlási sebesség: $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Idő (min)	Metanol (v/v%)	Foszfát puffer (39 mM, pH=7,0) (v/v%)	Acetonitril (v/v%)
0	20	80	0
120	20	45	35
130	20	45	35
135	20	80	0
140	20	80	0

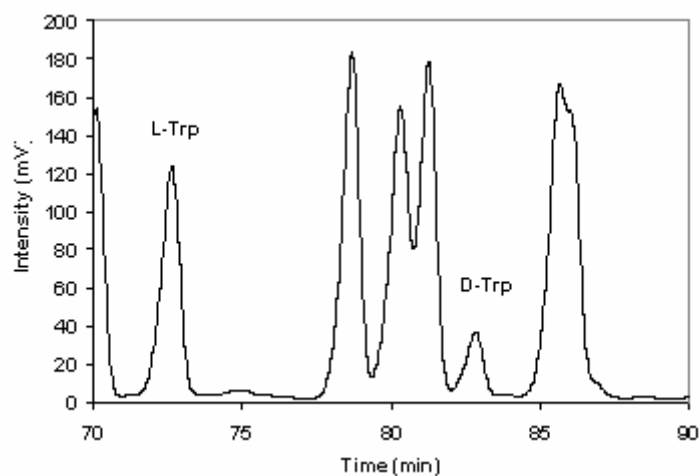
Az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztását az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól az 1. ábra, Trp-származékok elválasztását kinagyítva pedig a 2. ábra mutatja.



1. ábra

Az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztása az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól, a teljes kromatogram

Oszlop: Purospher RP-18e; 125 mm x 4 mm, Gradiens program: az 1. táblázatban leírtak alapján, az áramlási sebesség: $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.



2. ábra

Az L- és D-triptofán OPA-TATG származékainak elválasztása az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav származékaitól, a Trp-származékok elválasztását bemutató részlet.

A diasztereoizomer-származékok fluorescens jele között jelentős különbség volt; az L-Trp származéké mintegy 2,4-szer nagyobb volt, mint a D-Trp-é. A kalibrációs egyenes adatai a 2. táblázatban láthatóak. Az alacsony koncentrációtartományban (14 ng L-Trp és 28 ng D-Trp/injektálás) a relatív szórás (RSD) 1,1 és 4,1% volt; a közepes tartományban (140 ng L-Trp és 280 ng D-Trp/injektálás) ezek az értékek 3,7 és 1,9% voltak; a magas koncentrációtartományban (276 ng L-Trp és 552 ng D-Trp/injektálás) 1,6 és 2,3%-nak adódtak (n=6).

2. táblázat

A kalibrációs egyenes adatai a triptofán-enantiomerek OPA-TATG származékainak fluorescens detektálása során (ex.:325 nm, em.: 420 nm). A lineáris tartományon belül a kalibrációs szintek száma 9 volt az L- és 10 a D-triptofán esetében.

Aminosav	Lineáris tartomány (nmol ml ⁻¹)	Korrelációs koefficiens	Meredekség (A)	Tengelymetszet (B)	Kimutatási határ (nmol ml ⁻¹)
L-Trp	3–72	0,9998	12,6	-2,6	2,2
D-Trp	3–150	0,9996	5,3	-3,0	1,8

X = a kromatográfias csúcs magassága (mV)/koncentráció (nmol·cm⁻³)

Y = koncentráció (nmol·cm⁻³)

3.2. A szulfonsavas hidrolízismódszerek vizsgálata

Merkapto-etán-szulfonsav jelenlétében nem alakultak ki az aminosavak OPA-TATG származékai, melynek valószínűsíthető oka az volt, hogy a TATG helyett a MES képzett származékot az OPA-val és a Trp-nal. A MES eltávolítása, illetve szulfhidril-csoportjának átalakítása céljából több módszerrel próbálkoztunk. Először a MES-ből réz-merkaptid csapadékot képeztünk, majd a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk, és a felülúszó oldat aliquot részével végeztük el a származékképzést, azonban a Trp-származékok jelét a merkaptidok eltávolítása után sem észleltük.

Ezt követően a MES-t perhangyasavval diszulfonsavvá oxidáltuk. Mivel a perhangyasav reagálhat a triptofánnal, és feleslege a származékképző reagensekkel is, az egész folyamat ugyanolyan körülmények között megvalósítottuk alaninnal (Ala) is, melynek oldallánca (R-csoportja) nem érzékeny az oxidatív átalakításokra. A perhangyasav feleslegét nátrium-metabiszulfittal kötöttük meg. Ilyen körülmények között sem jelent meg a Trp és az Ala diasztereoizomer származékainak a jele a kromatogramon, tehát sem a Trp, sem az Ala OPA-TATG származéka nem alakult ki detektálható mennyiségben a MES perhangyasavas oxidációja és a perhangyasav-felesleg megkötését követő származékképzés során. A Trp esetében valószínűsíthető az oxidatív átalakulás N-formil-kinureninné.

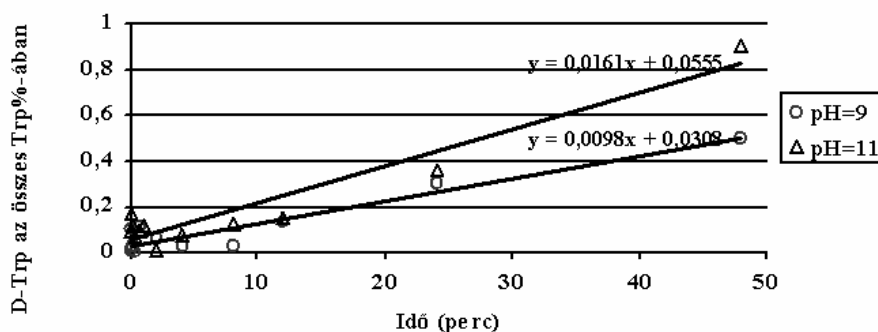
Legvégül a MES-t jódecetsavval karboxi-metil-származékká alakítottuk át, de a Trp-nak csak egy kis hányada alakult át OPA-TATG származékká, és a TATG koncentrációjának növelése sem vezetett eredményre. Vizsgáltuk, hogy megfelelő volt-e az oldatok pH-ja a származékképzéskor (pH=9,5), de nem tapasztaltunk eltérést. Kipróbáltuk a MES-OH-oldat származékképzés előtti semlegesítését, a pH 2-re, 6-ra, illetve 9-re állítását, de egyik esetben sem tapasztaltuk a diasztereoizomer-párok jelintenzitásának növekedését.

Para-toluol-szulfonsav jelenlétében a származékképzés megfelelő módon végbement, azonban csupán PTS jelenlétében a Trp visszanyerése nagyon alacsony. Juh hemoglobint 3 M PTS-oldatban hidrolizálva az eredeti Trp-tartalomnak mindössze 44±2%-át kaptuk vissza. Amennyiben a Trp indolgyűrűjének megvédése érdekében triptamint adunk az oldathoz [6], a származékképzés – valószínűleg a triptamin aminocsoportja miatt – nem megy végbe. Terveink között szerepel a 3-(3-indolil)propionsav kipróbálása, mely a származékképzés szempontjából indifferens.

3.3. A hőkezelés hatása a Trp bomlására és racemizációjára különböző pH-jú vizes oldatokban

A szabad L-Trp racemizációja nem volt jelentős az alacsonyabb pH-jú oldatokban (pH=3–7). A D-Trp mennyisége 12 órás forralás után kezdett el növekedni (3. ábra), de a D–L átalakulás mértéke kisebb volt, mint 1%.

Az L-Trp mennyisége egy napos hőkezelést követően 2–5%-kal csökkent. A racemizációhoz képest a többi átalakulási/bomlási folyamat nagyobb szerepet játszott a Trp-tartalom csökkenésében.



3. ábra

A D-Trp-tartalom növekedése 100 °C-os hőntartás hatására 7-es és 11-es pH-jú vizes oldatokban

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás során megvalósítottuk a triptofán-enantiomerek elválasztását az élelmiszer-fehérjékben előforduló egyéb aminosavaktól. Az aminosav-enantiomerekből l-tio- β -D-glukóz-tetraacetáttal és o-ftálaldehiddel diasztereoiszomereket képeztünk, majd a többi aminosav zavaró hatásának kiszűrése érdekében elvégeztük a fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai elválasztás optimalizálását. A legnagyobb kitermeléssel járó savas fehérjehidrolízis-módszerek közül merkapto-etán-szulfonsav jelenlétében nem megy végbe a származékképzési reakció, ezzel szemben a para-toluol-szulfonsavas hidrolízist követően a származékképzés megvalósítható, de a Trp bomlása számottevő. Különböző pH-jú modelloldatokban az L-triptofán vesztesége 2 és 5% között változott 24 órás forralás után. Az oxidatív bomlás mellett (pH=9 és 11) a parciális racemizáció is szerepet játszott az L-triptofán koncentrációjának csökkenésében.

5. IRODALOM

- [1] AOAC Official Method 988.15, "Tryptophan in Foods and Food and Feed Ingredients, Ion Exchange Chromatography Method" In: *AOAC Official Methods Analysis*. 1995. 45. 4. 4.
- [2] Csapó, J. – Csapó-Kiss, Zs. – Einarsson, S. – Folestad, S. – Tivesten, A.: Methods for determination of D-amino acid content of foods and feeds. *Acta Alimentaria*. 1995. 24. 125-126.
- [3] Einarsson, S. – Folestad, S. – Josefsson, B.: Separation of amino acid enantiomers using precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and 2,3,4,6,-tetra-O-acetyl-1-thio- β -glucopyranoside. *J. Liq. Chromatogr.* 1987. 10. 1589-1598.
- [4] Friedman, M.: Chemistry, Nutrition, and Microbiology of D-Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* 1999. 47. 3457-3479.
- [5] Freedlender, E.F. – Haber, E.: Obtaining large variable-region peptides from rabbit light chains. *Biochemistry*. 1972. 11. 2362-2370.
- [6] Liu, T.Y. – Chang Y.H.: Hydrolysis of Proteins with p-Toluenesulfonic Acid. Determination of tryptophan. *J. Biol. Chem.* 1971. 246. 2842-2848.
- [7] Matsubara, H. – Sasaki, M.: High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1969. 35. 175-181.
- [8] Miller, E.L.: Determination of the Tryptophan Content of Feeding Stuffs with Particular. *J. Sci. Fd. Agric.* 1967. 18. 381-387.
- [9] Penke, B. – Ferenczy, R. – Kovács, K.: A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.* 1974. 60. 45-50.

Élelmiszerek biológiailag felvehető króm(III) és króm(VI) tartalmának modellezése

Modeling of Uptake of Biologically Available Cr(III) and Cr(VI) in Foodstuffs

Dr. MURÁNYI Zoltán¹, KOZÁK Imre Olivér¹, OLDAL Vince²

¹EGERFOOD Regionális Tudásközpont, Eszterházy Károly Főiskola,
3300 Eger, Leányka u. 6., Magyarország,

Tel: 06 36 520400/4136; Fax: 06 36 520438, <http://www.ektf.hu/ret>,

²Eszterházy Károly Főiskola Kémia Tanszék, 3300 Eger, Leányka u. 4., Magyarország

Tel: 06 36 520400/4118, Fax: 06 36 520447, <http://kemia.ektf.hu/>

ABSTRACT

Proportions of different chromium forms of the total chromium concentration in foodstuffs are vital. While Cr(III) is essential for human livings, Cr(VI) is toxic and carcinogenic. We model the uptake of biologically available chromium concentrations with the proper choice of sample preparation steps. During extraction, we simulate ion-concentrations, pH, enzymatic environment and reaction time. After an extraction step, Cr(III) and Cr(VI) partition is analysed with atom-absorption in treated samples.

1. BEVEZETÉS

Az elfogyasztott élelmiszerek összkróm-tartalmának megoszlása létfontosságú. A króm(III) forma *esszenciális* az emberi szervezet számára, míg a króm(VI) forma *rákkeltő* hatású [3].

A kutatási cél a Regionális Tudásközpont (RET) ipari partnerei által előállított élelmiszerekben és azok alapanyagaiban a krómtartalom meghatározása.

A vizsgált élelmiszerekben a nagy mértékű *szervesanyag* és *sótartalom* miatt a króm közvetlen mérése nehezen kivitelezhető, ezért minta-előkészítés szükséges. A célkitűzés olyan minta-előkészítés kifejlesztése a meglévő módszerek adaptálásával, amivel egyúttal az élelmiszerekből a króm *biológiai felvehetőségét* is figyelembe vesszük. További követelmények a gyors eljárás, a kis oldószerigény, és meglévő műszerpark adta lehetőségek használata.

Ezért az élelmiszerekből felvehető króm mennyiséget modellezzük a minta-előkészítés körülményeinek megválasztásával. Az extrakció során szimuláljuk a megfelelő ionerősséget, kémhatást, enzimátikus környezetet és reakcióidőt. A króm(III) és a króm(VI) speciációjára (egymás melletti meghatározására) több módszert is dokumentáltak [1]: *folyadék-folyadék extrakció*, szilárd fázisú extrakció, koprecipitáció, ioncserés elválasztás, elektrokémiai eljárások, HPLC, ion-kromatográfia, kapilláris elektroforézis. A *peroxidos ionpárképzés* [2] gyors minta-előkészítést tesz lehetővé környezeti minták esetében, ami várhatóan adaptálható élelmiszerekre. Ezért első megközelítésben a speciációt a króm(VI) tartalom krómium-peroxo komplexbe vitelét követően etil-acetáttal történő extrakcióval végeztük. Az extrakció után a műszeres mérésre általánosan elterjedtek az atomabszorpciós módszerek (AAS) [4], amik közül a *grafit kemencés atomabszorpciós spektroszkópiás (GFAAS)* eljárás az egyik legjobb az érzékenységgel rendelkezik, ezért ezzel vizsgáljuk a króm(III) és króm(VI) megoszlást.

2. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Készülékek

A méréseket Varian SpectraAA 50B típusú grafit-kemencés atomabszorpciós spektrofotométer készüléken végeztük, ami keresztfűtésű grafit-kemencével rendelkezik. A CPI International gyártmányú króm vajtka-tód lámpát 7,0 mA-en használtuk 0,5 nm-es résszélességgel, minden mérést 357,9 nm-en végeztünk. Az ultratiszta vizet Millipore Milli-Q Academic ioncserés készülékkel állítottuk elő. A pH-t Mettler-Toledo MP120 gyártmányú pH-mérővel állítottuk be. A hűtési lépést Liebherr hűtőben végeztük.

2.2. Vegyszerek, anyagok

A minta-előkészítés során használt pepszin, só és sósav oldatok analitikai tisztaságúak voltak (Spektrum3D), ugyanígy az extrakció során használt etil-acetát, tömény kénsav (96%) és hidrogén-peroxid (36%). Az extrakció lépését követően minden oldat elkészítéséhez ultratiszta vizet használtunk. Az 1000 mg/l-es króm(III) és króm(VI) standardok a Scharlau által készített oldatok voltak.

2.3. Minta-előkészítés és mérés lépései

Minden élelmiszer mintából 5 g-ot mértünk be, amihez 0,5 g pepszint, 2,925 g sót és 50 cm³ 0,01 M sósavat adagoltunk. Ezután a mintát 6 órán át rázógépen rázattuk, leszűrtük majd a GFAAS készüléken az összkróm-tartalmat meghatároztuk.

A króm(VI) méréshez az előző szűrletből kivettünk 10 cm³-t és hozzáadtunk 2,8 cm³ etil-acetátot, majd 10 percig fagyaszóban hűtöttük, hogy a hőmérséklete 10 °C alá csökkenjen. A hűtőből kivéve azonnal hozzáadtunk 40 µl kénsav (96%):víz 1:1 elegyét a pH beállítására. Ezután 50 µl hidrogén-peroxidot (36%) adtunk hozzá és egy percen át intenzíven ráztuk. A fázisok szétválása után a felső szerves fázisból 1 cm³-t vettünk ki és GFAAS készüléken meghatároztuk a króm-tartalmat.

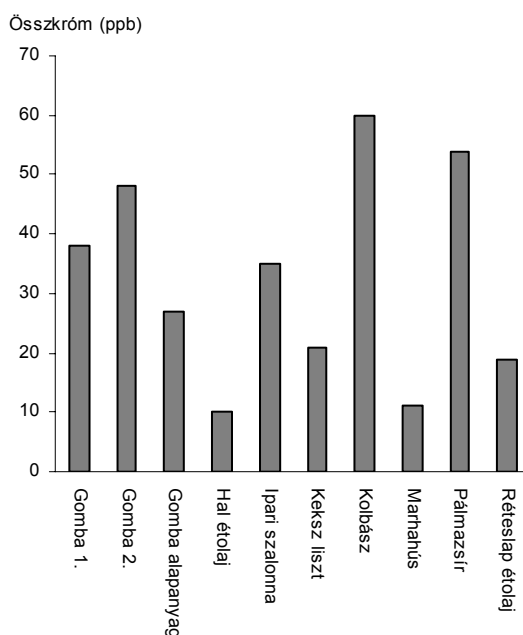
A GFAAS készülék fűtési programja a következő volt: szárítás: 85 °C (5 s), bepárlás 95-120 °C (50 s), hamvasztás 1000 °C (6 s), atomizálás-mérés 2600 °C (1,2 s), kifűtés 2600 °C (4 s). Háttérkorrekciót nem használtunk, az injektált mintamennyiség 10 µl volt és Peak High üzemmódban mértük az abszorbanciát.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

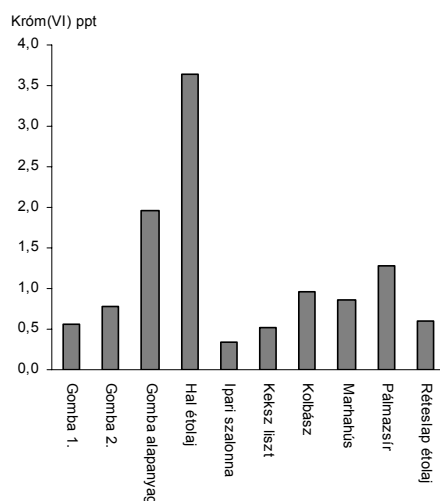
3.1. Mérési eredmények

A [2]-hez hasonlóan a mérés során a következő paraméterek optimális értékének a beállításával foglalkoztunk: hidrogén-peroxid koncentráció, pH, hőmérséklet, reagensek aránya, rázási idő és intenzitás. A hidrogén-peroxid adagolásánál fontos, hogy megfelelő feleslegben legyen jelen, azonban a megfelelő koncentráció elérése után az eredmények nem javulnak tovább. A pH értéke jelentősen befolyásolta a mért koncentrációkat, azonban tizedes pontosságú beállításnál reprodukálhatóak maradtak az eredmények. A minta-előkészítés során fontos volt, hogy a hidrogén-peroxid adagolásánál a minta hőmérséklete 10 °C fok alatt maradjon, ezért a hűtőből kivett mintákat gyorsan kellett kezelni. A nagy mennyiségű szervesanyag tartalom a grafit-kemencés mérést megnehezítette, azonban a hamvasztási idő növelésével a zavarást kompenzálni lehetett.

A módszert tízféle élelmiszer mintán teszteltük, növényi és állati eredetű készítményeken egyaránt (két-féle gomba, gomba alapanyag, halkonzerv étolaj, ipari szalonna, keksz liszt, kolbász, marhahús, pálmazsír, réteslap étolaj). Az összkróm tartalom 10 és 70 ppb közötti értéket mutatott (1. ábra), míg a króm(VI) tartalom (2. ábra) a 0,5-5 ppt közötti tartományba esett.



1. ábra
Összkróm-tartalom



2. ábra
Króm(VI)-tartalom

3.2. Módszer értékelése

A minta-előkészítés során a gyomorbéli emésztés szimulálásának segítségével a környezeti mintákra kidolgozott hidrogén-peroxidos króm(VI) kimutatási eljárást sikeresen adaptáltuk az összetett élelmiszer mintákra.

A kidolgozott eljárás előnyei között sorolhatjuk fel, hogy a *biológiailag hozzáférhető* elemtartalomról ad információt; kimutatási határa kiváló, mivel a grafitkemencés atomizáció három nagyságrenddel érzékenyebb az elterjedt lángatomizációhoz képest; az eljárásnak kis és alacsony árú oldószer igénye van; három nagyságrenddel kisebb mennyiségű króm(VI) is kimutatható a króm(III) mellett.

Azonban néhány továbbfejlesztési lehetőség is felmerült, mint a nagyobb dúsítás, a folyamatos elemzés (a hosszú reakcióidő miatt nehezen kivitelezhető), ill. a veszélyes oldószerek kiváltása (tömény kénsav és hidrogén-peroxid). A próbamérések során végzett eredményekről elmondhatjuk, hogy a biológiailag felvehető króm(III) ppb, a króm(VI) mennyisége ppt nagyságrendű, és ez utóbbi a készülék kimutatási határához közelít.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Élelmiszer mintákban vizsgáltuk a felvehető króm mennyiségét, környezeti mintákra alkalmazott extrakciós eljárás adaptálásával. Az élelmiszerekben a króm(III) és króm(VI) mérését a szervesanyag és só tartalom nehezé teszi. A módszert tízféle élelmiszeren próbáltuk ki. A bemutatott hidrogén-peroxidos eljárás érzékenysége kiváló, a króm(III) mellett három nagyságrenddel kisebb króm(VI) tartalmat is ki tudunk mutatni.

Tervezett további kutatási lépéseink a kénsav és a hidrogén-peroxid kiváltására fókuszálnak egy másik elterjedt ionpároképzési módszer adaptálásával a folyadék-folyadék extrakció megtartásával (ammónium-pirrolidinditiokarbamát (APDC), tetra-butil-ammonium-bromid (TEBA) [1]).

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Az EGERFOOD RET laboratóriumából Lakatos Edinának a minta-előkészítésben és a mérésben nyújtott munkájáért. A Debreceni Egyetem Analitika tanszékéről köszönjük Dr. Posta József egyetemi tanárnak a szakmai hozzájárulását, Béni Áron doktorandusznak a mérésekhez adott útmutatást és Nagy Alida hallgatónak a minta-előkészítésben és mérésben nyújtott segítségét.

IRODALOM

- [1] Gáspár A., Posta J.: On-line multielement preconcentration of chromium(VI) and its determination by flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 354 (1997) 151-158
- [2] Béni Á., Karosi R., Posta J.: Speciation of hexavalent chromium in waters by liquid-liquid extraction and GFAAS determination. *Microchemical Journal* (2006) (In press)
- [3] Katz, S. A.; Salem, H.: *The Biological and Environmental Chemistry of Chromium*, Chap. 2. VCH, New York, 1994.
- [4] Hu, G., Deming, R. L.: Speciation of bio-available chromium in soils by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 535 (2005) 237–242

Bevezető gondolatok az asszociált víz szerkezetének és építőköveinek gráfelméletéhez (I)

Introducing Thoughts to the Graph Theory of Associated Water Structure and the Simplest Constitutive Clusters

Dr. MUZSNAY Csaba ny. egyetemi előadótanár

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia Kar, Analitikai Kémia Tanszék, Kolozsvár/Cluj-Napoca, Arany János u. 11/113; villámlevél: cmuzsnay@chem.ubbcluj.ro

ABSTRACT

Water clusters characterized by hydrogen bonds are very important. Elucidation of structures of the hydrogen bond networks in water clusters by means of graphs are not exceeding 15 years, although the large utilization of graph theory also in chemistry has a story of near 300 years. It was proposed both the systematic and graphical study of the clusters on the basis of the variable valences theory of water. In further treatment there are presented some graphs and matrices of monomer and linear dimer water

1. BEVEZETŐ

A víznek alapvető és meghatározó jelentősége van a földi élet vonatkozásában. létfontossága, rendkívüli elterjedtsége és kiterjedt felhasználása, már a görög elmélkedők figyelmét is felkeltette. Rendkívül nagy számú biológiai, vegyi és környezeti rendszerben játszik szerepet s ezért a kutatások középpontjába került. A szokatlan sajátságoknak elbűvölő területeit villantja fel, úgy tiszta állapotaiban, mint különböző oldataiban [1]. Változatos megjelenési formáira és szerkezetére vonatkozó kiterjedt kutatások dacára még nem sikerült egy olyan egységes, a molekuláris szintű ismeretekre támaszkodó modellt kialakítani, amely összhangban lenne e vegyület nagyszámú és sok esetben rendkívüli sajátságaival. A kis méretű vízklaszterek tanulmányozása nagyon biztató a folyadék víz és a jég szerkezetének, valamint ezek hidrogénkötés rendszerének, alapsabb megismerése szempontjából.

1.1. Nagyon röviden a folyékony vízről és építőköveiről

A vízre vonatkozó eredeti és összefoglaló munkák tömkelegéből arra lehet következtetni, hogy a víz a tudományban rendkívül sok meg nem válaszolt kérdést vetett fel [1, 2]. A vízzel kapcsolatos tudományok terén az utóbbi években is jelentős eredményekről lehet beszámolni. Követhető, pl. a víz klasztereire (építőköveire) vonatkozó számítások, mérések és sajátság jellemzések, az újonnan felfedezett jégfázisok, vagy a nagy mozgékonyágú víz ionjaival kapcsolatos további tisztázások, valamint a túlhűtött, illetve üveges szerkezetű vízről kialakított új felfogás.

A vízre kidolgozott újabb modellek megjelenése mellett a régiak is változtatásokon mentek át. Elfogadott még a keverék modell valamint a folytonos, kontinuum elképzelés új tartalommal és az egymásba való esetleges átjárhatósággal. A víz elképzelt, idealizált, kisebb építőkövei segítségével kialakított új felfogások: a kvantum klaszter egyensúlyi elmélet (QCE), vagy kvantumkémiai építőkövek egyensúlyi modellje, a fluktuáló ikozaéder hálózati és az egyszerű „kettős szerkezet” („two structure”) modell [2]. A víz-ionszorzat hőmérsékletváltozását figyelembevevő egyensúlyi elképzelés legegyszerűbb, ún. M_2 -es modellje a nagyfokú általánosítások és egyszerűsítések ellenére érvényesnek tekinthető és az újabb - esetleg gráfelméleti – elképzelések szerint bővíthető [3 és abban a szerzőre vonatkozó hivatkozások].

A vízmolekulák asszociációja vezet a folyékony víz különleges sajátságainak kialakulásához. A hidrogénkötések létrejötte, átalakulása ezen asszociációs folyamatok lényegét képezik. Tekintettel a hidrogénkötések által meghatározott erőteljesen asszociált víz különleges sajátságaira a vízmolekulák poláros (dipol, kvadrupol) jellegére, a tiszta vízben a nagyon kismértékben fellelhető ion-ion és a nagyobb szereppel bíró ion-dipol kölcsönhatások mellett a dipol-dipol kölcsönhatások rendkívüli előfordulásával kell számolni, mely a vízben sajátos hidrogénkötés-rendszer kialakulását eredményezi.

Érdemes megjegyezni, hogy a víz szerkezetének kutatása, különleges sajátosságainak értelmezése sok buktatót és átmeneti megtorpanást is eredményezett. A XIX-XX század fordulóján a vegyészek felfogása alapján a vízben az egymáshoz kapcsolódó vízmolekulák, ún. „olok” (diol, triol, tetrol, pentol, hexol) találhatóak, melyek tulajdonképpen a klaszterek előfutárai voltak. A fizikusok részéről ez az elképzelés heves ellenzést és elmarasztalást váltott ki, olyannyira, hogy a víz klaszterei csak XX. század közepe után nyerték vissza létjogosultságukat a kutatásban és a mindennapok gyakorlatában.

Jóllehet a hidrogénkötések gyengébbek mint az atomosak, a vízmolekuláknak klaszterekké való kapcsolódása során H-kötés hálózatok jönnek létre, amelyek a vízben viszonylag hosszú ideig létező lokális szerkezeteket képviselnek. Az így kialakuló szerkezetek vagy H-kötéshálózatok száma és mérete meghatározza a klaszterek termodinamikai sajátosságait, viszonylagos energiáit és eredőként a víz termodinamikai adatait.

1.2. A gráfelmélet kialakulásáról és néhány alapfogalmáról

A gráfelmélet kezdete 1735.-re tehető, mikor is Euler svájci matematikus megoldotta a Königsbergi hidak problémáját. A már közismert történet szerint Eulernek az uralkodó megbízásából Königsberg főfolyójának, a Pregelnek két szigete és hét hídja érintésével sétautat kellett terveznie, mégpedig úgy, hogy minden hidat csak egyszer lehessen bejárni. A útvonal "gráfja" csúcsokat és éleket tartalmazott. A csúcsok az érintendő pontok, az él a pontokat összekötő vonalak. Euler, e gráfot vizsgálva, bebizonyította a feladat megoldhatatlanságát.

Van, aki Kirchoff elektromos hálózatokra vonatkozó 1847-ben közölt eredményeihez kapcsolja a gráfelmélet kezdetét. Mások Cayleynek egy 1857.-ben megjelent cikkét tekintik az első gráfelméleti tanulmánynak [12], mely egy szerves-kémiai alkalmazásra vonatkozik. Érdekes módon olyanok is vannak, akik Guthrienek (1850 körül) De Morganhoz intézett kérdéséről számítják a gráfelmélet kezdetét. A nevezetes kérdés a négyszín-sejtés korai megfogalmazása volt (abban az időben főleg a térképek készítésében lehetett jelentősége). Mindenesetre talán elfogadható álláspont az, hogy a gráfelmélet valahol, valamikor megszületett, de ebben az értelemben az 1735-ös kezdet eléggé indokoltnak tekinthető.

A gráf (G) halmazelméleti fogalom, és ezért a gráfelmélet a matematika egyik ágát képezi. Két véges halmazból, csúcsok és él halmazából, áll. Leggyakoribb jelölésük $G = (V, E)$: ahol V (vertex, csúcs, csomópont, töltés, atom, molekula, maga a víz molekula is V- illetve W-vel jelölhető) és E (edge, él, útszakasz, erővonal, kötés, pl. atomos, ionos, vagy H-kötés). Az él csak csúcs párhoz rendelhető. Az adott csúcs fokszámát a becsatlakozó él számával adják meg. A gráfban egyes csúcspárok szomszédosak, mások viszont nem. Ez a szomszédosági viszony illetve gráfszerkezet jellemző a gráfra, amely ezt az információt hordozza [13]. A gráfokat némileg pontatlanul úgy is szokták jellemezni, mint pontok és vonalak halmazát, emlékeztetve a gráfelmélet geometriai, topológiai indíttatására. A gráf szó görög eredetű, jelentése írni. Sylvester, amerikai matematikus (1878), használta először, mint a „chemicograph” – vegyi szerkezeti képlet – rövidített alakját.

Euler, Kirchoff, Cayley által bevezetett egyszerű ábrázolásmódoknak első példái voltak a kémiában alkalmazott szerkezeti képletek is. Az egyre bonyolultabb molekula-szerkezetek felírása, tanulmányozása már a XIX. században elősegítették a gráfelmélet fejlődését. Ezekkel a módszerekkel leelőször Cayley (1874) a telített szénhidrogének szerkezeti izoméreit számolta meg [14a]. Később igyekeztek bonyolult számításokkal az összes izoméretet figyelembe venni. A gráfok vegyészeti alkalmazásának mind kiterjedtebb kutatása jelenleg is folyik [4-7]. Megfigyelhető és jellemző a gráfelméletre, mint a matematika egyik ágának, és a kémia közötti kölcsönös kapcsolatnak a kialakulása illetve állandó erősödése. A gráfelmélet a csúcsok közötti kapcsolódások szabályait vizsgálja, a formák figyelmen kívül hagyásával. Például a négyszögek, a geometria osztályozása szerint, nagyon sokféle lehetnek, ám mint gráf minden négyszög azonos, hiszen mindegyiknek négy csúcsa van, s minden csúcsból a két szomszéd csúcsba fut él.

Az utóbbi 70 évben egyre több tudományterületen alkalmazzák a gráfokat, például elektromos hálózatok és autópálya-rendszerek tervezésében, számítástechnikában, operációkutatásban, vegyipari folyamatokban [5] molekulászerkezet és gyógyszer-kutatásban, é. i. t. . A gráfok felhasználása, eltekintve sokféle megkötéstől, nagyfokú általánosítást tesz lehetővé és olyan általános topológiai modellek, illetve hálózatok (viccesen, pók nélküli hálók) kialakításához vezetnek, amelyekkel tetszőleges elemek és viszonylatok ábrázolhatók, mint például a táplálkozási láncok, gének regulációs hálózatai, a metabolikus útvonalak, a neuronok hálózatai.

A gráfelmélet továbbfejlesztésében nagy számú kelet-közép európai, közöttük magyar kutató is részt vett. Pl. König Dénes – 1936-ban megírta német nyelven az első gráfelméleti könyvet; Pólya György 1937-ben, ugyancsak németül, általános megoldást ír le a gráfok megszámlálására, ezzel a vegyi izomérek számának megadását elméleti alapokra helyezte [6]. Fontos Erdős Pál és Rényi Alfréd nevéhez fűződő véletlen-gráf modell (1959), amelyet később a sejten belüli hálózatok állapotainak modellezésére alkalmaztak (Kauffman, 1992). Eltekintve a teljességre való törekvés igényétől, jelentősek még Gutman (szerb) [7], Balaban (román)

[8], Trinajstić [9, 10] és Radic (horvát), Lukovics [7] és László [11 és a reá vonatkozó hivatkozások] (magyar) kutatók eredményei.

A gráf nemcsak rajz (kép) alakban, de többféle táblázatban mátrixként is megadható. A szakirodalom csak néhány mátrix felhasználását helyezi előtérbe [9]. Egy m csúcsból és n élből álló gráfhoz egy m sorból (minden csúcsnak egy-egy sor felel meg) és n oszlopából álló táblázat rendelhető a következő módon:

a_{11} a_{12} ... a_{1n}	Az a_{ik} a mátrix i -edik sorában és k -edik oszlopában helyet foglaló elemet jelenti.
a_{21} a_{22} ... a_{2n}	A gráf szomszédsági csúcsmátrixa úgy tölthető ki, hogy $a_{ik}=1$, akkor és csak akkor, ha az i és k csúcsokat egy él köti össze, másként $a_{ik}=0$. Ha a gráfban irányított él (vagy élek) található(k), a gráf irányított (directed- vagy di-graph). Az irányított szomszédsági csúcsmátrixban $a_{ik}=1$, akkor és csak akkor, ha az él i -től irányul a k csúcs felé, más esetben $a_{ik}=0$. Ezen gráfokban a csúcsba befutó élek be-fokszámot, míg a csúcsból kifutó élek ki-fokszámot határoznak meg, egyébként $a_{ii} = 0$. Ha a két fokszám felsorolás szerinti különbsége nagyobb 1-nél, akkor a mátrixban is $a_{ik}>1$.
.	
.	
.	
a_{m1} . . . a_{mn}	

Összefoglalva a szomszédsági mátrix előzőekben leírt meghatározását [9 /41 old.]: $a_{ik}=1$ ha a v_i és v_k csúcsok szomszédosak, más esetben $a_{ik} = 0$; egyébként $a_{ii} = 0$. A víz klasztereinek, illetve gráfjainak jövőbeni vizsgálata főleg a következő négyzetes mátrixok felhasználására terjed ki: (1) **SzCs** - Szomszédsági csúcsmátrix: ($v_{\max} \times v_{\max}$); – ahol v_{\max} az adott gráfban figyelembe veendő maximális csúcscsúszám. (2) **SzÉl** – Szomszédsági élmátrix: ($\acute{e}_{\max} \times \acute{e}_{\max}$) – ahol \acute{e}_{\max} az adott gráfban figyelembe veendő élek maximális száma. (3) **TáCs** - Távolsági csúcsmátrix: ($v_{\max} \times v_{\max}$); (4) **Ir** - Irányított gráf- (digráf-) hoz rendelhető csúcsmátrix: ($v_{\max} \times v_{\max}$).

1.3. Vízre vonatkozó gráfelméleti vizsgálatok bemutatása és jelen dolgozat alapfogalmai

A gráfelmélet a múltban nagy mértékben szerves kémiai beállítottságú volt, mivel a gráfok eredményes alkalmazására kezdetben elsősorban a szerves kémiában került sor, csak a legutóbbi századfordulón kezd a figyelem a szervetlen vegyületek felé is irányulni, hisz pl. a víz és az asszociált vízmolekulákhoz, a víz klaszterek szerkezetéhez is rendelhető gráfok. Érdekes módon hosszú ideig erre nem gondoltak.

Az Analitikai Kémia Tanszéken már a 80-as, majd a 90-es évek elején 1-1 államvizsga dolgozat szintjén terítékre kerültek a víz multimerek szerkezetének, izomériájának és megszámlálásának gyakorlati vonatkozásai, bizonyos hasonlóságot – de jelentős különbségeket is - fedezve fel Cayley [14] által több mint egy évszázada a telített szénhidrogénekre alkalmazott módszereivel. 2005-től kezdődően a rendszeres kutatás is beindult [15]. A 90-es évekkal kezdődően, napjainkig a szakirodalomban is megjelent jó néhány közlemény, amely a különböző, kis és nagy számú, vízmolekulát tartalmazó klaszterek sajátosságait vizsgálta kvantumkémiai és gráfelméleti módszerekkel, legtöbbször a kvantumkémiai kutatások kiegészítéseként. A kutatások zöme a vízklaszterek globális minimumának meghatározására irányult – molekulapálya módszert (MO) vagy gyakorlati potenciál függvényt alkalmazva s erre az energia eltolódás (shift) módszerét, a genetikai algoritmusét, a Monte Carlo módszeren alapuló eljárásokat és másokat dolgoztak ki. A számos Monte-Carlo módszernél felvetődik a kérdés, hogy a szimulációk során sikerült-e az összes lehetséges konfigurációt kiválasztani. A sajátmód (eigenmode) módszerrel nagy számú helyi minimumot tudtak lokalizálni a stacionárius vízklaszterek szerkezeteiben az energiafelületek tanulmányozásával. Mivel a klaszter méretével nagy mértékben nő az izomérek és a helyi minimumok száma, kidolgoztak gráfelméletileg alátámasztott generálási technikát pl. a hexamerek kalitkaszerű klasztereire, az oktamerek kocka, illetve a dodekamerek dodekaédeses klasztereire. Ezen esetekben még az is nyitott kérdés, hogy a legkisebb energiával bíró szerkezet valóban a vizsgált multimer globális minimumát képviseli-e.

A vízklaszterek irányított gráfok segítségével történő bemutatása megkönnyíti a gráfelméleti energiaelemzést, a stabilabb spéciesek kiválasztását, összeszámolását, úgy a kicsiny ($1 < n < 9$) mint a nagyobb ($7 < n < 21$) – semleges és protonált – klaszterek esetén és növeli a kvantumkémiai számítások hatékonyságát. Sajátos, mind kiterjedtebb, H-kötés-hálózat valósul meg a víz asszociátumaiban, amelyben az egyes vízmolekula proton donorként vagy akceptorként, esetleg mindkét szerepben felléphet. Legállandóbb szerkezetek $2 < n < 7$ esetén gyűrűsek. A hexamer esetén a hasáb (prizma) és kalitka válnak stabilabbakká.

A szakirodalom áttekintéséből megállapítható: 1) nem érvényesül a hagyományos tárgyalásmód, csak az irányított gráfok használata az elfogadott, mivel egyszerűsíti a tárgyalásokat, 2) a rendszerezés, de bizonyos mértékben a rendszeresség hiánya is tapasztalható a lehetséges vízklaszterek kiválasztásánál és vizsgálatánál, 3) a magas tudományos színvonalra való törekvés elvitathatatlan.

A továbbiakban elvégzendő gráfelméleti és gráfszerkesztési kutatások alapfeltevése szerint a vízmolekulából képződött asszociátumokban, egyrészt változó látszólagos vegyértékkel (1-4) szerepel, másrészt a víz molekulában az O 2-4 míg a H atom 1-2 vegyértékkel (v.é-vel) szerepelhet. Ha a vízmolekula kimeríti teljesen H-kötést kialakító lehetőségeit, akkor látszólag 4 v.é-vel szerepel úgy amint a szénatom különböző

vegyületeinek homológ soraiban, pl. a telített szénhidrogénekben, egyértékű alifás alkoholokban, olefinekben, é. i. t. . Ez a hasonlóság a „vízasszociátumok homológ sorainak” az összeállítását is lehetővé teszi. A jégben a víz, O és H maximális vegyértékei válnak meghatározóvá, a hidrogénkötés-rendszer teljessé válik.

Egyrészt a magános, monomer vízmolekulák kvadrupol jellege, illetve egyszerűsített dipol szerkezete, másrészt a vízmolekulák között kialakuló H-kötések vezetnek a víz asszociációjához, mely a víz különleges sajátságait eredményezi. A vizet alkotó O-nak és H-nak a H-kötések kialakítása során változik (nő) a vegyértéke, az O-nak 2-4 ig míg a H-nak 1-2-ig. Az O atom 1, vagy két új kötést alakít ki, a vízmolekulában szereplő két H atom 1 vagy két H-kötést alakíthat ki. A klaszterek lehetnek atomos (O és H) illetve molekulás (V) csúcsúak.

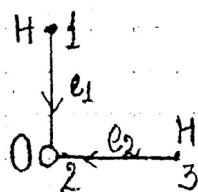
A folyékony vízben növekvő számú vízmolekulát tartalmazó klaszterek rendkívül sok fajtája van jelen. Megszámlálásuk és szerkezeti sajátságaik tisztázása, valamint a folyékony víz globális szerkezetében játszott szerepüknek meghatározása fontos és rendkívül sokrétű feladat. A víz változó vegyértékelmélete segítségével az itt vázolt feladatok egységes, de rendkívül bonyolult tárgyalására adódik lehetőség.

A továbbiakban – a soron következő dolgozatokat is beleszámolva - egy általános gráfelméleti elképzelés – többféle gráfhoz rendelhető nagyon sokféle mátrix – bemutatására és értékelésére kerül sor a víz összes lehetséges klasztereinek számbavétele, a víz összes izomérjeinek összeszámlálása céljából. Jelen dolgozat a víz molekulára és az egyik dimer izomérre vonatkozó gráfot és értékelését mutatja be.

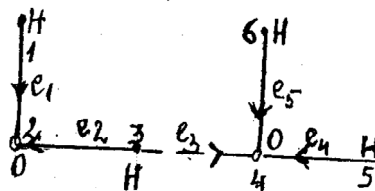
2. A MONOMER ÉS DIMER VÍZ GRÁFJA

A bemutatásra kerülő két gráf a háromatomos vízmolekulára (I. ábra) és a hatatomos lineáris dimer izomérre (II. ábra) vonatkozik. A vízmolekula gráfja, a közismert molekulászerkezetet alapul véve 3 csúcsból (V ~ cs) és 2 élből (E ~ é) áll - jelölése: **(3, 2)**, míg a kiválasztott dimeré **(6,5)**.

I. (3,2)



II (6,5)



A vízmolekula esetén, az 1. 2. fejezetben felsorolt mátrixok közül 2 kerül bemutatásra. A mátrixokat, a belőle levezethető karakterisztikus polinom [13] és a hozzájuk tartozó sajátértékek [15] követik.

(3, 2)SzÉI

(3, 2)SzCs

$$a := \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \quad x^2 - 1 ; \quad 1, -1$$

$$a := \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad x^3 - 2x ; \quad 0, \sqrt{2}, -\sqrt{2}$$

A továbbiakban látható a lineáris dimer gráfjára (2. ábra) felírt Szomszédsági Élmátrix, ezt követi a karakterisztikus polinom, majd a sajátértékek. Tekintve, hogy a sajátértékek megadási formája ez esetben bonyolult, a függvényábrázolás révén könnyen leolvasható az öt sajátérték (gyök).

(6, 5)DiSzÉI

$$a := \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

$$x^5 - 5x^3 - 2x^2 + 4x + 2 ; \quad \sim 1.67, -1.00, \sim -0.55, 1.00, \sim 2.20$$

3. KÖVETKEZTETÉSEK, KUTATÁSI CÉLOK

A mátrix felírások és számítások bonyolódnak a csúcs-, illetve az él-szám növekedésével. Ez esetben csak 2, 3, és ötöd rendű mátrixok szerepeltek. A sajátértékek valós számok és a gráf spektrumát képezik. A karakterisztikus polinomok ugyanazon gráf esetén is különbözőek lehetnek. Megvizsgálendók a monomer víz bonyolultabb, esetleg nem atomszerkezeten alapuló gráfjai. A víz dimerjeinek mind az 5 izomérére felirandók

az ajánlott mátrixok, sőt növelendő a felhasználandó mátrixtipusok száma. Kutatandó a karakterisztikus polinom és sajátértékeinek alapvető értelmezése.

4. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönet Kása Zoltán Professzor Úrnak a tanácsokért és támogatásért.

5. HIVATKOZÁSOK

- [1.] M. Chaplin, „Water Structure and Behavior”; <http://www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html>;
(<http://www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html>) - rendszeresen és gyakran felújított fejezetekkel.
- [2.] L.Ralf, „Water: From Clusters to the Bulk”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 1808-1827.
- [3.] Muzsnay Csaba, „A víz és néhány víztartalmú biner elegy hidrogénkötés-rendszerének változása a hőmérséklettel illetve összetétellel”; VII. Vegyészkonferencia – Plenáris előadás, Félixfürdő, 2001. november 16-18; 16-19 old.
- [4.] Read R.C., „Chemical Application of Graph Theory ” Edit. Balaban, A.T., Academic Press, London, 1976.
- [5.] Veress Gábor, „A gráfelmélet és vegyipari alkalmazása”, *Magyar Kémikusok Lapja*, 1970, 25 (4) 218-223.
- [6.] Pólya György, „Kombinatorische Anzahlbestimmungen für Gruppen, Graphen, und chemische Verbindungen”; *Acta Math.* 1937, 68, 145-254.
- [7.] Gutman Iván, és Lukovits István, „A gráfelmélet kémiai alkalmazásairól”, *Magyar Kémikusok Lapja*, 1995, 50 (12) 513-518.
- [8.] Balaban, A. T. (Editor), „Chemical Applications of Graph Theory”; Academic Press, London, New York, 1976.
- [9.] Trinajstić, N., „Chemical Graph Theory ”, CRC Press, Boca Raton, 2nd edn, 1992.
- [10.] Trinajstić, N., Zivković, T., *Kémiai Közl.* 1975, 44, 460.
- [11.] László István, „Topological Aspects Beyond the Hückel Theory”, *Internet Electr. J. Mol. Des.* 2004, 3(4) 1-8.
- [12.] Cayley, A., *Philos. Mag.*, 1857, 13, 172.
- [13.] Cseke Vilmos, „A gráfelmélet és gyakorlati alkalmazásai”, Tudományos Könyvkiadó, Bukarest, 1962.
- [14.] a) Cayley, A., *Philos. Mag.*, 1874, 47, 444; b) Cayley, A., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1875, 8, 1056; c) Cayley, A., *Philos. Mag.*, 1877, Ser. 5, 3, 34; d) Cayley, A., *Q. J. Math.*, 1889, 23, 376.
- [15.] a) Muzsnay Cs., „Bevezető gondolatok az asszociált víz szerkezetének gráfelméletéhez”, EME Konferencia 2005. nov. 19. Kolozsvár, 41; b) Muzsnay Cs., „A folyékony víz szerkezetének gráfelméleti vonatkozásai I. Kicsiny vízmolekula asszociátumok ($n < 6$) vizsgálata”, XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, 2006. Október 3-8; c) Muzsnay Cs., „A víz és a kis vízklaszterek ($6 > n > 1$) különböző gráfjairól” EME Tudományos ülésszak, Kolozsvár, 2006. nov. 25.

Rokon szerkezetű molekulák hatása az enantiomer felismerésre a rezolválás folyamataiban III.

The Effect of Structurally Related Molecules on the Enantiomer Recognition During the Resolution III.

PÁLOVICS Emese¹, SCHINDLER József¹, BORSODI János², BERECZKI Laura³, MARTHI Katalin³, FAIGL Ferenc², FOGASSY Elemér²

¹ MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport,

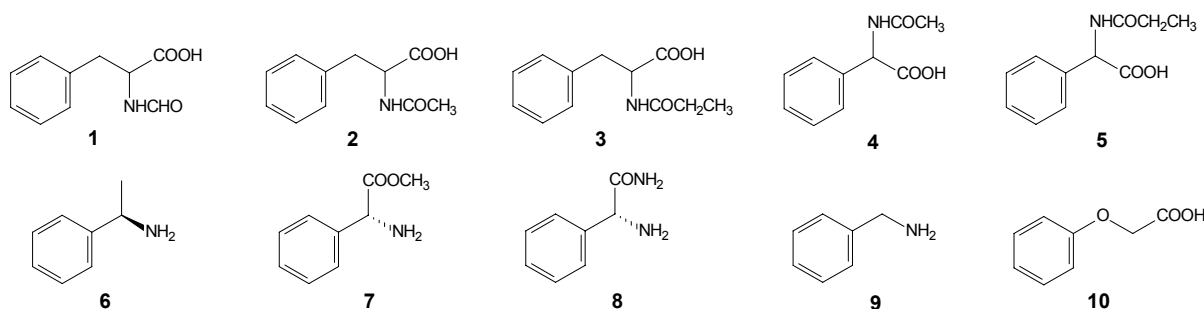
² BME Szerves Kémiai Technológia Tanszék,
H-1111 Budapest, Budafoki út 8.,

³ BME Analitikai Tanszék, H-1111 Budapest, Szt. Gellért tér 4.

ABSTRACT

Potential resolving agents of a given racemate can be structurally similar, optically active relatives of the parent racemic compound, especially when one of them is also structurally similar to the racemic compound. When the resolution is carried out with the mixture of two compounds having a similar structure—even though one of them is achiral—better optical purity can be obtained than with the use of a unique resolving agent with the same molar ratio. Structurally similar molecules increase the enantiomer recognition ability of the favourable reagent with their presence. One of the methods for preparation of an optically pure enantiomer is the recrystallization of the diastereoisomeric salt several times however, an economic process can only be based on the selective separation of the enantiomer mixtures.

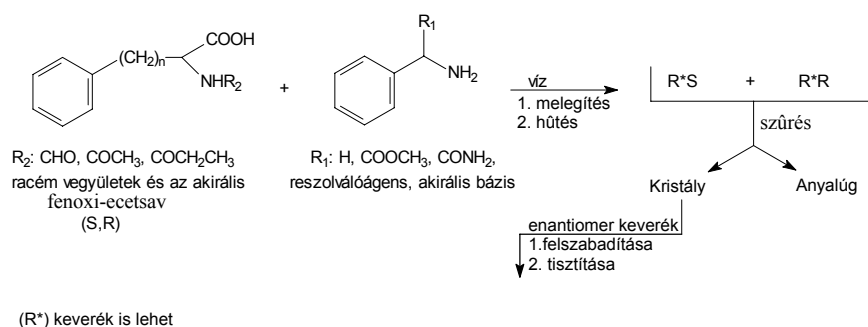
A királis vegyületek előállításának az egyik legjobban vizsgált és napjainkban még legfontosabb módszere a szintézisek során keletkezett vegyületeket képező enantiomerek elválasztása, a rezolválás [1]. A racém vegyületek rezolválására különböző eljárásokat írtak le [2-3].



1. ábra

Racém és az akirális vegyületek valamint a rezolválóágensek

Az 1-10 vegyületek közül (1. ábra) a savak és bázisok egymáshoz viszonyítva rokon molekulaszervezeti részeket tartalmaznak [4-7], egyfelől a glicin fenil- ill. benzil- származékai, másfelől többen a benzilamin származékai. A két akirális vegyület közül esetenként a benzilamin a bázikus karakterű rezolválóágensek, a fenoxi-ecetsav a racém vegyületek egy részét, a felét helyettesíti. Ily módon minden esetben vizes oldatban melegítve semleges sókat képeztünk. Lehűtve, a kristályos diasztereomer sót szűréssel elkülönítettük a jobban oldódó párjától (2. ábra). A diasztereomer sókból vizes oldatban sósavval szabadítottuk fel az enantiomer keverékeket, melyek közül a kristályos diasztereomer sókból kaptak eredményeit az 1.táblázatban foglaltuk össze.




2. ábra
A rezolválás folyamatai

Mindhárom rezolválóágenssel rezolválni lehet a racém fenil alanin és a racém fenilglicin valamelyik származékát. A fenil-etilaminnal (**6**) a formil-fenilalanin (**1**) enantiomerjeit csaknem tisztán (ee>95%) lehet előállítani, míg a sokkal polárisabb fenil-glicin metilészterrel (**7**) és a fenilglicinamiddal (**8**) 75-100% os ee – szel lehet a formil- és az acetilszármazékokat ((**1**), (**2**) és (**4**)) rezolválni. A propionil származékokat 33-68% között ee-szel választhatjuk el.

Figyelemreméltó a „Holland rezolválás” érvényesülése a **6** és **7** keverék esetében az **1** racémnél 75,4 helyett a 76,0%-os ee, ill. a **4** racémnél a 0,546 helyett a 0,600 rezolválhatóság.

A kristályos szilárd fázisból kapott enantiomer keverékek eredményei

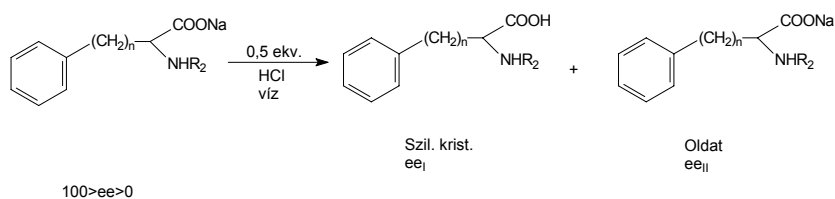
1. táblázat.

R ₁	R ₂														
	n: 1									n: 0					
	1 CHO			2 COCH ₃			3 CO CH ₂ CH ₃			4 COCH ₃			5 COCH ₂ CH ₃		
	konf.	ee	F	konf.	ee	F	konf.	ee	F	konf.	ee	F	konf.	ee	F
CH ₃ 6	R	95,1	0,419	R	5,0	0,051	-	-	-	R	9,8	0,082	-	-	-
CH ₃ /H 1:1 6/9	R	74,7	0,255	-	-	-	-	-	-	R	26,2	0,119	-	-	-
CH ₃ /  1:1 6/10	-	-	-	S	87,5	0,536	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COOCH ₃ 7	R	75,4	0,407	S	55,6	0,778	S	33,5	0,287	S	81,0	0,469	S	68,5	0,239
COOCH ₃ /H 1:1 7/9	R	74,5	0,373	S	95,0	0,190	-	-	-	S	85,1	0,546	-	-	-
CONH ₂ 8	-	-	-	S	100	0,760	R	33,8	0,068	-	-	-	R	62,5	0,113
CONH ₂ /H 1:1 8/9	-	-	-	S	100	0,810	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH ₃ /COOCH ₃ 1:1 6/7	R	76,0	0,304	S	2,5	0,034	-	-	-	S	75,0	0,600	-	-	-
COOCH ₃ /CONH ₂ 1:1 7/8	-	-	-	S	100	0,790	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A **4** racém vegyület **6** reagenssel végzett rezolválásakor a **9** akirális vegyület alkalmazása az ee értékét 9,8-ról 26,2-re növelte. A **2** esetében a rezolválás eredménye (F= ee × T) igen jelentősen (55,6→95,0), a **4** racém vegyület esetében előnyösen változik (0,469→0,546).

Ha a racém vegyület **2** mellé a **10** akirális savat mérjük be és ezt a keveréket a **6** feniletillaminnal rezolváljuk akkor igen szembetűnő mind az ee (5,0→87,5%), mind a rezolválás eredményének (0,051→0,538) a jelentős megnövekedése. Miután az **1-5** racém vegyületek sorában a többi rezolválóágenssel szemben, csak az **1** rezolválása oldható meg jó ee és rezolválhatósági értékkel a **6** rezolválóágenssel. Feltételezzük, hogy noha, mint mindegyik rezolválás esetében a racém vegyület *R* enantiomerje képezi a vizsgált rezolválóágenssel a stabilabb diasztereomer sót, de a **6** rezolválóágenssel az **1**-racém *R* enantiomerje gyorsan kristályosodik és legfeljebb egy órai állás után elkülönítettük a kivált diasztereomer sót, így nem volt idő a lényegesen kedvezőtlenebb termodinamikai egyensúly beállítására, amire utal a **2** és **4** racém vegyületek **6** reagenssel végzett rezolválások egybecsengő kedvezőtlen eredménye is.

Vegyületeiknél általánosan alkalmazható módszernek a bázissal semlegesített enantiomer keverékek vizes oldatának a frakcionált sósavvá kicsapása bizonyult (4. ábra).



3. ábra
Az enantiomer keverékek frakcionált elválasztása

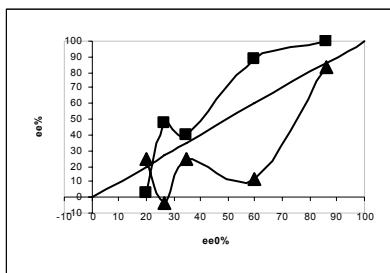
Enantiomer keverékek semleges oldatának frakcionált kicsapása

3. táblázat

Enantiomer kev.	ee ₀ %	ee% I frakció	ee% II frakció	Racemátokat képeznek
Fo-FA 1	49,6 73,4	19,3 70,8	75,0 68,0	Az eutektikumon nem lehet átjutni
Ac-FA 2	45,0 78,2	6,0 6,7	59,6 100	Konglomerátum
Pr-FA 3	20,0 24,7 34,8 59,6 88,8	2,8 44,4 36,5 92,0 100	23,6 -4,4 22,5 12,3 84,3	A kísérleti v. kinetikus eutektikum ee ₀ 20% és 36% közelében van, de ezt a kristályosodás kinetikája idézi elő. A feleslegben lévő enantiomer kristály katalizálja a kiválást. A termodinamikai eutektikum feljebb van.
Ac-FG 4	63,6 89,1	52,6 76,8	86,2 86,6	Az eutektikumon nem lehet így átjutni
Pr-FG 5	10,0 12,6 15,0 25,0 35,0 50,0 75,0 90,0	5,1 26,9 37,8 26,9 59,0 82,7 89,1 91,0	16,7 -3,8 -5,1 0,8 0,8 0,8 16,0 75,0	A kísérleti v. kinetikus eutektikum ee ₀ 11% és 25% közelében van, és a termodinamikai eutektikum itt is lényegesen lejjebb van.

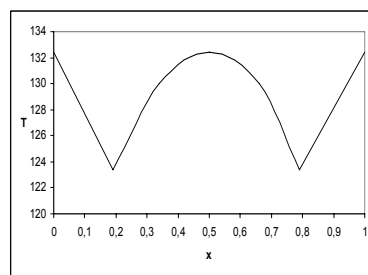
Ha az enantiomer keverékek semleges vizes oldatainak a kicsapását (sósavval) két részletben végezzük, akkor mindegyik vegyület enantiomer keverékei racemátként viselkednek. Az **1** enantiomer keverékek eutektikuma 68-75%-os ee₀-nál alakul ki, de ilyen módszerrel ezt nem tudjuk meghaladni. A **2** enantiomer keverékek esetében az eutektikumot nem mértük ki de az 45,0% ee₀ alatt lehet. A **4** vegyület enantiomer keverékei 76-89%-os ee₀-nál képeznek eutektikumot és ezzel a módszerrel ezt sem tudjuk meghaladni.

A **3** és **5** vegyületek enantiomer keverékei a kicsapás során, a kivált enantiomer felesleg katalitikus hatására „kinetikus eutektikumok” jelentkeznek, a **3** enantiomer keverékek (4-5. ábrák) esetében 20 és 36%-os ee₀-nál, az **5** enantiomer keverékek (6-7. ábrák) esetében 11 és 25%-os ee₀ értékeknél. A két enantiomerkeverék sorozat esetében a termodinamikailag kimérhető eutektikum a **3** enantiomerkeverékek esetében ee₀~60%-nál és az **5** enantiomerkeverékek esetében ee₀~6%-nál van.



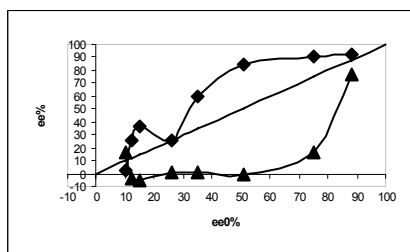
4. ábra

A Pr-FA (3) keverékek frakcionált elválasztása



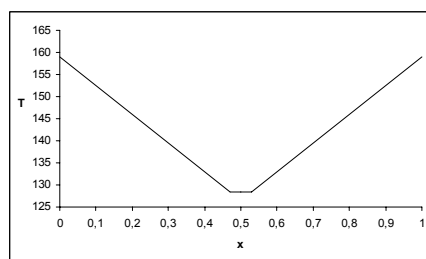
5. ábra

A Pr-FA (3) keverékek biner fázisdiagrammja



6. ábra

A Pr-FG (5) keverékek frakcionált elválasztása



7. ábra

A Pr-FG (5) keverékek biner fázisdiagrammja

Általánosan megállapítható, hogy az általunk vizsgált enantiomer elválasztási folyamatok nem jellemezhetők lineáris összefüggésekkel [8], [9].

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak az OTKA (T 42725), valamint az Európai Unió és a Magyar Állam által támogatott GVOP 3.2.2.2004-07-0006/3.0 projektek által nyújtott segítségért

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] a. Sheldon, R. A.: *Chirotechnology*, Dekker, New York 1995.
b. Jacques, I., Collet, A., Wilen, S.H., *Enantiomers, racemates, and resolutions* Wiley, New York, 1981.
c. Kozma, D.: *Optical resolutions via diastereomeric salt formation* CRC Press, London, 2002.
d. Newman, P.: *Optical resolution procedures for chemical compounds I-IV*, O.R.I.C. Manhattan College Riverdale, New York I-IV, 1978-1984.
- [2] a 193 201 sz. magyar találmányi leírás 1984, CAN:104:168835.
b 193 202 sz. magyar találmányi leírás 1984, CAN:104:168835.
- [3] Kozma D, Fogassy E. Preparative methods for enantiomeric enrichment of non-racemic enantiomeric mixtures. *Enantiomer* 1997, 2, 51-59.
- [4] Kozma, D., Pokol, Gy., Ács, M.: Calculation of the efficiency of optical resolution on the basis of the binary phase diagram for the diastereomeric salts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1992, 435-439.
- [5] Kaptein, B., Elsenberg, H., Grimbergen, R. F.P., Broxterman, Q. B., Hulshof, L. A., Vries, T.: Dutch resolution of racemic 4-hydroxy- and 4-fluorophenylglycine with mixtures of phenylglycine and (+)-10-camporsulfonic acid, *Tetrahedron Asymmetry*, 2000, 11, 1343-1351.
- [6] W. J. Pope and S. J. Peachey, *J. Chem. Soc.* 1899, 75, 1066
- [7] a. Fogassy, E., Pálovics, E., Schindler, J.: The effect of structurally related molecules on the enantiomer recognition during the resolution, 10th International conference of chemistry (Cluj) 2004, 342-346.
b. Fogassy, E., Pálovics, E., Schindler, J.: The effect of structurally related molecules on the enantiomer recognition during the resolution II, 11th International conference of chemistry (Cluj) 2005, 357-362.
- [8] Fogassy E, Nógrádi M, Pálovics E, Schindler J. Resolution of enantiomers by non-conventional methods. *Synthesis* 2005, 10, 1556-1568.
- [9] Fogassy E, Nógrádi M, Kozma D, Egri G, Pálovics E, Kiss V. Optical resolution methods. *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, 3011 – 3030.

A konjugált linolsav antioxidáns hatásának vizsgálata egy modell kísérletben

Examination of the Antioxidant Effect of Conjugated Linoleic Acid During a Model Experiment

SALAMON Rozália¹, GYŐRI Anikó², GYŐRI Zoltán², LÓKI Katalin³, SÁRA Péter³, SALAMON Szidónia¹, CSAPÓNÉ KISS Zsuzsanna³, CSAPÓ János^{1,3}

¹EMTE Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszer-tudományi Tanszék, RO-4100 Csíkszereda, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-314-657, fax: 40-266-372-099; salamonrozalia@sapientia.sicorum.ro

²Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum, H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138., Tel.: 36-52-417-572, fax: 36-52-417-572; gyori@agr.unideb.hu, www.agr.unideb.hu

³Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kémiai-Biokémiai Tanszék, H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40. Tel.: 36-82-314-155, fax: 36-82-321-749, e-mail: csapo@mail.atk.u-kaposvar.hu; www.u-kaposvar.hu

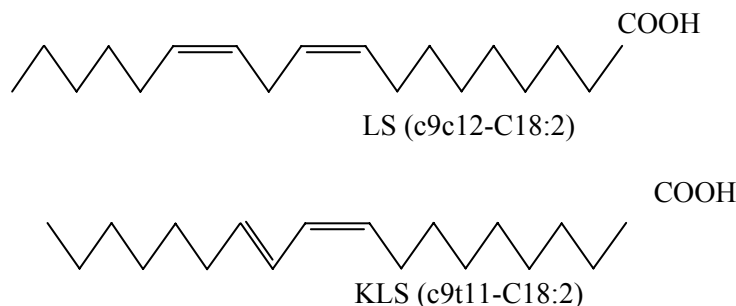
ABSTRACT

Corn milled like flour was crumbled with 5% butter containing high level of conjugated linoleic acid (CLA), then it was kept on free air on an aluminum tray in a thick layer of 1 cm and its acid number, peroxide number and fatty acid composition was measured every week. We established that during a 24 week long period there was very little change in the composition of fatty acids, but after this, in parallel with the increasing of acid number and peroxide number, the amount of unsaturated fatty acids decreased, while the saturated ones did not change considerably. With our investigations we wished to point out the antioxidant effect of the conjugated linoleic acid.

Keywords: conjugated linoleic acid, CLA, antioxidant effect, ghee, gaschromatography

1. BEVEZETÉS

A konjugált linolsav megnevezés azon linolsav-izomerek (szerkezeti és geometriai izomerek) gyűjtőneve, amelyek a linolsavval szemben nem izolált, hanem konjugált helyzetben tartalmaznak két kettős kötést. A kettős kötések többnyire a 9, 11, vagy a 10, 12 helyzetben találhatóak [1], de egyéb pozíciókban (8, 11; vagy 11, 13) is előfordulhatnak [2]. Mindkét kettős kötés lehet *cisz* (*c*), vagy *transz* (*t*) konfigurációjú (1. ábra).



1. ábra

A linolsav és a konjugált linolsav képlete

A KLS a természetben főként a többszörösen telítetlen zsírsavak biológiai hidrogénezése során termelődik. Ez a bakteriális enzimtevékenység főként a kérődző állatok bendőjében zajlik [3], és feltételezik, hogy a patkányok bélcsatornájában található mikrobák is képesek a szabad linolsavat c9t11 konjugált linolsavvá alakítani. A leggyakrabban előforduló természetes CLA-izomer a C9t11-C18:2 [4], amely a c9t12 linolsav biológiai hidrogénezésének első lépésében keletkezik. A *Butyrivibrio fibrisolvens* baktérium mikrobiális izomeráz enzimének hatására a linolsavból (c9c12-C18:2) először konjugált linolsav (c9c11-C18:2) képződik, majd a c9 kettős kötés két hidrogénatom felvételével telítődik és így egy egyszeresen telítetlen zsírsav (t11-C18:1) jön létre. Ez további hidrogénezéssel sztearinsavvá (C18:0) alakulhat át [5].

Újabb vizsgálatok eredményei alapján feltételezni lehet, hogy a CLA a transz-C18:1 zsírsavakból is kialakulhat a tehenek tejmirigyében [6], vagy a patkányok májában [7], a $\Delta 9$ -deszaturáz-reakcióval [8].

A konjugált linolsavak kémiai reakciókban – enzimek közreműködése nélkül is – kialakulhatnak a linolsavban gazdag olajok lúgos izomerizációja, vagy a ricinusolaj víztelenítése közben [9]. A linolsav *in vivo* szabadgyökös autooxidációja során is keletkezhet CLA, nagy kéntartalmú fehérjék jelenlétében. Egy olyan szintézismódszert is kifejlesztettek, amellyel metil-c9t11-CLA-t lehet előállítani ricinusolajból nyert ricinus-sav-metil-észterből [10].

A vaj egy különleges élelmiszer, hisz benne konjugált linolsavon kívül nagy mennyiségben található rövid szénláncú zsírsavak is. Különösen magas a felfőzött vaj (ghee) KLS-tartalma, mely a főzés során közölt energia hatására alakul ki. Előszeretettel alkalmazzák ezt a technológiát a fejlődő világ országaiban, elsősorban Indiában, ahol a vaj számít a legfontosabb állati eredetű zsírforrásnak. Kísérletekkel igazolták [11], hogy az indiai ghee KLS-szintjét nagyban befolyásolja annak előállítás módja. A KLS mennyisége akár ötszöröse is növelhető az előállítás során. Sikerült 0,5–0,6 g/100g zsír KLS-t tartalmazó tehéntej nyersanyagból 2,5–2,8 g/100g zsír KLS-tartalmú ghee-t előállítani. A KLS-tartalom növekedéséért részben az alvadékképzés során fellépő mikrobiális fermentáció tehető felelőssé, de a KLS-tartalmat befolyásolta a szűrés hőmérséklete is, ugyanis magasabb hőmérsékleten (120 °C) több KLS keletkezett, mint alacsonyabb hőmérsékleten (110 °C). A ghee gyártása folyamán alkalmazott hőközléssel járó folyamatok, fehérje jelenlétében, minden kétséget kizáróan felelőssé tehetőek a KLS-szint növekedéséért.

A konjugált linolsavak (KLS) antioxidáns hatásáról több közlemény jelent meg [12-15]. Egyesek szerint a konjugált linolsav a sejtmembránba beépülve megvédi azt az agresszív szabadgyökök támadásától, melynek következtében megakadályozza a sejtek kóros elburjánzását. A KLS elsősorban az állati eredetű élelmiszerekben, ezen belül is a kérődzők húsában, tejében és a tejből készült tejtermékekben fordul elő nagyobb koncentrációban. A konjugált linolsav eredete lehet a bendőben zajló mikrobiális tevékenység, melynek során jelentős mennyiségű KLS keletkezhet, de a konjugált linolsav kialakulhat linolsavból is a napfény ultraibolya sugarainak hatására, és különösen monogasztrikus állatoknál a takarmány KLS-tartalma is jelentős hatással lehet az állati test konjugáltlinolsav-összetételére.

Fentiek miatt határoztuk el, hogy vizsgáljuk a ghee technológia során kapott magasabb KLS-tartalmú vaj antioxidáns hatását a kukoricadara esetében. Azért a kukoricadarát választottuk vizsgálatunk tárgyául, mert annak avasodása – a nagy koncentrációban jelenlévő linolsav miatt – rendkívül gyorsan zajlik le. Feltételezéseink szerint amennyiben a konjugált linolsav képes meggátolni a kukoricadara avasodását, nagy valószínűséggel más élelmiszer, illetve takarmány alapanyag avasodását is jótékonyan gátolhatja.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A ghee előállítása és kukoricadarához történő keverése

A szakirodalomban közölt módszerek alapján a vajat 50 literes zsírfőző üstben felolvasztottuk, és addig forraltuk ameddig habmentessé nem vált. A habot folyamatosan leszedtük, a felfőzött vajat pedig műanyag zsákokban tároltuk a kukoricadarához történő keverésig.

A kukoricadarát lisztfinomságúra megőröltük, majd 5% mennyiségben a konjugáltlinolsav-tartalomban megnövelt vajat kevertük hozzá. Alapos összekeverés, illetve eldörzsölés után a keveréket selyempapírral bélelt alumíniumtálcára öntöttük, kb. 1 cm vastagságú rétegre elterítettük, a felületét pedig az oxidáció felgyorsítására ill. a levegővel való jobb érintkezés érdekében egy fakeverővel naponta folyamatosan átkevertük. A keveréket 40 hétig 20 °C-on tartottuk, melynek során hetente meghatároztuk a savszámot és a peroxidszámot, a zsírsavösszetételt, beleértve a konjugált linolsavat is.

2.2. Kémiai analízis

A minták savszámát és peroxidszámát a Magyar Szabványnak (MSZ 683011) megfelelően végeztük.

2.2.1. A tejsír zsírsav-összetételének meghatározása

Előkészítés bór-trifluoridos átészterezéshez. Körülbelül 0,5–1 g zsírt tartalmazó mintát 8–20 cm³ tömény sósavval forró vízfürdőn egy órán keresztül roncsoltuk. Miután lehűlt, 7 cm³ etanolt adtunk hozzá. A lipideket előbb 15 cm³ éterrel, majd 15 cm³ petroléterrel (f.p.<60 °C) extraháltuk, majd a szerves fázisokat egyesítettük. Ebből annyit töltöttünk egy csiszolatos gömblombikba, amely kb. 150–200 mg zsírt tartalmazott, majd rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottuk az oldószert. A teljes bepárlás nem szükséges.

Hidrolízis és észterképzés. A bepárolt mintához 4 cm³ 0,5 M metanolos nátrium-hidroxid-oldatot öntöttünk, visszafolyó hűtőt szereltünk a gömblombikra, és elektromos melegítőn forraltuk addig, amíg az aljáról a zsírcseppek el nem tűntek (kb. 5 perc). Ezután a hűtőn keresztül 4 cm³ 14%-os metanolos bór-trifluorid-oldatot öntöttünk a lombikba, és három percig forraltuk. Négy cm³ nátrium-szulfáton szárított hexánt adtunk hozzá, egy percig forraltuk, majd lehűtöttük. Lehűlés után levettük a hűtőt, és annyi telített vizes sóoldatot öntöttünk a lombikba, hogy a szerves fázis a nyakába kerüljön. Szétválás után a szerves fázisból mintát vettünk vízmentes nátrium-szulfátot tartalmazó fiolákba, és ebből injektáltunk a gázkromatográfba.

A gázkromatográfiás analízis körülményei: Készülék: Chrompack CP 9000 gázkromatográf; kolonna: 100 m x 0,25 mm kvarc kapilláris, CS-Sil 88 (FAME) állófázis; detektor: FID 270 °C; injektor: splitter 270 °C; vivőgáz: hélium, 235 kPa; hőmérséklet-program: kolonna 140 °C, 10 percig; 10 °C/perc emelés 235 °C-ig, izoterm 26 percig; injektált oldat térfogata: 0,5–2 µl. A zsírsav-metil-észterek azonosítására a következő standardet használtuk: „37 component FAME Mix”, melynek gyártója és forgalmazója a Supelco cég.

2.2.2. A tejsír konjugáltlinolsav-tartalmának meghatározása

Lipid-extrakció. Kb. 0,3 g zsírt tartalmazó tejet bemértünk egy 100 cm³-es főzőpohárba, majd 80 cm³ szerves oldószerelegyet (hexán:i-propanol 3:2 arányú elegye, HIP) adtunk hozzá. Diszperziós készülékkel a mintát eloszlattuk a folyadékfázisban (IKA gyártmányú, Ultra-turrax T25 basic típusú diszperziós készülék, 2. fokozat (9500 RPM), 2 perc). Ezt követően a szuszpenziót membránszűrőn keresztül (MN640W típus, 90 mm átmérő) gravitációs úton 250 cm³-es Erlenmeyer lombikba szűrtük. A szűrőt háromszor 10 cm³ HIP eleggyel átmostuk, a szerves fázisokat egyesítettük. A szűrletekhez 5,0 g vízmentes nátrium-szulfátot tettünk és összeráztuk. A mintából származó víz megkötése után a szerves fázist a sőről talpas gömblombikba leöntöttük, majd rotációs gyorsbepárlón vákuum alatt 80 °C-on bepároltuk. A bepárlási maradékot n-hexánnal 10 cm³-es mérőlombikba mostuk (hexános törzsoldat).

Metilezés. A hexános törzsoldatból kivettünk 0,5 cm³-t, 4 cm³-es, lezárható fedelű üvegcsébe tettük, majd 0,5 cm³ 4 M metanolos nátrium-metilát-oldatot adtunk hozzá, összeráztuk, majd 50 °C-on 30 percen át melegítettük. Ezt követően 1 cm³ hexánt, majd 1 cm³ vizet adtunk hozzá, összeráztuk, a fázisok elválása után a szerves fázisból 1 cm³-t 5 cm³-es mérőlombikba tettünk, majd a vizes fázishoz 1,2 cm³ hexánt adtunk, összerázzuk, majd 1 cm³ hexános fázist a mérőlombikba vittük át. A hexános extrakciót a fentén kívül még kétszer megismételtük, az utolsó hexános fázis elvételénél lehetőség szerint a teljes felső fázist eltávolítottuk, majd a lombikot jelre töltöttük, és az így kapott oldatot csavaros tetejű fiolában mélyhűtve tároltuk az analízis megkezdéséig.

Kromatográfiás körülmények. Hőmérséklet-program: kolonna 140 °C, 10 percig; 5 °C/perc emelés 235 °C-ig, izoterm 30 percig. Injektált oldat térfogata: 2 µl. Az egyéb körülmények azonosak a zsírsav-összetétel meghatározásánál leírtakkal. A standard törzsoldat és a kalibrációs sor készítésére alkalmas bármely gyártó által forgalomba hozott konjugált linolsav-készítmény (pl. a Sigma cég által forgalmazott konjugált linolsav-elegy).

3. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A vaj KLS tartalma a felfőzés előtt 0,56% volt a zsírsav-metilészterek relatív tömegszázalékában mérve, mely a ghee készítés során 1,68%-ra nőtt. A kukoricadarával összekeverve a kapott zsíros anyag konjugáltlinolsav-tartalmát 0,36%-nak mértük, tehát maga a kukoricadara is tartalmazott minimális mennyiségben konjugált linolsavat.

A savszám és a peroxidszám változását elemezve megállapítottuk, hogy a peroxidszám 20 hét alatt, a kísérlet kezdetén mért 7-ről 50-re, a savszám pedig ugyanezen időszakban 5-ről 10-re nőtt. A tárolás 20. és 40. hete között a peroxidszám 50-ről 229-re, a savszám pedig 10-ről 39-re nőtt. A 40. hét után kísérleteinket nem terveztük folytatni, hisz 40 hét alatt az élelmiszerek és a takarmányok többségét felhasználják, a 40. hetet meghaladó felhasználásra csak nagyon ritkán kerül sor.

Vizsgálatainkból levonhatjuk azt a következtetést, hogy 20 héten keresztül sem a peroxidszám, sem a savszám nem haladta meg a szabvány által előírt még megengedhető értéket, tehát a megnövelt KLS-tartalmú

vaj 20 héten át meggátolta az avasodásra rendkívül hajlamos kukoricadara romlását. A 20. hetet követően a peroxidszám rohamosan elkezdett növekedni, azonban a savszám még a tárolás 40. hetében is csak 39-es értéket ért el.

A tárolás első 20 hetében a konjugáltlinolsav-tartalom 0,30%-ról 0,26%-ra csökkent. Ugyanezen idő alatt a linolsav 28,6%-ról 27,5%-ra csökkent, az olajsav- és a linolénsav-tartalom alig változott, és ugyancsak változatlanok maradtak a rövid, a közepes és a hosszú szénláncú telített zsírsavak is. A tárolás 20. és 40. hete között a KLS-tartalom 0,26%-ról 0,11%-ra, a linolsav-tartalom 27–28%-ról 23–24%-ra, a linolénsav-tartalom pedig 0,89%-ról 0,65%-ra csökkent, és még ebben az időszakban sem változott lényegesen az olajsav mennyisége, valamint a telített zsírsavak aránya.

Kísérleteinkből tehát levonhatjuk azt a következtetést, hogy az összes többszörösen telített zsírsav közül a konjugált linolsav a legérzékenyebb az oxidációra, tehát az ő antioxidáns hatása a legnagyobb. Talán a megnövelt KLS-tartalomnak köszönhetően az ember számára esszenciális linolsav és félig esszenciális linolénsav mennyisége alig változott a tárolás első hetében, és a változás a tárolás 20. hete után is arányaiban elhanyagolható volt a konjugált linolsavhoz viszonyítva.

Fentiekből levonhatjuk az a következtetést, hogy a megnövelt KLS-tartalmú vaj (ghee) jelentős antioxidáns tulajdonságánál fogva megvédi az élelmiszer és a takarmány oxidációra érzékeny komponenseit.

4. IRODALOM

- [1.] Ha, Y.L. – Grimm, N.K. – Pariza, M.W.: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 1987. 8. 1881-1887.
- [2.] Christie, W.W. – Dobson, G. – Gunstone, F.D.: Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 1997. 124. 694-701.
- [3.] Chin, S.F. – Liu, W. – Albright, K. – Pariza, M.W.: Tissue levels of cis-9, trans-11 conjugated dienoic isomer of linoleic acid (CLA) in rats fed linoleic acid (LA). *Faseb J.* 1992a. 6. A1396.
- [4.] Kepler, C.R. – Tove, S.B.: Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1967a. 241. 1351-1354.
- [5.] Kepler, C.R. – Tucker, W.P. – Tove, S.B.: Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1971. 246. 2765-2771.
- [6.] Griinari, J. – Bauman, T.B.: Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. (Eds. Yuracez, M.W., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W., Nelson, G.) AOCS Press, Champaign, IL. 1999. 1 180-198.
- [7.] Pollard, M.R. – Gunstone, F.D. – James, A.T. – Morris, L.J.: Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids*. 1980. 15. 306-314.
- [8.] Griinari, J. – Corl, B.A. – Lacy, P.Y. – Chouinard, K.V. – Nurmela, V. – Bauman, D.E.: Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *J. Nutr.* 2000. 130. 2285-2291.
- [9.] Padley, F.B. – Gunstone, F.D. – Harwood, J.L.: Occurrence and characteristic of oils and fats. In: *The Lipid Handbook*. (Eds. Gunston, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B.) Chapman & Hall, London, 1994. 51.
- [10.] Berdeaux, O. – Christie, W.W. – Gunstone, F.D. – Sebedio, J.L.: Large-scale synthesis of methyl cis-9, trans-11-octadecadienoate from methyl ricinoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997. 74. 1011-1015.
- [11.] Aneja, R.P. – Murthi, T.N.: Beneficial effects of ghee. *Nature*. 1991. 350. 280.
- [12.] Ha, Y.L. – Storrkson, J. – Pariza, M.W.: Inhibition of benzo(a)prene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 1990. 50. 1097-1101.
- [13.] Ip, C. – Chin, S.F. – Scimeca, J.A. – Pariza, M.W.: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 1991. 51. 6118-6124.
- [14.] Chen, Z.Y. – Chan, P.T. – Zhang, A.: Reassessment of the antioxidant activity of conjugated linoleic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1997. 6. 749-753.
- [15.] Van den Berg, J.J.M. – Cook, N.E. – Tribble, D.L.: Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*. 1995. 30. 599-605.

Halványítási eljárások eredményességének vizsgálata a faiparban

Study of Results of Bleaching Procedures in Woodworking Industry

STIPTA József¹, NÉMETH Viktória²

¹INNO-NATURA Környezetvédelmi és Innovációs Közhasznú Társaság,
9471. Nemeskér, Fő u. 18. Magyarország
sjozsi@freemail.hu

²Nyugat-Magyarországi Egyetem, 9400. Sopron, Bajcsy-Zsilinszky u. 4. Magyarország

ABSTRACT

Visual control is the most frequently used method of assessment of the efficiency of bleaching procedures applied in woodworking industry. Determination of the colour with instruments is an objective method. Chemical processes taking place can be deduced from the change of absorbance measured in case of wavelength (wave number) assignable to the chemical structure with the use of infrared spectroscopy (IR) if scientific results are required.

1. A FAANYAG HALVÁNYÍTÁSA

A fa kémiai szempontból egy olyan rendszer, amely makromolekulák bonyolult kapcsolódásai révén jön létre. A faanyag komplex, makromolekulás, kolloid tulajdonságokkal is rendelkező, speciális anatómiai felépítésű rendszer, melynek jellemzői az időben is jelentősen változnak. A faanyag színét nem a főkomponensek, hanem a járulékos anyagok határozzák meg. Mivel ezek minősége és mennyisége fafaj-specifikus, a faanyag színe is nagymértékben a fafajtól függ.[1]

A halványítás fogalma általánosságban egy anyag valamely színjellemzőjének megváltoztatását jelenti fizikai vagy kémiai eszközökkel.[2] Faanyagok felületének halványítása során az alábbi célkitűzések szerepelhetnek (egyenként vagy akár egymással kombinált formában):

- az anyag felületének kifehéritése, vagy világosabbá tétele;
- meglévő szín mélységének (telítettségének) csökkentése a színárnyalat megőrzésével;
- más színárnyalat kialakítása a telítettség lényeges megváltoztatása nélkül (pl. a pirosas színárnyalatból narancssárga, sárga színű felület létrehozása);
- a felületi színhomogenitás növelése (pl. faanyagok esetén a sötétebb színű csomók, pászta, álgesztes részek színének a fatest többi részéhez történő alakítása);

A természetes fa színmeghatározására objektív módon, bizonyos feltételek mellett műszeres színméréssel megvalósítható. Az objektív színmegadás azon az elven alapszik, hogy a reflektált fényben a három alapszín fényerősségét meghatározva az adott szín valamilyen színrendszerben megadható. A színt három színin-ger-jellemzővel lehet egyértelműen megadni: ezek a világosság (L^*), a színezet (H^*) és a telítettség (C^*). A színezet a színkoordinátákkal (a^* , b^*), a színezetdússággal (c^*), illetve a színezeti szöggel (h^0_{ab}) is megadható. Az adott felületen egymás mellett mért pontok objektív módon megadott színbeli különbözősége a színin-ger-különbség (ΔE^*).[3] Halványított felületek összehasonlító vizsgálata során a „fehérségi érték” (W^*), illetve annak változása (dW^*), mint objektív mérőszám, jól hasznosítható [4]:

$$W^* = 100 - ((100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{0,5}.$$

Minden kémiai vegyületnek jellemző infravörös spektruma van. Egy ismeretlen anyag azonosítható, ha kimutatható, hogy infravörös színe egy ismert vegyületével azonos. Adott atompárok közötti kötések energiája eléggé állandó, ezért számos atomcsoportnak jellegzetes elnyelési frekvenciája van. Így például a karbonil csoport $C=O$ vegyértékrezgése $\approx 1700-1760 \text{ cm}^{-1}$ -nél okoz elnyelést, a C-H kötések vegyértékrezgése pedig 2800 és 3300 cm^{-1} között észlelhető. Ezeket az elnyelési frekvenciákat táblázatosan adják meg az egyes csoportokra és így az egyes molekulákban azonosítani lehet azokat. [5]

Hullámszám [cm ⁻¹]	Csoport vagy építőelem	A csoporthoz tartozó fő fakomponens		
		cellulóz	hemicellulóz	lignin
3423	OH vegyértékrezgés	+	+	+
3405	OH vegyértékrezgés	+	+	+
3350	OH vegyértékrezgés	+	+	+
2933	CH ₂ vegyértékrezgés	+	+	+
2900	CH asszim. vegyértékrezgés	-	+	-
1750	C=O vegyértékrezgés	-	-	+
1730	C=O vegyértékrezgés	-	+	-
1650	C=O vegyértékrezgés és H-O-H deformációs rezgés	-	-	+
1605	aromás C-C gyűrűrezgés	-	-	+
1510	aromás C-C gyűrűrezgés	-	-	+
1470	CH deformációs rezgés a metilcsoportban	+	+	+
1460	CH ₂ deformációs rezgés	-	-	+
1425	CH ₂ deformációs rezgés	+	-	-
1425	CH ₃ deformációs rezgés	-	-	+
1370	CH deformációs rezgés	+	+	-
1265	C-O vegyértékrezgés	-	-	+
1235	acetil- és karboxil csoport rezgés	-	+	-
1235	C-O vegyértékrezgés	-	-	+
1210	C-OH vegyértékrezgés	-	-	+
1205	OH vegyértékrezgés	+	+	-
1160	C-O-C vegyértékrezgés	+	+	-
1110	OH vegyértékrezgés	+	+	-
1050	C-O vegyértékrezgés	+	+	-
1030	C-O vegyértékrezgés	+	+	+
990	C-O vegyértékrezgés	+	+	-
895	C- csoportrezgések	+	+	+

Az infravörös spektroszkópia segítségével lehetővé vált a fában lejátszódó finomkémiai átalakulások, az összetett makromolekuláris szerkezetben végbemenő átalakulások meghatározása is. Mivel a fa kémiailag sokkomponensűnek számít, az elnyelési sávok nagy része több fakomponenshez is kapcsolható. Néhány sáv azonban egy-egy fakomponensre jellemző, és ezek teszik lehetővé a fa infravörös spektrumának értékelését. Ilyenek például az elsősorban hemicellulózra jellemző C=O vegyértékrezgés 1730 cm⁻¹-nél. Az aromás szerkezetre, így a ligninre utaló vegyértékrezgés 1605 cm⁻¹ és 1510 cm⁻¹ környezetében. A szénhidrát frakciót főleg az 1370 cm⁻¹-nél és 1160 cm⁻¹-nél jelentkező elnyelési sáv jellemzi. [6]

2. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK

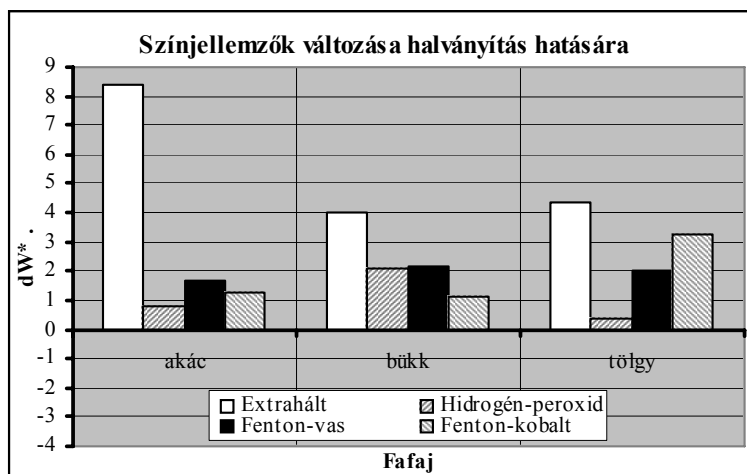
A kísérleti munka során az alábbi, Magyarországon ipari jelentőséggel bíró fafajok kerültek felhasználásra: bükk (*Fagus silvatica* L.); fehér akác (*Robinia pseudoacacia* L.); kocsányos tölgy (*Quercus robur* L.).

A halványítás 20 %-os hidrogén-peroxid oldat felhasználásával történt. A halványító oldat kémhatása savas (pH=4), az alkalmazott vas(II)- és kobalt(II)-ion koncentráció 10⁻² M. Az extrahálás művelete 6 órán keresztül toluol-etanol=1:1 arányú keverékével történt.

Az objektív színmeghatározás Minolta CE 2002 színmérő spektrofotométerrel, az infravörös elemzés az ún. „pasztillás” módszerrel, Zeiss SPECORD M-80 típusú IR-készülékkel valósult meg.

3. A HALVÁNYÍTÁS EREDMÉNYESSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA SZÍNMEÉRESEL

A faanyag halványításának eredményességét eldönteni legegyszerűbben szubjektív érzékeléssel, a látással lehet: halványabbnak látható a felület vagy sem. Tudományos vizsgálatokhoz az objektivitást biztosító CIELab-színingertér alkalmazása lehetővé teszi az ún. fehérségi érték alkalmazásával a halványítás mértékének számokkal történő megadását. Az 1. ábrán látható, hogy mindhárom vizsgált faj felülete az extrahálás hatására „fehéredett” leginkább.

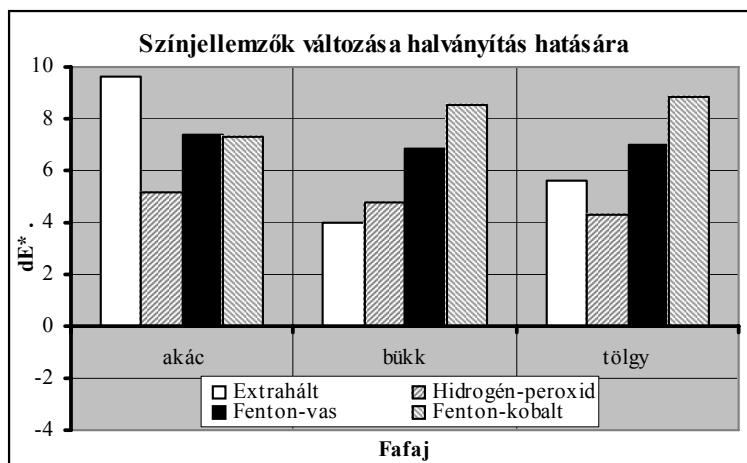


1. ábra

A halványítás eredményessége a fehérségi érték változása (dW^) alapján*

A fehérségi értéket leíró összefüggés egyik „hibája”, hogy a CIELab-színrendszer által megfogalmazott elveknek megfelelően azonos színjellemző-változás a színingertér bármely pontjában azonos mérőszám-különbséggel határozható meg. A vizsgált faanyagok esetén a világossági tényező (L^*) értéke 60 és 75, az a^* szinkoordináta 4 és 9, míg a b^* értéke 19 és 36 között változott. Bármely szinkoordináta egységnyi változása az L^* esetén alig 1-1,5, az a^* esetén 10-25, míg b^* esetén 3-5 százalékos színeltérést eredményezett.

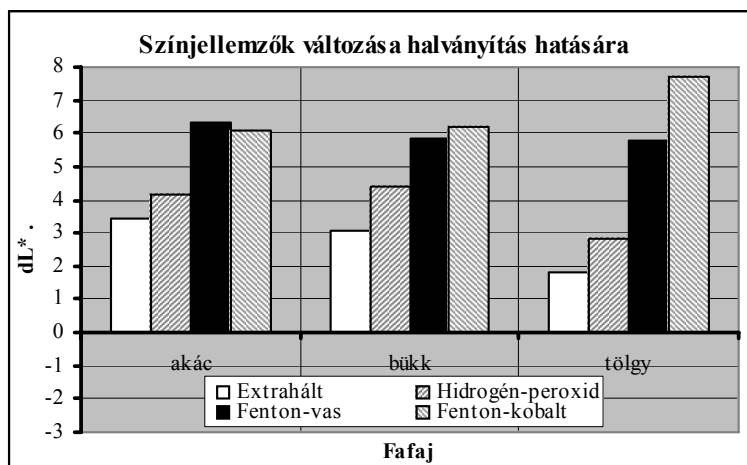
A színjellemzők változásainak összesített hatását szemlélteti a színingertér-különbség változását bemutató 2. ábra. Mivel itt a színjellemzők különbségei szerepelnek, kevésbé torzító hatású a matematikai képletben szereplő értékek közötti nagyságrendi különbség.



2. ábra

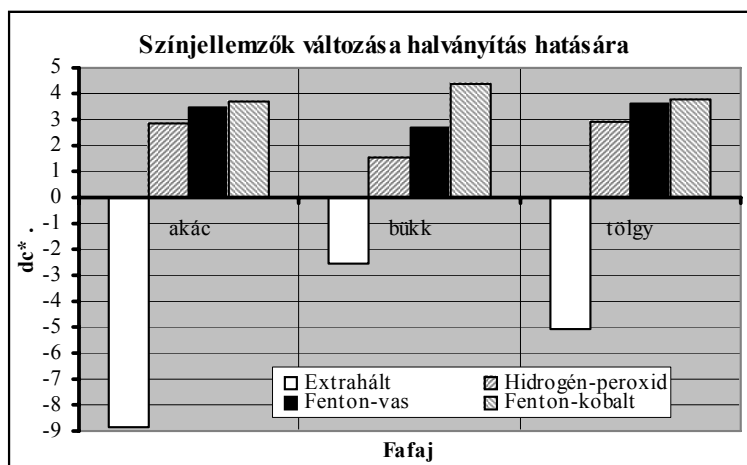
A halványítás eredményessége a színingertér-különbség értékének változása (dE^) alapján*

A halványítás céljaként megfogalmazott világosság növelése (3. ábra) az oxidatív halványítási módszerekkel lényegesen kedvezőbb eredményeket mutat, mint az extrahálás. Mindegyik fafaj esetén szemmel láthatóan a Fenton-reagensek hatékonyabbak a hagyományos hidrogén-peroxidos eljárásnál.



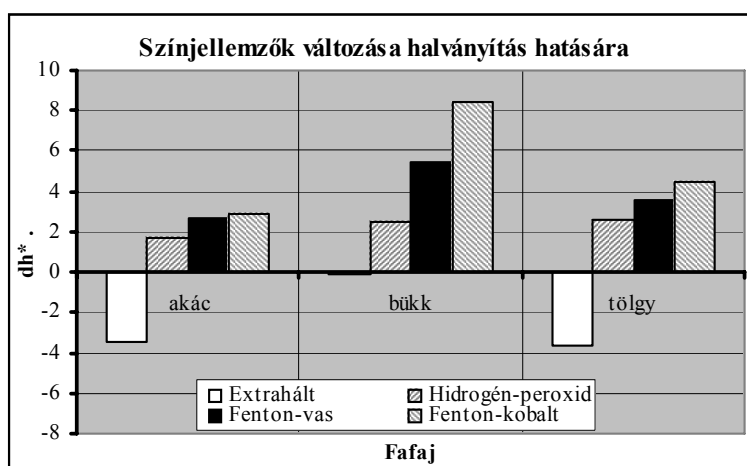
3. ábra

A halványítás eredményessége a világossági tényező változása (dL^*) alapján



4. ábra

A halványítás eredményessége a színezetdúság változása (dc^*) alapján



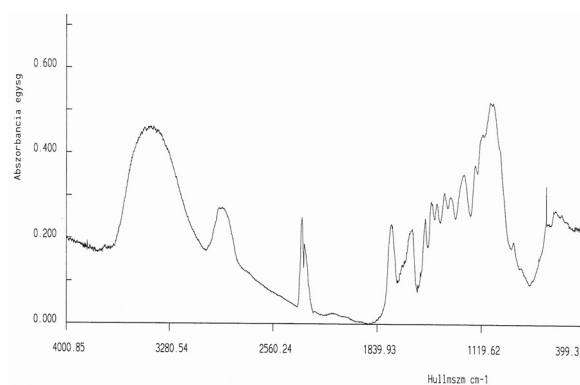
5. ábra

A halványítás eredményessége a színezeti szög változása (dh^*) alapján

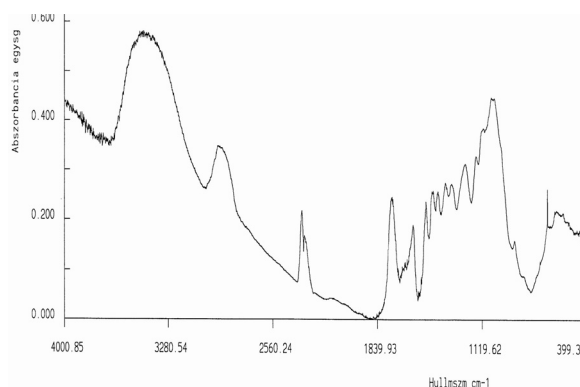
A színezetdúság (4. ábra) csökkenése és a színezeti szög növekedése (5. ábra) szintén a halványítás eredményességének feltétele. Hiába csökkent azonban jelentősen az extrahált felületek színezetének telítettsége ($dc^* < 0$), mivel a kevésbé élénk színű, a sárga színezetet biztosító kromofórok mennyisége csökkent, a fafelület színezete a kedvezőbb sárgás árnyalat ($dh^* > 0$) helyett a vöröses irányba ($dh^* < 0$) változott. Mindezek megerősítik a szemmel is tapasztaltakat, miszerint az oxidatív halványítás bármely formája kedvezőbb színhatást biztosít, mint az extrakció.

4. A HALVÁNYÍTÁS EREDMÉNYESSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA AZ INFRAVÖRÖS SPEKTROSZKÓPIA MÓDSZERÉVEL

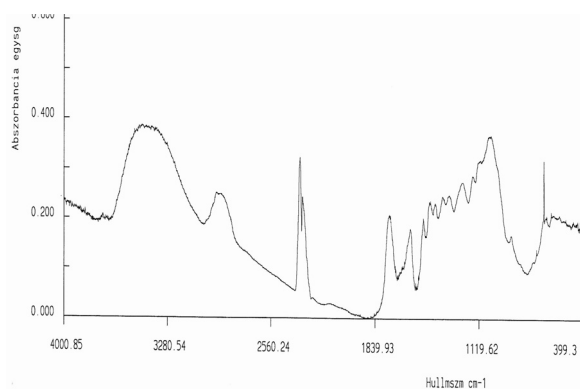
A faanyagok infravörös tartományban történő vizsgálata során a szakirodalmi hivatkozások karakterisztikus frekvenciaként a kémiai hatásokra legkevésbé változó cellulóz esetén az 1160 cm^{-1} , a ligninre az 1506 cm^{-1} , míg a járulékos anyagok esetén az 1747 cm^{-1} értéket jelölik meg. A 6. ábra a kezeletlen, illetve különböző halványítási eljárással kezelt akácról készített IR-spektrumokat szemlélteti.



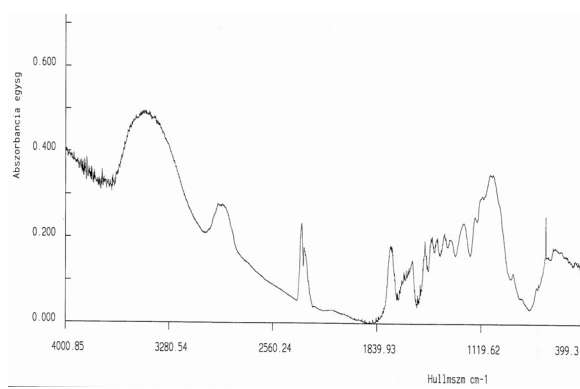
Kezeletlen akác IR-spektruma



Extrahált akác IR-spektruma

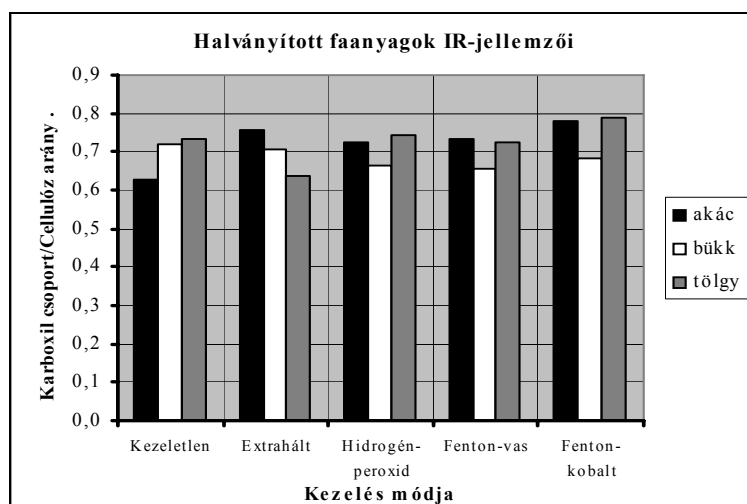


Hidrogén-peroxiddal kezelt akác IR-spektruma



Fenton-reagenssel kezelt akác IR-spektruma

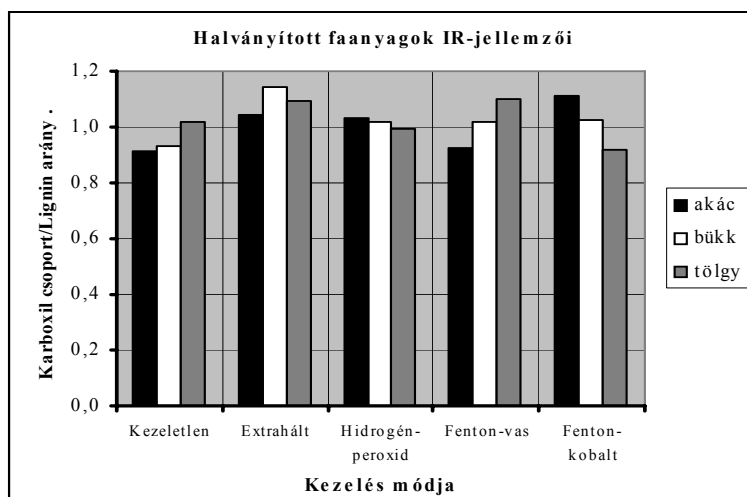
6. ábra
Kezeletlen és halványított akác IR-spektruma



7. ábra

A karbonil csoport/cellulóz arány kezeletlen és halványított faanyagok esetén

A spektrum alapján meghatározható a karakterisztikus frekvenciához tartozó abszorbancia-érték. A kezelések során a cellulóz mennyisége alapvetően nem változik, az 1160 cm^{-1} hullámszámhoz tartozó abszorbancia értéke fajonként állandónak tekinthető. A kezelés jellegétől függően változhat a lignin mennyisége: az 1506 cm^{-1} hullámszámhoz tartozó abszorbancia értéke a bekövetkező degradáció miatt csökkenhet. Lényeges változás történik a járulékos anyag tartalommal arányos karbonil csoportra jellemző 1747 cm^{-1} -es hullámszám esetén, amely az egyes vegyületek erőteljes oxidációjára utal. A bekövetkező változások jellege akkor hasonlítható össze egymással, ha azokat egy nem változó vegyület karakterisztikus frekvenciájához tartozó abszorbancia-értékhez hasonlítják. A karbonil csoport/cellulóz arány (7. ábra) esetén megfigyelhető, hogy bükk esetén viszonylag kis változások következtek be, míg az akác és tölgy esetén az oxidációs folyamat eredményeképpen a karbonil csoportok számának növekedése érzékelhető.



8. ábra

A karbonil csoport/lignin arány kezeletlen és halványított faanyagok esetén

A karbonil csoportok és a lignin abszorbancia értékeinek aránya (8. ábra) a legtöbb kezelés esetén meghaladja a kezelés nélküli minta esetén tapasztalt értéket. Mindez arra utal, hogy a karbonil csoportok mennyiségének növekedéséhez a lignin degradációja is hozzájárul. (Az extrakció esetén a kioldott anyagok mennyisége nem csak a színiaalakításban szerepet játszó kromofórokot tartalmazó vegyületeket, hanem jelentős mennyiségű poliózokat is jelentettek.)

5. ÖSSZEGZÉS

A kísérletsorozat célja annak felkutatása, melyik az az objektív módszer, amellyel a halványítási művelet eredményessége leginkább jellemezhető. A színmérési gyakorlatban alkalmazott fehérségi érték változása jól jelzi a halványodás tényét, azonban a számítási összefüggésben túlzott szerepet kap a világossági tényező növekedése.

Az infravörös spektroszkópiai vizsgálatokkal jól jellemezhető a cellulóz/lignin/járuvékos anyagok aránya, illetve azok változásának módja. Az eljárás alkalmas a bekövetkezett változások kémiai értelmezésére, azonban önmagában a halványodás mértékére nem ad számszerű eredményt.

A két vizsgálati módszer együttes alkalmazása alkalmas a halványítási folyamat eredményességének számszerűsítésére és a lezajló folyamatok jellegének kémiai vizsgálatára.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Németh, K. (1997): Faanyagkémia. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- [2] Molnár, S. (2002): Faipari kézikönyv II. Faipari Tudományos Alapítvány, Sopron.
- [3] Hon, D. N-S., Minemura, N. (1991): Color and decoloration. Marcel Dekker, New York.
- [4] Ashaari, Z., Hanim, R., Tahir, P.Md., Nizam, N. (2004): Effects of Peroxide and Oxalic Acid Bleaching on the Colour and Gluing Properties of Some Tropical Bamboos. *J. Biol. Sci.*, 4 (2). Pp. 90-94.
- [5] Kristóf, J. (2000): Kémiai analízis II. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém.
- [6] Németh, K. (1989): A faanyag abiotikus degradációja. Doktori értekezés, Sopron.

Természetes aromaanyagok biokatalitikus előállítása

Biocatalytic Production of Natural Flavour Compounds

SZ. NÉMETH Ágnes¹, SZ. MÁRCZY Judit, SAMU Zsuzsa², HÁGER-VERESS Ádám²,
Dr. SZAJÁNI Béla, Dr. SISAK Csaba¹

¹Pannon Egyetem, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, H-8200 Veszprém, Egyetem u. 2., Magyarország
Tel.: +36 88 624040, Fax: +36 88 624038, e-mail: szemes@mukki.richem.hu, www.richem.hu/rice/new/

²Aroma Bázis Kft., H-2141 Csömör-lparterület, Határ u. 1., Magyarország

ABSTRACT

Soybean lipoxygenase was used to produce 13-hydroperoxy-octadecadienoic- and 13-hydroperoxy-octadecatrienoic acid from hydrolysed sunflower- and linseed oil with yields of 72 % and 62 %, respectively. Then 13-hydroperoxy-octadecadienoic- and 13-hydroperoxy-octadecatrienoic acid were cleaved by spinach leaf and green bell pepper hydroperoxide lyase enzymes resulting hexanal (yield: 54 %), 3(Z)- and 2(E)-hexenal (yield: 37 %). The aldehydes were isolated by steam distillation.

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer- és kozmetikai ipar részéről folyamatosan növekszik az igény az aroma- és illatanyagok iránt. A természetes aromák világszerte növekvő piacából a kilencvenes években kb. 20 – 40 millió USD/év értéket képviselt a gyümölcskészítmények „zöld” aromája [1]. Ennek fő összetevői illékony aldehidek – hexanal, *cisz*-3-hexenal és *transz*-2-hexenal. Ezek a hat szénatomos aldehidek előállíthatók növényekből történő extrakcióval, fermentációval, vagy biokatalitikus úton. Az ép növényi sejtekben csak nyomnyi mennyiségben fordulnak elő, 18 szénatomos telítetlen zsírsavakból keletkeznek két lépésben, abban az esetben, amikor a sejtstruktúrák megsérülnek, és a sejt tartalmat oxigén éri [2]. A bioszintézis első lépése, amelyet a lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1, linoleát:oxigén oxidoreduktáz, EC 1.13.11.12) katalizál, a zsírsavak hidroperoxidációja. A második lépésben a zsírsavak hidroperoxidjai a hidroperoxid liáz enzim hatására egy aldehiddé és egy oxosavvá hasadnak.

A növényekben a hexanal linolsavból (*cisz*-9,*cisz*-12-oktadekadiénsav), a hexenal izomerek pedig linolénsavból (*cisz*-9,*cisz*-12,*cisz*-15-oktadekatriénsav) képződnek. A hidroperoxidáció során a linolsavból 13-hidroperoxi-*cisz*-9,*transz*-11-oktadekadiénsav (a továbbiakban 13-HPOD), a linolénsavból pedig 13-hidroperoxi-*cisz*-9,*transz*-11,*cisz*-15-oktadekatriénsav (a továbbiakban 13-HPOT) keletkezik [3,4]. Ezeknek a reakcióknak a ko-szubsztrátja a molekuláris oxigén. A második lépésben a 13-HPOD hexanallá és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsavvá, míg a 13-HPOT *cisz*-3-hexenallá és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsavvá hasad [5]. A *cisz*-3-hexenal nem stabil és hő- vagy enzimatis hatásra könnyen izomerizálódik *transz*-2-hexenallá [6].

Munkánk célja az volt, hogy – a növényekben lejátszódó bioszintézist alapul véve – az iparban alkalmazható eljárást dolgozzunk ki a hexanal, valamint a hexenal izomerek előállítására. Kiindulási anyagként olcsó ipari nyersanyagokat (napraforgóolaj és lenolaj hidrolizátumot), biokatalizátorként pedig növényekből kivont lipoxigenáz és hidroperoxid liáz enzimeket alkalmaztunk.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Anyagok

A szójalisztet a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht.-től kaptuk, a linolsavat, a linolénsavat és a Tween 20-at a Sigma-tól, a napraforgóolajat és a lenolajat az Aldrich-től szereztük be. A paraj levelet és a zöldpaprikát a helyi piacon vásároltuk. Az összes többi felhasznált vegyszer analitikai minőségű volt. A lipoxigenáz aktivitás méréséhez használt nátrium-linoleátot Axelrod és munkatársai [7] módszere szerint készítettük el.

2.2. Módszerek

2.2.1. Az enzimaktivitások meghatározása

A lipoxigenáz aktivitásának mérését Axelrod és munkatársai [7] Márczy és munkatársai [8] által módosított módszere szerint végeztük úgy, hogy 234 nm-es hullámhosszon mértük a képződő konjugált dién elnyelését. A hidroperoxid liáz aktivitásának mérésénél a konjugált dién fogyását követtük 234 nm-en [9]. A mérésekhez Biochrom 4060 spektrofotométert használtunk (Pharmacia, Uppsala, Svédország). 1 U az az enzimmenyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át percenként.

2.2.2. A napraforgó- és a lenolaj hidrolízise

1 kg olajat 500 cm^3 40 %-os nátrium-hidroxid oldattal 100 – 120 °C-on 1 óráig kevertettünk. Ezután az elegyhez 3 dm^3 desztillált vizet adtunk, és 40 °C-ra hűtöttük. Az elegyhez folyamatos keverés mellett 600 g 96 %-os kénsavat adagoltunk, és 30 °C-ra hűtöttük. A fázisokat elválasztottuk, és a zsírsavakat tartalmazó felső fázist desztillált vízzel mostuk. Ezután vákuumban (60 Hgmm) a vizet lepároltuk róla, és vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk.

Gázkromatográfiás vizsgálataink szerint az így nyert napraforgóolaj hidrolizátum 66 % linolsavat, 20 % olajsavat és 11 % egyéb, telített zsírsavat, a lenolaj hidrolizátum pedig 56 % linolénsavat, 16 % linolsavat, 18 % olajsavat és 10 % egyéb, telített zsírsavat tartalmazott.

2.2.3. A zsírsav-hidroperoxidok koncentrációjának meghatározása

A 13-HPOD koncentrációját Weber és munkatársai szerint [10], ferrometriásan határoztuk meg. A módszer azon alapul, hogy a 13-HPOD a Fe(II) iont Fe(III) ionná oxidálja. Ebből KSCN hozzáadására $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ képződik, melynek koncentrációja 480 nm-en fotometriásan mérhető.

A 13-HPOT koncentrációját HPLC módszerrel mértük UV detektort használva 234 nm-en. A minták elúcióját izokratikusan, tetrahidrofurán/metanol/víz/ecetsav eleggyel (25:30:45:0,1) végeztük, 1 ml/perc átfolyási sebességgel.

2.2.4. Gázkromatográfiás mérések

A napraforgó- és a lenolaj hidrolizátum zsírsav összetételének analízise, valamint a hexanal, a *cisz*-3-hexenal és a *transz*-2-hexenal koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiásan történt, egy lángionizátorral ellátott HP 5890 Series II. gázkromatográf (Hewlett Packard) segítségével. Vivőgázként nitrogént használtunk. A csúcsok alatti területet és a koncentrációkat HP 3394A integrátor (Hewlett Packard) segítségével számítottuk.

A zsírsavak azonosításához HP-FFAB (crosslinked FFAB) típusú oszlopot (30 m x 0,53 mm x 1,0 μm , Hewlett Packard) alkalmaztunk. Az injektor és a detektor hőmérséklete 250 °C, a kolonnatér hőmérséklete 220 °C, a nitrogén nyomása 70 kPa volt. Ezen körülmények között az olajsav retenciós ideje 9,2 perc, a linolsavé 10,7 perc, a linolénsavé pedig 13,0 perc.

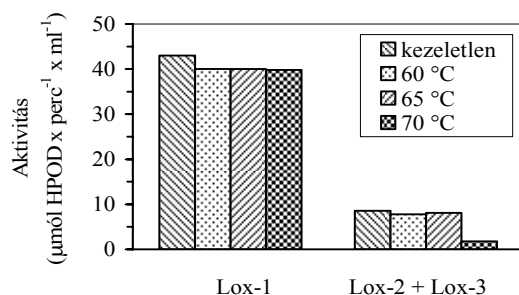
A hexanal koncentrációjának méréséhez PERMABOND OV-1701-DF-0,50 oszlopot (25 m x 0,32 mm, Macherey-Nagel) alkalmaztunk, a kolonnatér hőmérséklete 80 °C, az injektoré 220 °C, a detektoré 250 °C volt. A nitrogén nyomása 76 kPa volt. Ezen körülmények között a hexanal retenciós ideje 4,4 perc.

A hexanal, a *cisz*-3-hexenal és *transz*-2-hexenal elválasztása OPTIMA 1701 oszlopon (25 m x 0,32 mm x 0,5 μm) történt. A programozott hőmérséklet 50 °C-tól (10 perc) 80 °C-ig, 5 °C/perc sebességgel változott, a mintákat 80 °C-on 4 percig tartottuk. Ezen körülmények között a *cisz*-3-hexenal retenciós ideje 6,1 perc, a *transz*-2-hexenalé 10,1 perc, a hexanalé pedig 5,8 perc.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. A lipoxigenáz enzim kinyerése

A lipoxigenáz enzim legnagyobb mennyiségben a szójalisztben fordul elő, melyből extrakcióval könnyen kinyerhető. A szójakivonatban három lipoxigenáz izoenzim van jelen (Lox-1, Lox-2 és Lox-3) amelyek szubsztrát- és termékspecifitásukban, pH optimumukban és hőérzékenységükben különböznek egymástól [7, 11]. A 13-HPOD és a 13-HPOT előállításánál a Lox-2 és Lox-3 izoenzim jelenléte hátrányos, mivel mellékreakciókat katalizálnak. Ezért – kihasználva az izoenzimek eltérő hőérzékenységét – kidolgoztunk egy egyszerű hőkezelési módszert a nemkívánatos izoenzimek eltávolítására [12]. Vizsgáltuk a pH, az ionerősség, a hőkezelési idő és a hőmérséklet hatását. A legjobb eredményt az enyhén savas (pH 5 körül) közegben, alacsony ionerősségnél 5 percig végzett hőkezelések adták. Az 1. ábrán az optimális hőkezelési hőmérséklet meghatározását mutatjuk be.



1. ábra

A hőkezelési hőmérséklet kiválasztása

Látható, hogy a 70 °C-on végzett hőkezelésnél a Lox-2 és Lox-3 izoenzimek aktivitása lecsökkent anélkül, hogy a Lox-1 izoenzim inaktiválódott volna, míg ennél alacsonyabb hőmérsékleten mindhárom izoenzim stabilnak bizonyult. Az így nyert, lipoxigenáz-1 izoenzimből dúsított szójakivonattal végeztük mind a linolsav, mind pedig a linolénsav hidroperoxidációját.

3.2. A linolsav hidroperoxidációja

Az optimalizálási kísérletek során tiszta linolsav szubsztrát alkalmazásával, 20 ml-es térfogatban vizsgáltuk a szubsztrát- és enzimkoncentráció, valamint az oxigénellátottság hatását. A reakciókat pH 9-en, 4 °C-on végeztük. A legjobb eredményt 100 mmól/l szubsztrátkoncentráció és 12 U/ml enzimkoncentráció alkalmazásával érték el, miközben a szükséges oxigént tiszta oxigénnel, 2 bar nyomáson biztosítottuk (1. táblázat).

1. táblázat

Az oxigénellátás módjának hatása a linolsav hidroperoxidációjának hozamára

Oxigénbevitel módja	Kiindulási anyag	Enzimkoncentráció (U/ml)	Hozam (%)
oxigén, 2 bar	linolsav	12	82,5 ± 4,2
sűrített levegő, 2 bar	linolsav	12	58,2 ± 5,4
sűrített levegő, 2 bar	linolsav	5	77,2 ± 8,3
sűrített levegő, rávezetés	linolsav	5	70,7 ± 5,4
sűrített levegő, rávezetés	napraforgóolaj hidrolizátum	5	68,1 ± 7,2

Biztonságtechnikai megfontolások szükségessé tették azonban az oxigénnel levegővel történő helyettesítést, és azt, hogy lehetőleg ne alkalmazzunk túlnyomást a reakció során. Mint az 1. táblázatban feltüntetett adatokból látható, amikor az oxigén helyett sűrített levegőt alkalmaztunk, a hozam jelentősen csökkent. Feltételezésünk szerint ez az elégtelen oxigénellátás miatt lejátszódó mellékreakciók következménye volt, ezért az enzim mennyiségének csökkentésével lassítottuk a reakciót. Ekkor a hozam valóban megnőtt, bár nem érte el a tiszta oxigénnel végzett reakció hozamát. Ennek ellenére a levegő alkalmazása mellett döntöttünk, hiszen üzemi körülmények között ez sokkal biztonságosabb. A nyomás helyett sűrített levegő rávezetéssel végzett reakciók hozama kissé alacsonyabb volt.

Ezután megvizsgáltuk, helyettesíthető-e a linolsav a jóval olcsóbb napraforgóolaj hidrolizátummal, amely kb. 67 % linolsavat tartalmaz, olajsav és különböző telített zsírsavak mellett. Napraforgóolaj hidrolizátumból kiindulva a hozam gyakorlatilag ugyanannyi volt, mint tiszta linolénsav esetén, gazdasági szempontból tehát nyilvánvalóan előnyösebb a napraforgóolaj alkalmazása. A méretnövelést már napraforgóolaj hidrolizátum felhasználásával végeztük, az 500 ml-es térfogatú reakciók átlagos hozama 72 % volt.

3.3. A linolénsav hidroperoxidációja

Az enzim- és a szubsztrátkoncentráció hatásának vizsgálatát lenolaj hidrolizátumból kiindulva, 10 ml-es reakciókkal végeztük, pH 9-en, 4 °C-on (2. táblázat). Mint az a táblázat adataiból látható, az enzimmennyiség növelése valamelyest növelte az elért hozamot, így a méretnövelést 100 mmól/l linolsav- és 7,5 U/ml enzimkoncentráció alkalmazásával végeztük el. A méretnövelt, 500 ml térfogatú reakciók átlagos hozama 62 % volt.

2. táblázat

Az enzim- és a szubsztrátkoncentráció hatása a linolénsav hidroperoxidációjára

Enzimkoncentráció (U/ml)	Linolénsav koncentráció (mmól/l)	Hozam (%)
2,5	75	58,8 ± 3,8
	100	48,9 ± 2,0
5,0	75	65,7 ± 1,1
	100	55,8 ± 0,7
7,5	75	66,1 ± 1,3
	100	63,0 ± 2,0
10,0	75	54,1 ± 0,9
	100	55,4 ± 1,0

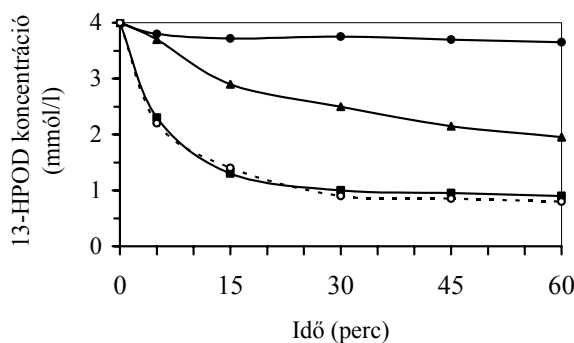
3.4. A hidroperoxid liáz enzim kinyerése

Az aldehidek előállításának második lépését katalizáló hidroperoxid liáz enzim levelekben, gyümölcsökben és zöldségekben fordul elő nagyobb mennyiségben, levelekben a kloroplastok, zöldségekben és gyümölcsökben pedig egyéb sejtalkotórészek membránjaihoz kötött formában. Érzékeny enzim, a membránról leoldva könnyen inaktiválódik, kinyerése ezért lényegesen nehezebb, mint a lipoxigenázé.

A zsírsav-hidroperoxidok hasításához szükséges liázt többféle növényből próbáltuk kinyerni. A 13-HPOD hasítására a paraj levélből, membránkötött formában kinyert hidroperoxid liáz bizonyult a legalkalmasabbnak. Ez lényegében törött és ép kloroplastokat tartalmazó szuszpenzió, amelyet úgy készítettünk, hogy a 0,02 M nátrium-foszfát pufferben homogenizált paraj levelekből centrifugálással kinyertük, majd kis mennyiségű pufferben felszuszpendáltuk a kloroplastokat. A 13-HPOT hasításához alkalmazható enzimet pedig zöldpaprikából nyertük ki, szintén membránkötött formában úgy, hogy az elhomogenizált sejtalkotórészek membránjait kalcium-kloriddal kicsaptuk, majd centrifugálás után kevés pufferoldatban felszuszpendáltuk.

3.5. A 13-HPOD hasítása

A hasítás időbeli lefolyását 4 mmól/l szubsztrátkoncentrációval, különböző mennyiségű enzimmel, pH 9,0-en, 25 °C-on, 4 ml-es reakciókkal vizsgáltuk (2. ábra). Mint az ábrán látható, 0,375 U/ml – vagy nagyobb – enzimmennyiség esetén a hasítás kb. 30 perc alatt lejár, a megmaradt szubsztrát több enzim alkalmazásakor sem alakul át. Ezután megpróbáltuk növelni a szubsztrátkoncentrációt változatlan enzimmennyiség mellett, de ez jelentősen csökkentette a hozamot, amint azt a 3. táblázatban feltüntetett adatok mutatják. Ahhoz, hogy megfelelő hozamot tudjunk elérni, a szubsztrátkoncentráció növelésével együtt az enzimmennyiséget is arányosan növelnünk kellett.



2. ábra

A 13-HPOD hasításának időbeli lefolyása különböző enzimmennyiségek esetén
Jelölések: ● 0,125 U/ml, ▲ 0,25 U/ml, ■ 0,375 U/ml, ○ 0,5 U/ml enzimmennyiség

3. táblázat

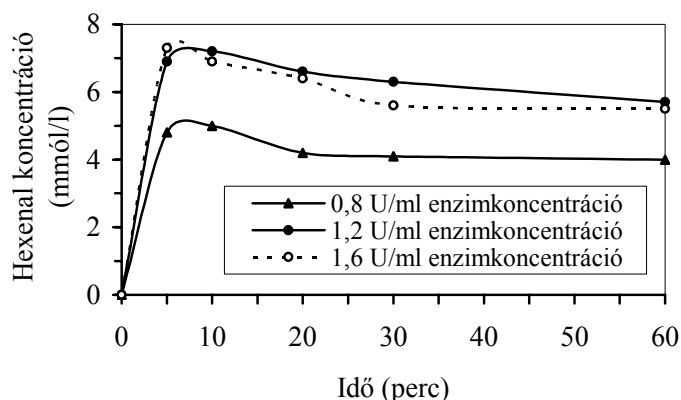
A szubsztrátkoncentráció növelésének hatása a 13-HPOD hasításának hozamára

13-HPOD koncentráció (mmól/l)	Enzimkoncentráció (U/mL)	Hozam (%)
4	0,375	84,6 ± 9,8
7	0,375	39,7 ± 4,2
7	0,658	87,7 ± 6,3
10	0,934	71,0 ± 4,3
12	1,125	73,2 ± 8,7
15	1,408	81,0 ± 12,0

Amikor 13-HPOD helyett a napraforgóolaj hidrolizátum hidroperoxidációs reakcióegyét használtuk kiindulási anyagként, a hozam 55%-ra csökkent. Ennek oka valószínűleg az, hogy a napraforgóolaj hidrolizátumban jelenlevő egyéb zsírsavak gátolják a hidroperoxid liáz enzimet. Ennek ellenére indokolt a napraforgóolaj hidrolizátum használata, mivel sokkal olcsóbb. A méretnövelés már nem befolyásolta a hasítási reakció hozamát, az 500 ml-es reakciók átlagos hozama 54 % volt.

3.6. A 13-HPOT hasítása

A 13-HPOT hasításának időbeli lefolyását 15 mmól/l szubsztrátkoncentráció mellett, különböző mennyiségű enzim alkalmazásával, pH 7-en, 25 °C-on vizsgáltuk. Azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a keletkezett hexenal koncentrációja a tizedik percben a legmagasabb, majd ezután folyamatosan csökken (3. ábra).



3. ábra

A 13-HPOD hasításának időbeli lefolyása

Ebből arra következtettünk, hogy az enzimkivonatban egy számunkra hátrányos, a terméket tovább alakító enzim is jelen van, amelyet megpróbáltunk egyszerű módon (ammónium szulfátos frakcionálással ill. ioncserélő kromatográfiával) eltávolítani, de ez nem sikerült. A nemkívánatos enzim jelenlétével tehát számolnunk kellett, és ennek figyelembevételével az optimális reakcióidőt tíz percben határoztuk meg.

A hasítási reakció optimális szubsztrát- és enzimkoncentrációjának meghatározásához kiindulási anyagként lenolaj hidrolizátum hidroperoxidációs reakcióegyét alkalmaztuk (4. táblázat).

4. táblázat

A 13-HPOT hasításának optimalizálása

Enzimkoncentráció (U/ml)	13-HPOT koncentráció (mmól/l)	Hexenal koncentráció (mmól/l)	Hozam (%)
0,4	10	5,6 ± 0,9	56,0
	15	6,2 ± 1,5	41,3
	20	5,6 ± 1,4	28,0
1,2	10	6,8 ± 0,6	68,0
	15	8,7 ± 1,1	58,0
	20	8,8 ± 0,9	44,0
2,0	10	6,1 ± 0,2	61,0
	15	8,5 ± 1,4	56,7
	20	9,5 ± 1,0	47,5

Mint látható, a szubsztrátkoncentráció növelésével a hozam mindhárom vizsgált enzimkoncentráció esetén csökkent. A méretnöveléshez az 1,2 U/ml enzimkoncentrációt és a 15 mmól/l szubsztrátkoncentrációt választottuk ki, tekintve, hogy ezek alkalmazásával viszonylag magas hexenal koncentráció érhető el és még a hozam is elfogadható. A méretnövelés hatására a hozam jelentősen csökkent, az 500 ml-es reakciók átlagos hozama 37 % volt.

3.7. Az aldehidek kinyerése a reakcióelegyből

A hasítási reakciókban keletkezett aldehideket a reakcióelegyből vízgőzdesztillációval nyertük ki, amit megkönnyített az, hogy vízzel viszonylag alacsony forráspontú azeotróp elegyet képeznek. A hexanal forráspontja 131 °C, azeotrópja, melynek forráspontja 90,6 °C, 75 % hexanalt tartalmaz, míg a *transz*-2-hexenal forráspontja 147 °C, azeotrópja 51,4 % *transz*-2-hexanalt tartalmaz és forráspontja 91,5 °C [13]. Laboratóriumi méretben nem tudtuk egy desztillálási lépésben külön fázisban kinyerni az aldehideket, ehhez ismételt vízgőzdesztillációkra volt szükség.

A kinyert hexenal 77 %-os tisztaságú volt. Az ismételt vízgőzdesztillációk során a *cisz*-3-hexenal nagy része *transz*-2-hexenallá izomerizálódott. Míg a 13-HPOT hasítási reakcióelegye 16 % *transz*-2- és 72 % *cisz*-3-hexenalt tartalmazott, a külön fázisban kapott nyers termékben 78,6 % volt a *transz*-2- és 10,0 % a *cisz*-3-hexenal.

IRODALOM

- [1] Whitehead, I. M., Muller, B. L., Dean, C. *Cereal Foods World* 1995, **40**, 193-197.
- [2] Drawert, F., Tressl R., Heimann, W., Emberger, R., Speck, M. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.* 1973, **2**, 10-22.
- [3] Galliard, T., Matthew, J. A., Wright, A. J., Fishwick, M. J. *J. Sci. Food Agric.* 1977, **28**, 863-868.
- [4] Axelrod, B. *Food Related Enzymes*, Whitaker, J. R., Ed., ACS, Washington, 1974, pp 324-348.
- [5] Kim, I. S., Grosch, W. *J. Agric. Food Chem.* 1981, **29**, 1220-1225.
- [6] Stone, E. J., Hall, R. M., Kazeniak, S. J. *J. Food Sci.* 1975, **40**, 1138-1141.
- [7] Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., Laakso, S. *Methods Enzymol.* 1981, **71**, 441-451.
- [8] Márczy, J. Sz., Simon, M. L., Mózsik, L., Szajáni, B. *J. Agric. Food Chem.* 1995, **43**, 313-315.
- [9] Zimmerman, D. C., Vick, B. A. *Plant Physiol.* 1970, **46**, 445-453.
- [10] Weber, F., Laskawy, G., Grosch, W. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 1974, **155**, 142-150.
- [11] Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kaizuma, N., Kito, M. *J. Agric. Food Chem.* 1985, **33**, 852-855.
- [12] Németh, Á. Sz., Szajáni, B., Márczy, J. Sz., Simon, M. L. *Biotechnol. Tech.* 1998, **12**, 389-392.
- [13] Harsley, L. H. *Azeotropic Data II.*, Am. Chem. Soc., Washington, 1965.

Az őrölt hulladék-kalcium-karbonát szuszpenzió, mint kéndioxid lekötő

The Milled Residual Calcium Carbonate Suspension as Sulphur Dioxide Capture Agent

SZÉP AI. Sándor¹, HARJA Maria²

¹EMTE- Sapiientia, Csíkszereda, Piata Libertatii, Nr.1, alszep@ch.tuiasi.ro,

²Iasi-i „Gh. Asachi” Műszaki Egyetem, Vegyészmérnöki kar,
Bdul Mangeron 71, 700050 Iasi, email: mivanciu@ch.tuiasi.ro

ABSTRACT

Using the wet and dry milling method we are obtained a reactive suspension of residual calcium carbonate from NPK industry. The experimental results shows, that the obtained suspension has similar buffering capacity like limestone and chemically pure calcium carbonate. Also we are demonstrated that the sulfur dioxide capturing capacity of this suspension is comparable with the limestone and pure calcium carbonate suspension. The enhancement factor values calculated using the Hatta modulus ($E=1,75$) approach the measured ones ($E= 1,67...2,07$).

Keywords: residual calcium carbonate, suspension, buffering capacity, absorption, sulfur dioxide, enhancing factor.

1. BEVEZETÉS

A nedves kéntelenítést, többek között, kis szemcseméretű, nagy reaktivitású kalcium-karbonátokkal vagy oltott mész szuszpenzióval végzik [1-3]. Ahhoz, hogy minél hatékonyabb legyen a kéndioxid megkötése, szükséges, nem csak a nagy karbonát tartalom, hanem a minél kisebb szemcseméret is. Természetesen, a szuszpenzió stabilitása is egy fontos technológiai feltétel. Ez utóbbi a különböző adalékkal vagy a szemcseméret csökkentéssel érhető el.

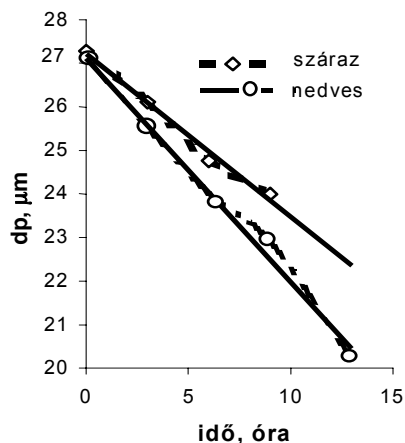
Mint a korábbi kísérletek is bizonyították [4-8], az őrölt mészke helyettesíthető különböző technológiai folyamatból kikerült kalcium karbonáttal. Ezeknek a kristály és kémiai összetétele hasonló a természetes kalcium karbonatéval [9], igaz, hogy a hulladék mindig magával hordja a technológiai háttérrel, vagyis szemcsemérete és kémiai összetétele attól a folyamattól függ, melyből kikerült.

A száraz és a nedves őrlést alkalmazva, nagy szilárd anyagtartalmú hulladékörletet állítottunk elő, amelyet úgy összetétel, mint kéndioxid megkötő képesség szempontjából jellemeztünk.

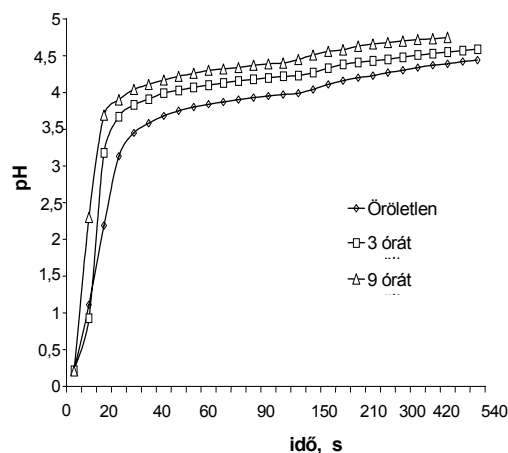
2. A SZUSZPENZIÓ ELŐÁLLÍTÁSA ÉS SZEMCSEMÉRET MEGHATÁROZÁSA

A kutatáshoz műtrágyaipari kalcium karbonát hulladékot alkalmaztunk. Az őrlést két féle laboratóriumi malommal végeztük, éspedig, porcelán golyósmalommal és nemesacél kalapácsmalommal. A kalapácsmalommal csak szárazőrlést, a golyósmalommal úgy száraz, mint nedves őrlést végeztünk. Mindegyik őrlésnél a golyósmalom töltet mennyisége állandó volt (szilárd anyag / golyó arány=0,48 és szilárd anyag / víz arány=0,53), csak az őrlési idő változott. Az őrlés hatékonyságát a szemcseméret változással jellemeztük.

A termék szemcseméret összetételének meghatározására a nedves ülepedésen alapuló módszert alkalmaztuk. Ehhez, egy módosított Gelempkamp GB típusú, 250 mm magas, 220 mL térfogatú oszloppal rendelkező, ülepedési sebességet mérő mérleget alkalmaztunk, ahol a torzió alapuló 10 mg-os mérleget két tizedes pontosságú digitális mérleggel helyettesítettük. A mérési görbék segítségével meghatároztuk a szemcseméret összetételt és ebből az átlagos szemcseméretet. Mint, ahogy az 1. ábra is mutatja, ahogy várható is volt, a nedves őrlés hatékonyabb, hisz a szemcseösszetétel időbeni változása túlszárnyalja a száraz őrléssel keletkező populációt.



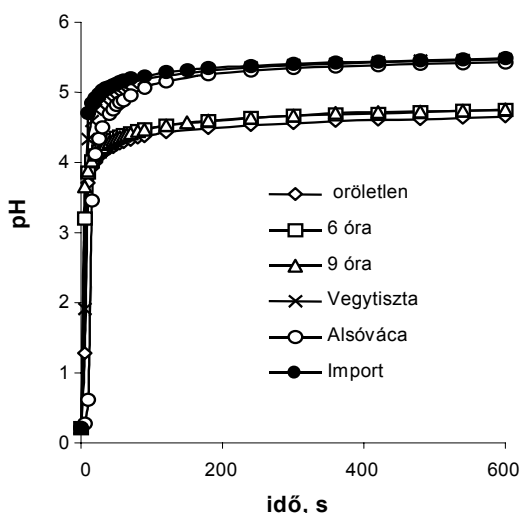
1. ábra
A szemcseméret változása az őrlési idő függvényében



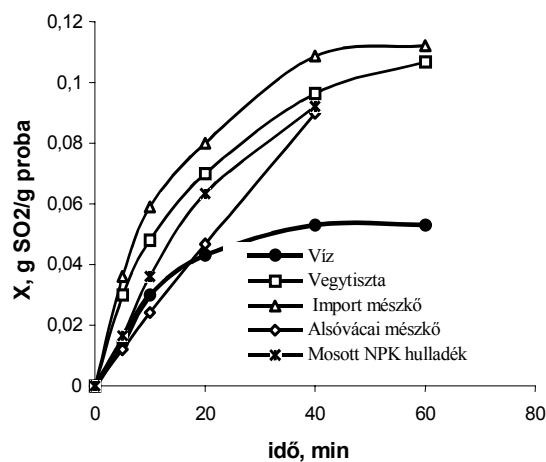
2. ábra
A szárazon őrlött hulladék semlegesítési kapacitásának a változása az őrlési idő függvényében

3. A SZUSZPENZIÓ REAKTIVITÁSÁNAK MEGHATÁROZÁSA

A karbonát szuszpenziók reaktivitásának jellemzésére a *semlegesítési kapacitásmérést* [8], alkalmaztuk. Ezt egy egyszerű, konduktométerrel, pH méterrel és mágneses keverővel felszerelt üst reaktorban végeztük, sósav oldat alkalmazásával. Kétféle kísérletet végeztünk, egyik esetben a szuszpenziót adagoltuk a savra, a másikon, a savat adagoltuk a szuszpenzióra. Mindkét esetben nagy gázfejlődésre számítva, kis sav koncentrációval dolgoztunk, 0,1378 M és 0,2756 M. Amint a 2. ábrán látható, a száraz őrléssel kapott szuszpenzió semlegesítési kapacitása nő az őrlési idővel. A kezdeti sebesség értéke a legnagyobb a 9 órát őrlött hulladék esetén. A nedves őrléssel keletkezett szuszpenziók megtartják a száraz őrléssel kapottak viselkedését, de, mint a 3. ábrán is látható, az őrlemények reaktivitása, a kereskedelmi karbonátok semlegesítési kapacitása alatt marad.



3. ábra
A nedves-őrlési hulladék és a kereskedelmi mészkövek semlegesítési kapacitása



4. ábra
A karbonát befolyása a kéndioxid abszorpcióra: 17 mm v.o., 295 K, 10 g/100 g

4. A SZUSZPENZIÓ KÉNDIOXID MEGKÖTŐ KÉPESSÉGE

A szuszpenziók kéndioxid megkötő képességét vizsgálva, nem csak a kemoszorpció sebességét követjük, hanem a különböző stádiumban lévő szilárd anyag összetételét is figyelemmel kísértük. Míg a kéndioxid megkötő képességet a módosított LEWIS reaktorban végeztük, a kezdeti, az abszorpció utáni és a szűrletből kikristályosodott szilárd anyag állapotát a DIGILAB FTS 2000 Spectrofotométerrel mértük. A hulladékból nyert szuszpenzió kivül bemértük a különböző eredetű kalcium karbonátok – alsóvácai mészkő, import mészkő és vegytiszta karbonát- kéndioxid lekötő képességét (lásd a 4. ábrát). Minden paraméterhatás bemérésakor először elvégeztük a megfelelő RO (fordított ozmózissal kapott) vízbe való abszorpciós kísérletet is. A kéndioxid lekötő képesség meghatározására, különböző örlési idő után nyert (0-13 óra), különböző hőmérsékletű (298-313 K) és töménységű (5, 10, 15, 20 g/100 g) szuszpenzióval dolgoztunk, alacsony túlnyomáson (5-17 mm H₂O), állandó keverési számmal (200 ford/min).

Az örlési idő pozitív befolyással van a kéndioxid lekötési kapacitásra, nem úgy, mint a hőmérséklet, melynek növekedésével a kéndioxid koncentráció csökken. Ellenben, a túlnyomás és a szuszpenzió koncentráció növekedés is pozitív hatással van a kéndioxid abszorpciójára. Már az 5 g/100 mL víz koncentrációjú szuszpenzió esetén is az elnyelt kéndioxid mennyiség duplája a vízben abszorbeálódottak. Ahogy nő a szuszpenzió szilárdanyag tartalma, úgy nő az elnyelt kéndioxid koncentráció is. Ami a *szilárd komponens minőségét* illeti, a kísérletek bebizonyították, hogy ez nem függ, a léptéktől, a szuszpenzió koncentrációtól, a hőmérséklettől, túlnyomástól, mindig, mint a hulladék, mint a karbonátok esetén a megszabott időben bemért szilárd anyag, ugyanazokat a spektrumokat mutatja. Összehasonlítva a kapott spektrumokat, a potenciális kapható kristályok spektrumaival (gondolunk itt a kalcium szulfitra, kalcium szulfát dihidrátumra), akkor azt tapasztaljuk, hogy míg a kemoszorpció után szulfit és karbonát keverékkel állunk szembe, addig az oldatból kikristályosodott anyag kalcium szulfát.

Ismert, hogy a reakcióval járó abszorpciós folyamatok esetén, a reakció-hatását az u.n relatív aktiválási tényezővel fejezik ki [10]:
$$E^* = \frac{N'_A}{N_A} = \frac{k_L \cdot \Delta C}{k_L^0 \cdot \Delta C} = \frac{k_L}{k_L^0} \quad (1)$$

ahol: N'_A , N_A - a reakció jelenlétében, illetve annak hiányában abszorbeált komponens, mol/m²s, k_L , k_L^0 - a reakció jelenlétében és annak hiányában mért anyagátadási tényező, m/s, ΔC - az abszorpciós folyamat hajtóereje, mol/L

Mint, ahogy az 1. táblázat is tükrözi, a számított relatív aktiválási tényező a hulladék kalcium karbonát esetén mutatott legkisebb értéket, de az örlés bevezetésével ez növelhető.

Az relatív aktiválási tényező értéke különböző fajtájú karbonátok esetén.

1. táblázat

Karbonátfajta	Import mészkő	Alsóvácai mészkő	Vegytiszta mészkő	Hulladék	13 órát örlt hulladék
Az aktiválási tényező értéke	2,11	1,87	2,01	1,67	2,07

Alkalmazva Whitmann illetve Dankwerts által javasolt, a rendszer tulajdonságait figyelembe vevő módszereket [10], kiszámítottuk a karbonát szuszpenzió által kifejtett relatív aktiválási tényező értékét. A számított értékek (1,57 és 1,75) elég jól megközelítik a mérésekre alapozottakat, melyek a karbonát hulladék esetén 1,67 és 2,07 között mozogtak.

ÖSSZEFOGLALÁS

A hulladék kalcium karbonát szemcsemérete bár különbözik a kereskedelmi kalcium-karbonátoktól, azonos kristály és hasonló vegyi összetétele lehetővé teszi a környezet védelmi technológiák mészkő helyettesítő adalékaként való felhasználásra. Ami a szemcseméret csökkentését illeti, a kísérletek bebizonyították, hogy száraz, de főleg nedves örléssel a kezdeti hátrányát könnyen ki lehet küszöbölni, oly annyira, hogy a golyósmalomban nedvesen örlt hulladék, megközelíti a vegytiszta kalcium karbonát szemcseeloszlását. Ami a reaktivitást illeti, a kísérletek azt bizonyítják, hogy az örlt hulladék semlegesítő kapacitása nagyobb, mint sok örlt mészkőé, s nem marad sokkal a vegytiszta kalcium karbonát alatt. Kéndioxid megkötő képessége szempontjából, az örléssel előállított hulladék épp oly nagy aktiválási tényezőt biztosít, mint a vegytiszta, vagy a nagyon kis szemcseméretű mészkő.

IRODALOM

- [1] Reményi, K., *Az energetikai fejlesztés fő irányai*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2004.
- [2] *** Flue Gas *Desulfurization Systems*, ASME INTERNATIONAL 2002 (www.asme.org).
- [3] Szép, Al., Varul, *Tehnologie și utilizări*, Ed. Cerami, Iași, 2005.
- [4] Szép, Al, Barbu, C.H, Burlacu, A., Mihăilă, Gh. Cercetări privind folosirea carbonatului de calciu precipitat pentru desulfurarea gazelor, *Rev. Chim. (București)*, 2000, 1, p.60-65.
- [5] Szép, Al, Burlacu, A., Mihăilă, Gh. Barbu, C.H., Cercetări privind folosirea carbonatului de calciu precipitat pentru desulfurarea gazelor II. Influența factorilor cinetici, *Rev. Chim. (București)*, 2000, 3, p.158-163.
- [6] Szép, Al. , Barbu, C.H., Mihăilă, Gh., Removal of Sulfur Dioxide from Flue Gases by Capture on Precipitate Calcium Carbonate. I. Mechanism of the Process, *Anal. St. Univ. A.I. Cuza Iași*, Tom. VI,s. Ch., 1998, p.177-184.
- [7] Barbu, C.H., Szép, Al., Mihăilă, Gh., Removal of Sulfur Dioxide from Flue Gases by Capture on Precipitate Calcium Carbonate. II. Sulfation Model, *Anal. Șt. Univ. A.I. Cuza Iași*, Tom. VII,s. Ch., 1999, p.157-170.
- [8] Szép Al., Mihaila Gh., Studiul cinetic al dizolvării carbonatului de calciu precipitat în soluții de dioxid de sulf, *Rev. Chim (București)*, 2005, 8, p.768-773.
- [9] Szép Al., Mihăilă Gh., Harja Maria, Characterization of Waste Calcium Carbonate Slurry Prepared by Milling, *Anal. Șt. Univ. A.I. Cuza Iași*, Tom XIV, Seria Ch., 2006, p.99-106.
- [10] Bogza G., Muntean O., *Reactoare Chimice*, vol. II, Editura Tehnică, București, 2001.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönettel tartoznak a CNCSIS –nek az 558 téma keretében nyújtott anyagi támogatásért.

Összehasonlító morfológiai és elektrokémia vizsgálatok földigiliszták izomzatának szerotonerg beidegzésében

Correlative Morphometric and Electrochemical Measurements of Serotonergic Innervation in Earthworm Muscles

TAKÁCS Boglárka¹, Dr. CSOKNYA Mária², Dr. GÁBRIEL Róbert², Dr. NAGY Géza¹

¹Általános és Fizikai Kémia Tanszék, Pécsi Tudományegyetem, H-7624, Pécs, Ifjúság u. 6

²Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszék, H-7624, Pécs, Ifjúság u. 6

Tel.: +3672503600, E-mail: tboglarka@freemail.hu, www.pte.ttk.hu

ABSTRACT

Distribution of serotonin content of nervous fibers in both the somatic and the visceral muscle of Eisenia fetida have been investigated using immunocytochemical staining and voltammetric measurements. Good correlation was found between the innervation density and i_p values of Differential Pulse Voltammetry (DPV) in different anatomical areas. As far as we know this is the first report using in vivo voltammetry investigating serotonin content in earthworm, Eisenia fetida.

1. BEVEZETÉS

Szerotonin (5-HT) az egyik legfontosabb szignál molekula a földigilisztákban. A hasdúc-lánc 5-HT tartalmú neuronjai idegrostokkal kapcsolódnak a bőrizomtömlőhöz (szomatikus izom), valamint a bélrendszerhez (viscerális izom). Az ideg-izom szinapszisokban a szerotoninnak fontos szerepe van [4], hatása kettős, lehet serkentő [5] és gátló [1] egyaránt, a farmakológiai vizsgálatok tanulsága szerint a hatás a 5-HT pillanatnyi koncentrációjától függ.

Az 1970-es évek közepétől indult hódító útjára az in vivo voltammetria módszere, aminek segítségével könnyen nyomon követhetők az elektroaktív neurotranszmitterek/modulátorok koncentrációváltozásai élő állatokban.

Korábban megjelent tanulmányainkban bemutattuk a szerotonin rostok előfordulását, megállapítottuk az izomzatra kifejtett hatását és hatékony koncentrációját, leírtuk a közvetítő 5-HT receptor típusát. Ezen ismeretek birtokában vetődött fel a kérdés, hogy vajon elektrokémiai úton, in vivo voltammetria segítségével detekálható-e az 5-HT koncentráció az izomsejtek rostjaiban.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Állatok

Vizsgálatainkat *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida) kifejlett példányain végeztük. A kísérletek megkezdéséig klímaszekrényben tartottuk őket standard hőmérsékleten (10 °C) és páratartalomban (60%).

2.2. Immuncitokémiai vizsgálatok

2.2.1. Fixálás

Az állatokat szénsavas vízben érzéstelenítettük. A test első 20 szelvényét Zamboni-oldatban [6] fixáltuk 24 órán keresztül.

A fixálás után a szöveteket 0.1 M-os foszfát-pufferben (PBS, pH 7.4) mostuk, felszálló etanol sorozatban dehidratáltuk és Paraplastba ágyasztuk. 7 μ m vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk egy rotációs mikrotom segítségével (Anglia Scientific Instruments LTD, Cambridge, England) és a metszeteket króm-alumínium-zselatin bevonatú tárgylemezre vettük fel.

2.2.2. Fénymikroszkópos immuncitokémia

Deparaffinálás és rehidratálás után a következő protokollt követtük: a metszeteket 3x20 percig foszfát-puffer–Triton X–100 (PBS–TX) oldatban mostuk, 0.25%–os marha szérumban albumint, 0.025% TX–et és 0.01% Na–azidot tartalmazó PBS–sel hígított 10%–os normál kecske szérumban előinkubáltuk.

Az elsődleges antitesttel [nyúl poliklonális anti 5–HT antiszérumban (Sigma)] való 12 órás inkubálás után, PBS–ben való mosást követően a metszeteket biotinilált kecske anti–nyúl IgG (Sigma) 1:20 arányban hígított szérumával inkubáltuk 1 órán át, majd egy újabb PBS–es mosás után ExtrAvidin Peroxidáz (Sigma) 1:20 arányban hígított komplexében történő újabb 1 órás inkubálás következett.

Az összes antiszérumban PBS–TX–BSA–ban hígítottuk ki és szobahőmérsékleten dolgoztunk velük. A lokális peroxidáz aktivitás indikálására 0.05% 3,3–diaminobenzidint és 0.01% H₂O₂–ot tartalmazó 0.1 M TRIS–HCl pufferben inkubáltuk a metszeteket 15 percig.

A metszeteket felszálló etanol sorozatban dehidratáltuk, xyloolban tisztítottuk és DPX–el fedtük le.

A kontroll vizsgálatokat az elsődleges antiszérumban elhagyásával és helyette 1%–os normál kecske szérumban hozzáadásával készítettük.

2.2.3. Kvantitatív fénymikroszkópiás vizsgálatok

A preparátumokat CCD kamerával ellátott Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A fényképeket Adobe Photoshop 7.0 szoftver segítségével értékeltük ki. A színes képeket szürke árnyalatossá konvertáltuk, az így kapott inverz fotókat használtuk, így módon az általunk vizsgálni kívánt terület (5–HT tartalmú idegelemek) automatikusan fehér árnyalatú lett. A denzitometriai vizsgálatokhoz négy anatómiai területet választottunk ki: a test első szelvényét, a második szelvényt, mint a bőrízomtömlő részeit, valamint a garat és a gyomor területét. Az immunpozitív terület arányát a Histogram menü segítségével határoztuk meg és fejeztük ki annak százalékos előfordulását.

2.3. Voltammetriás vizsgálatok

2.3.1. Mikroelektrodok

33 µm átmérőjű szénszálakból készítettük az elektrodokat. A szénszálakat a Specailty Materials (Massachusetts, USA) cégtől kaptuk ajándékba. Minden alkalommal egyetlen szénszál helyezettünk egy üveg kapillárisba (d=1.1 mm), majd egy vertikális kapilláris húzó készülék segítségével (P–30 Micropipette Puller, Sutter Instrument Co.) mikropipettát húztunk. Egy éles penge segítségével levágtuk a mikropipettából kilógó szénszálakat. Az elektromos kontaktust a mikropipetta belsejébe juttatott higany és réz szál biztosította. Az elektrod felületére Nafion film bevonatot készítettünk oly módon, hogy az elektrodokat 5%–os Nafion (Sigma) oldatba mártottuk háromszor, minden alkalommal 3–5 másodperc időtartamig és a bemártások között 2–3 perc száradási időt biztosítottunk. Ezután az elektrodokat vagy szobahőmérsékleten szárítottuk 12 órán keresztül, vagy 80°C–os kemencében 10–15 percig.

1 mm átmérőjű Ag/AgCl huzalt használtunk kvázi referencia elektrodként és 0.3 mm átmérőjű Pt huzalt segédelektrodként.

2.3.2. In vivo vizsgálatok

A vizsgálataink során DPV mérési programot alkalmaztunk PAR (Model 273 A) és CH Instrument 700C Elektrokémiai mérőállomás alkalmazásával. A leggyakrabban alkalmazott mérési paraméterek az alábbiak voltak: pásztázási potenciál ablak –0.2 V, +1.2 V; pásztázási sebesség 20 mV/sec; lépés hossz 1.000 mV; potenciál pulzus szélesség 50 ms; potenciál pulzus nagyság 50mV.

Az állatokat szénsavas vízben érzéstelenítettük, majd 2 csoportra osztottuk őket. Az egyik csoportban a mikroelektrodot függőlegesen, a bőrízomtömlő dorzális oldala felől vezettük be az első és a második testszelvény körkörös izomrétegéig. Míg a másik csoport esetében a bőrízomtömlő dorzális felét, a 3–15 szelvények között felvágtuk, hogy a garat és a gyomor jól láthatóvá váljon, majd ezután juttattuk az elektrodokat függőlegesen az említett két szerv saját izomrétegébe.

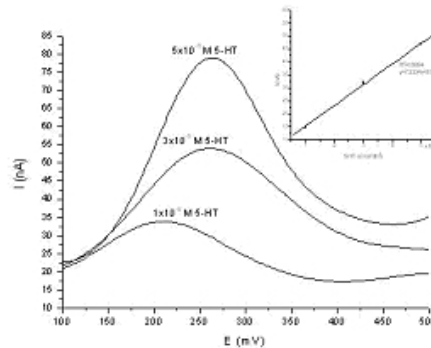
A szénszál mikroelektrodokat mind a vizsgálat előtt, mind a vizsgálat után ismert koncentrációjú, frissen készített 5–HT (Sigma) oldatok alkalmazásával kalibráltuk.

3. EREDMÉNYEK

3.1. In vitro vizsgálatok

A 5–HT, mint elektroaktív molekula, 4 elektronos reakcióban (CECEC mechanizmus szerint) oxidálódik a szénszál felületén.

A földigiliszták szerotonin tartalmú rostjaiban az 5-HT koncentrációja a μM -os nagyságrendbe esik, ezért szükséges DPV mérőprogramot alkalmazni a voltametriás méréshez. A lehetséges méréstartomány felmérésére in vitro voltametriás vizsgálatokat végeztünk. Az 1. ábra $33\ \mu\text{m}$ átmérőjű szénszálás elektród segítségével, különböző koncentrációjú szerotonin oldatokban készített DPV voltammogramokat, és a voltammogramok alapján szerkesztett kalibrációs görbét mutatja.



1. ábra

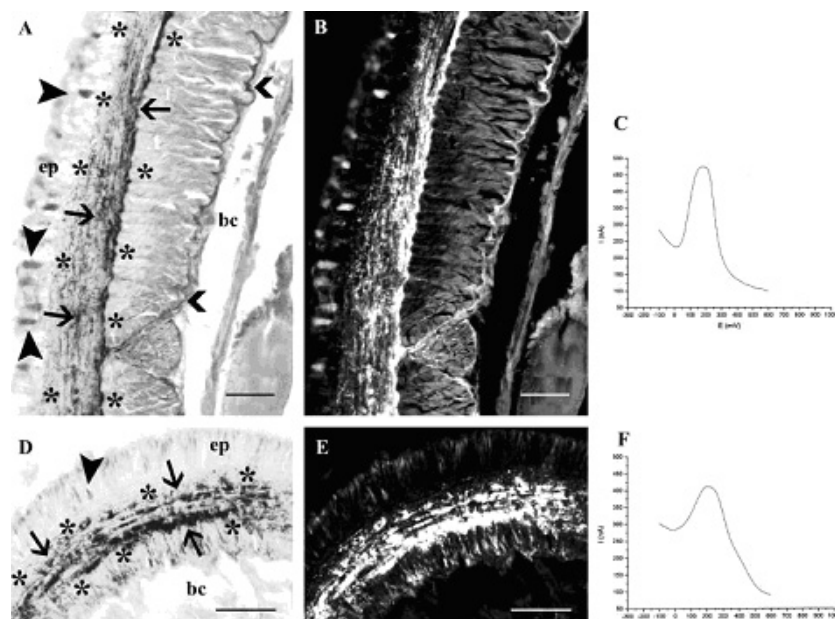
Különböző koncentrációjú 5-HT oldatokban készített DP voltammogramok. Az inset a kalibrációs görbét mutatja (pásztázási potenciál ablak $-0.2\ \text{V}$, $+1.2\ \text{V}$; pásztázási sebesség $20\ \text{mV/sec}$; lépés hossz $1.000\ \text{mV}$; potenciál pulzus szélesség $50\ \text{ms}$; potenciál pulzus nagyság $50\ \text{mV}$).

3.2. In vivo vizsgálatok

3.2.1. Bőrizomtömlő

A földigiliszták bőrizomtömlője három fő rétegből áll, az epitheliumból, a körkörös – és a hosszanti izomrétegből. A neurotranszmitterek/modulátorok ugyancsak három idegfonadékból szabadulnak fel. Ezek közül is a legfejlettebb a körkörös – és hosszanti izomréteg között húzódó plexus muscularis [3].

A rost vastagsága az általunk használt mikroelektródok hegyátmérőjének tartományába esik, így módon az elektródot a rostkötegbe juttatva azok belsejében voltammogramokat vehettünk fel Differenciál Pulzus üzemmódban. Ezzel párhuzamosan denzitometriás mérés technikával az immunreaktív rostok %-os előfordulását is meghatároztuk. Két anatómiai régióban vizsgáltuk a 5-HT tartalmat és a rostok denzitását, nevezetesen az első testszelvényben, azaz a prostomiumban és a második testszelvényben.



2. ábra

Immunhisztokémiai és voltametriás mérések eredményeinek összehasonlítása a testfal 1. és 2. testszelvényeiben

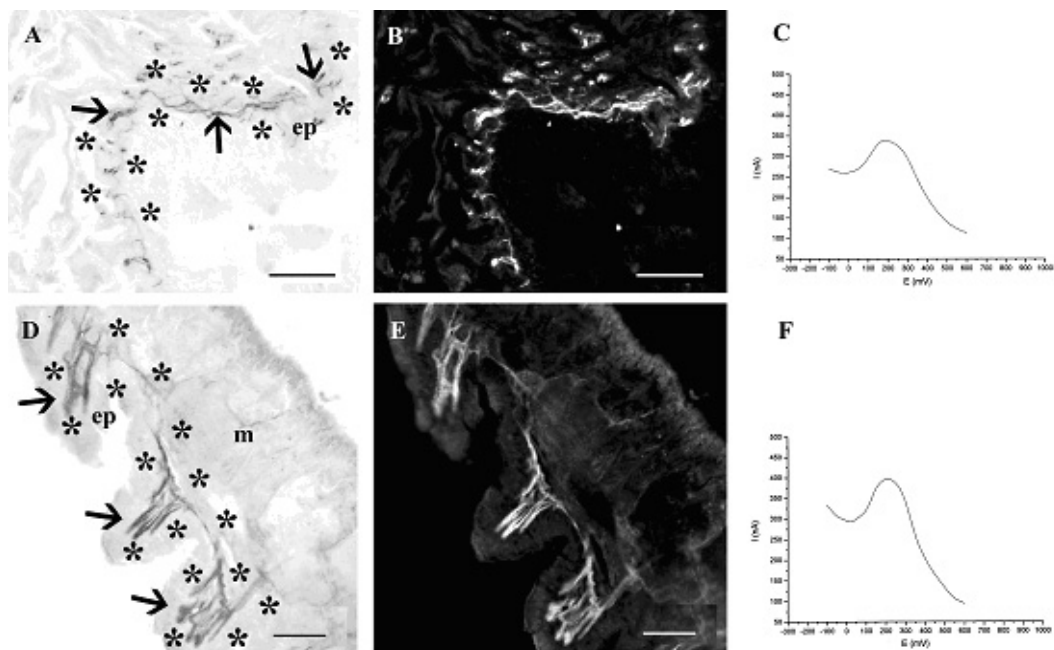
A 2. A ábrán (ep: epithelium, bc: body cavity) a 2. testszelvény gazdag innervációja látható, míg a 2. D (ep: epithelium, bc: body cavity) ábrán a prostomiumé. A 2. B és 2. E ábrák mutatják be az immunhisztokémiai fotókból készített denzitometriás képeket. A 2. C ábrán a 2. testszelvény plexus muscularisában készített DPV felvétel látható, míg a 2. F ábra a prostomium muscularis plexusában készített DPV felvételt mutatja. Mind az A, mind pedig a D fotón csillagokkal határoltuk körül az általunk vizsgált immunpozitív területet, a nyilak pedig a muscularis idegfonadéokra mutatnak. Mind a négy mikrófotón (2. A, 2. B, 2. D, 2. E) a skála jelzés 50 μm hosszú. A denzitometriás fotókon (2. B és 2. E) jól látható a plexus vastagsága közötti különbség, amit a DPV felvételekről (2. C és 2. F) leolvasható csúcsáramintenzitások is alátámasztanak.

A denzitometriás adatfeldolgozással kapott immunpozitív rostok előfordulása a 2. testszelvény esetében $2.73 \pm 1.0\%$ -nak ($n=4$) adódott, míg ugyanez az érték a prostomium, azaz az 1. testszelvény esetében $1.02 \pm 0.2\%$ ($n=4$) volt. Hasonlóan a denzitometriás adatokhoz, a DPV felvételekről leolvasható csúcsmagasság a 2. testszelvény esetében 272.5 ± 15.0 nA-nek ($n=4$) adódott, míg az első testszelvényben készített DPV felvételek csak 135.0 ± 5.8 nA ($n=4$) csúcsáramintenzitást adtak. Az előzetes kalibráció alapján a regisztrált csúcsáramintenzitások (i_p) kb. 320 μM és 158 μM 5-HT koncentrációknak felelnek meg.

3.2.2. Garat és gyomor

A földigiliszták, és így az általunk tanulmányozott *Eisenia fetida* viscerális szerveinek beidegzésében is fontos szerepe van a 5-HT-nak. A garat és a gyomor egész hosszában egy enterikus idegfonadék húzódik, mely idegrostokból épül fel [2].

Munkánk ezen részében a viscerális szervek beidegzéséről kapott immunhisztokémiai–denzitometriai adatokat kívántuk összehasonlítani a voltammetriás módszerrel nyert áramintenzitás értékekkel. Eredményeinket a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra.

Immunhisztokémiai és voltammetriás mérések eredményeinek összehasonlítása garat és gyomor testrészek esetében

A 3. A ábra az eredeti 5-HT immunfestett morfológiai képet mutatja be (ep: epithelium), míg a 3. B ábrán ennek denzitometriás adatfeldolgozás céljából készített inverze látható. A fotók a garatról készültek. A 3. C ábrán a garatban készített voltammetriás felvétel látható, DPV üzemmódban.

A 3. D fotón látható kép a gyomorról készült 5-HT immunfestéssel, a 3. E ábrán pedig az előző fotó denzitometriás képe látható. A 3. F ábrán látható a gyomor enterikus plexusában készített DPV felvétel. Mind az 3. A, mind pedig a 3. D fotón csillagokkal határoltuk körül az általunk vizsgált immunpozitív területet, a

nyilak pedig az enterikus fonadékra mutatnak. Mind a négy mikrófotón (3. A, 3. B, 3. D, 3. E) a skála jel hossza 50 μm .

A denzitometriás eljárással kapott immunpozitív rostok százalékos előfordulásai a garat esetében $1.12 \pm 0.6\%$ -nak ($n=4$), míg a gyomor esetében $1.28 \pm 0.6\%$ -nak ($n=4$) adódtak. Az ugyanezen két területen szénszálas mikroelektroddal detektált csúcsáramintenzitások a következők voltak: 122.5 ± 5.0 nA ($n=4$) és 137.5 ± 12.6 nA ($n=4$). Az előzőleg felvett kalibrációs egyenes alapján ezek az i_p értékek kb. 158 μM és 161 μM 5-HT koncentráció értékeknek felelnek meg.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálatainkban a trágyagiliszta (*Eisenia fetida*) különböző anatómiai területeinek 5-HT tartalmát vizsgáltuk két különböző módszerrel: egyrészt a széles körben alkalmazott immunhisztokémia festéssel, kiegészítve azt denzitometriás vizsgálatokkal, másrészt szénszálas mikroelektroddal, voltametriás méréseket végezve. Célunk az volt, hogy a két módszer eredményeit összehasonlítsuk, valamint, hogy a voltametriás módszer földigilisztákban való alkalmazhatóságáról és használhatóságáról információkat kapjunk.

Mind a viscerális-, mind pedig a szomatikus izmok 5-HT beidegzését megvizsgáltuk mind a két módszer segítségével. Véggkövetkeztetésként elmondhatjuk, hogy a voltametriás adatok jó egyezést mutattak az immunhisztokémia festési eljárás, valamint a denzitometriás kiértékelés eredményeivel. Ez számunkra azt jelenti, hogy a szénszálas mikroelektroddal végzett DPV alkalmas módszer a földigiliszták különböző testsejtszerveiben lévő 5-HT koncentráció nyomon követésére. A módszer előnye, hogy élő, altatott állatokon végezhető a kísérletek, különböző anatómia régiók vizsgálhatók egymás után. Különböző időben ismételtetők a mérések azonos helyen, így a lokális koncentrációváltozások is figyelemmel kísérhetők.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők ezúton szeretnének köszönetet mondani Kiss Gyeretyánnának a technikai segítségért. A kutatásainkhoz az anyagi segítséget a MTA–PTE Adaptáció Biológiai Kutatócsoport és a Magyar Tudományos Alap (OTKA, T049502) nyújtotta.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Anctil, M., Laberge, M., Martin, N., 1984. Neuromuscular pharmacology of the anterior intestine of *Chaetopterus variopedatus*, a filter-feeding polychaete. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C, 343–351.
- [2] Barna, J., Csoknya, M., Lázár, Zs., Hámosi, J., Elekes K., 2001. Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). *J. Neurocytol.* 30, 313–325.
- [3] Csoknya, M., Takács, B., Koza, A., Dénes, V., Wilhelm, M., Hiripi, L., Kaslin, J., Elekes, K., 2005. Neurochemical characterization of nervous elements innervating the body wall of earthworms (*Lumbricus*, *Eisenia*): immunohistochemical and pharmacological studies. *Cell Tissue Res.* 321, 479–490.
- [4] Gardner, C.R., Walker, R.J., 1982. The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in Annelids and related invertebrates. *Progr. Neurobiol.* 18, 81–120.
- [5] Krajniak, K.G., Klohr, R.W., 1999. The effects of FMRFamide, serotonin, and acetylcholine on the isolated crop-gizzard of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 123A, 409–415.
- [6] Zamboni, L., De Martino, L., 1967. Buffered picric acid formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 35, 148B.

Újabb eredményeink a növényi hormonok hatásmechanizmusa kutatásában

New Results in the Research of the Activity Mechanism of Phytohormones

TÖKÉS Béla¹, BĂLAN Júlia², BODÓ Erzsébet²,
DONÁTH-NAGY Gabriella¹, SZAKÁCS János¹

¹Marosvásárhelyi Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem, ROMANIA

²SAPIENTIA Magyar Tudományegyetem, ROMANIA

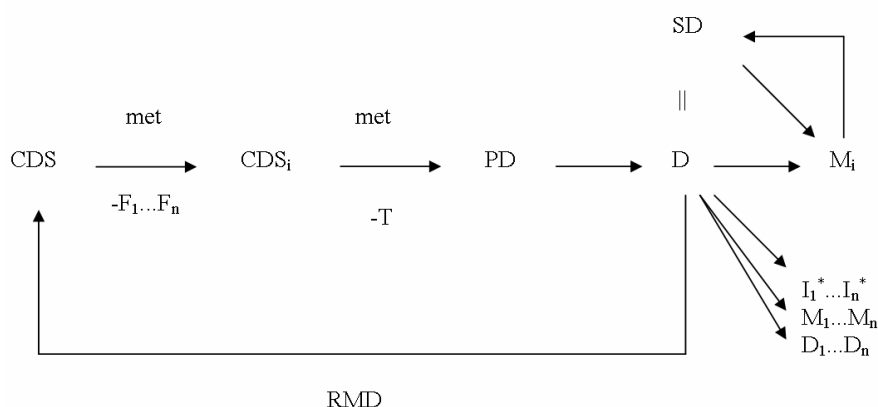
ABSTRACT

As we demonstrated previously, the concept of the „soft” chemicals can be extended on phytohormones, modifying their mechanism from oxidative in hydrolytical one. In this way, in the action mechanism of auxines doesn't form free radicals, inhibitors of the growth, in usual conditions. We realized the same effect adding natural free radical traps (ascorbic acid, polyphenols) to the auxine solutions. Beside the supposable results, we remarked supplementary some oscillatory phenomena unknown in the phytobiology.

1. BEVEZETÉS

Ismeretes, hogy a növényi hormonok (auxinok) növekedésserkentő hatása az idő és a koncentráció függvényében éles maximumon halad át [1]. Ennek, illetve az auxinok hatásmechanizmusának a magyarázatára több elmélet született, amelyek közül az tűnik elfogadhatóbbnak, hogy az auxin működése közben fotooxidáció megy végbe, ami szabadgyökképződéshez vezet, a szabadgyökök viszont gátolják (feed-back) a hormon további hatását. Ennek a mechanizmusnak a bizonyítására felhasználtuk Bodor retrometabolizmusra alapozott gyógyszer- és vegyszertervezés felfogását [2]. Céljának elérésére Bodor két utat ajánl: a kémiai célbajuttatás rendszerét (CDS) és a lágy gyógyszerek (SD) létrehozásának lehetőségét (1. ábra).

Ez az elmélet arra irányul, hogy élőszervezetekbe jutó gyógyszerek (vegyszerek) oxidatív metabolizmusát hidolitikusra cserélje ki, és ily módon – a szabadgyökképződés kizárásával – csökkentse a vegyületek toxicitását, illetve – gyógyszerek esetén – növelje azok terápiás hatását:



1. ábra

A retrometabolikus gyógyszertervezés elvi vázlatja

1: Gyógyszer-toxicitás:

$$T(D) = T^D(i) + T(A_1, A_2, \dots, A_n) + T(M_1, M_2, \dots, M_n) + T(I^*_1, I^*_2, \dots, I^*_n)$$

$T^D(i)$; intrinszik toxicitás
 A_1, A_2, \dots, A_n ; analóg metabolitok D típusú hatással
 M_1, M_2, \dots, M_n ; más metabolitok
 $I^*_1, I^*_2, \dots, I^*_n$; reaktív köztitermékek
 $TI = TD/ED$; terápiás index
 T = toxicitás
 TD = Toxikus dózis
 ED = Effektív dózis

2: *Vegyszerek (C)*:

$T(C) = TC(i) + T(C_1, C_2, \dots, C_n) + T(M_1, M_2, \dots, M_n) + T(I^*_1, I^*_2, \dots, I^*_n)$

$TC(i) \ll TD(i)$

$I^*_1, I^*_2, \dots, I^*_n$; fontosabb köztitermékek

$SI = TD/EmD$; biztonsági index

EmD = Maximális környezeti dózis

Az adott vegyület „meglágyítása” gyakran úgy érhető el, hogy a molekulában lévő telített oldalláncokban két vicinális metilénsoportot velük izoelektronikus és izosztérikus észter- vagy fordított észter-csoporttal cserélnek ki.

2. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, MÓDSZEREK

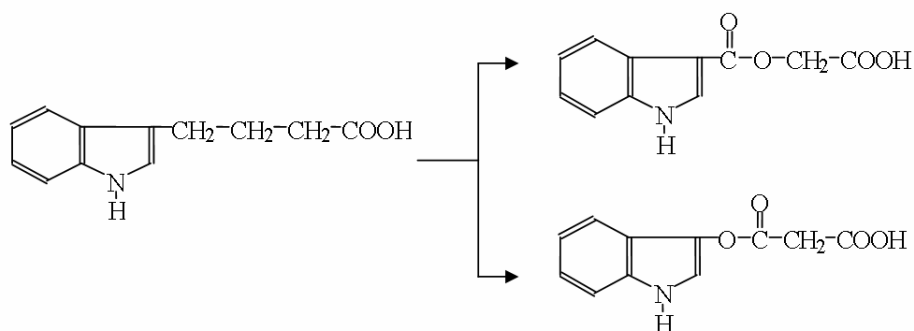
A tanulmányozott vegyületeket (nitronok, „lágyított” auxinok) kutatócsoportunk szintetizálta, azonosításukat, szerkezet- és tisztaságvizsgálatukat elemi analízissel és IR spektrumok alapján végezte [6].

A csíráztatási kísérletekhez búzaszemeket használtunk, a tápoldat auxint és aszkorbinsavat tartalmazott, adott koncentrációban. Vizsgáltuk a csíra hosszának növekedését az idő függvényében. Méréseinket minden esetben 50-50 gabonaszemen végeztük, eredményeinket átlagoltuk és statisztikusan feldolgoztuk.

Az auxin-tormaperoxidáz-oxigén rendszerben az időbeli oszcillációkat potenciometriásan követtük, a Pt-elektrod jelének időbeli változását rögzítettük. A peroxidázt tormából vontuk ki Tris pufferoldat segítségével [4, 5].

3. EREDMÉNYEK

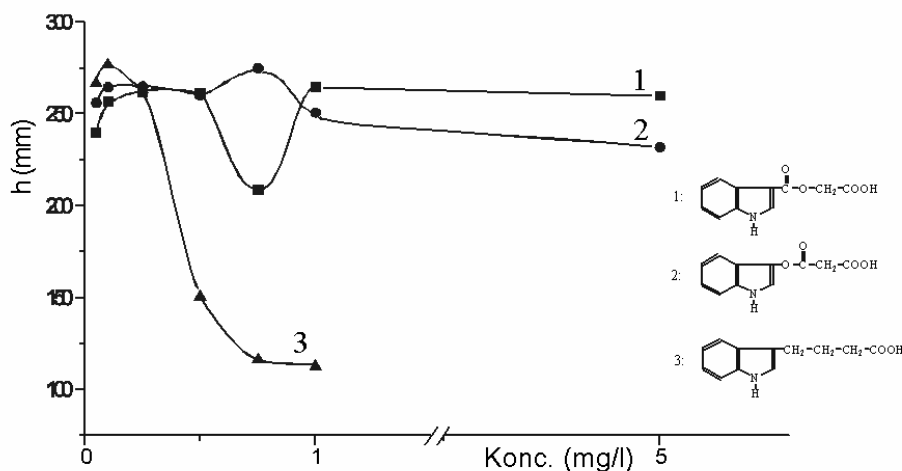
Kutatócsoportunk az indolil-vajsav (IBS) etilénsoportját kelyettesítette észter- illetve fordított észter csoporttal [6] (2. ábra):



2. ábra

Az indolil-vajsav meglágyítása

Kutatásaink során azt észleltük, hogy az auxin-hatás a „lány” IBS esetén nem halad át maximumon, hanem egy határérték elérése után, jó közelítéssel állandó marad, tehát az oxidatív bomlás kizárása a hatásgátlás megszűnésével jár együtt. (3. ábra).

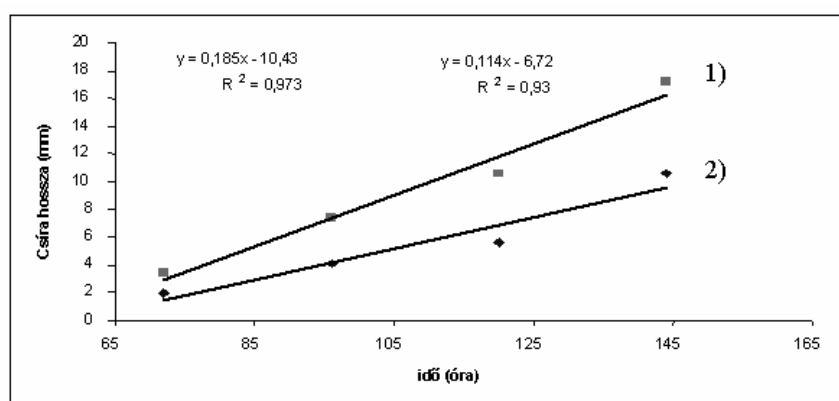


3. ábra

Az IBS és a megfelelő „lány” észterek növekedés-serkentő hatása etiolált zabkoleoptilre.

Ez az eredmény eredeti (szabadgyökös mechanizmusra vonatkozó) elképzelésünket igazolta. Logikus következtetésként feltételeztük, hogy minden szabadgyökfogó adaléknak az auxinok hatását hasonló módon kell befolyásolnia. Erre a célra elsősorban olyan anyagokra gondoltunk, amelyek a növényi szervezetek számára nem idegenek (pl. polifenolok).

A vizsgálatok első szakaszában a szabadgyökbefogást aszkorbinsav hozzáadással valósítottuk meg (4. ábra). Az ábrából kitűnik, hogy azoknak a búzaszemeknek a csírájuk gyorsabban fejlődött, amelyeket olyan tápoldaton csíráztattunk, melyek az indolecetsav mellett gyökfogót is tartalmazott.

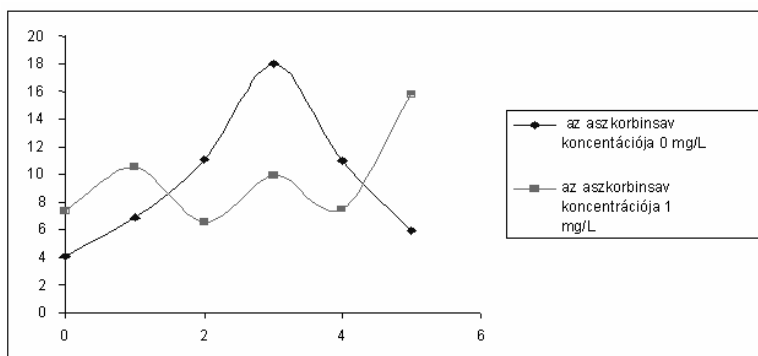


4. ábra

A búzacsíra időbeli növekedése: 1) Vakpróba, 2) Auxinkoncentráció 1 mg/l

Az eredmények általában megfeleltek a várakozásnak, de a hatás a vártnál sokkal komplexebb volt. Az éles maximumon való áthajlás nem jelentkezett, de – evvel szemben – fellépett egy periodikus hatásgátlás,

amelyet úgy értelmezünk, hogy a sorozatos serkentés-gátlás egy különleges esetének, mint oszcillációs jelenségnek, vagyunk a tanúi (5. ábra).

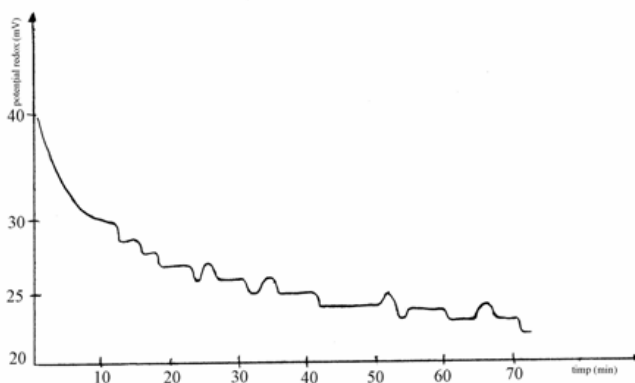


5. ábra

A csírák hosszának változása az auxinkoncentráció függvényében 120 óra után

Az egzotikus oszcillációs reakciók számos esete ismert mind a kémiában, mind pedig az élő szervezetekben, a fitobiológiában azonban hasonló jelenséget ritkán írtak le.

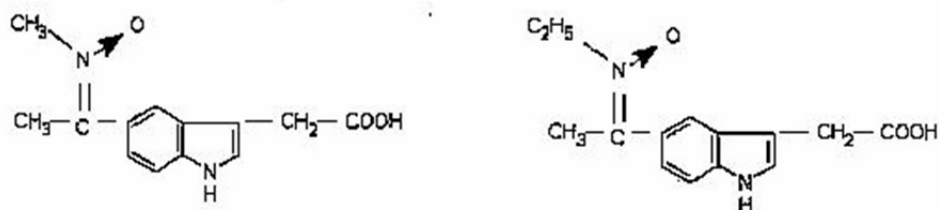
Ilyen jelenséget észlelt Degn [3] az auxin – peroxidáz – oxigén rendszerben. Azt tapasztalta, hogy in vitro, oszcillációs reakciók lépnek fel, amit az oxigén-koncentráció változásának követésével mutattak ki. Mi ezt a jelenséget a rendszer redoxipotenciáljának a mérése útján tanulmányoztuk. Mivel az említett szerzők szerint egyes fenolok a reakciót fokozzák, megvizsgáltuk néhány növényi polifenol (morin, rutin) hatását is (6. ábra). Ezek a körülmények a növényi szervezetekben is kialakulhatnak. Bár a fellépő oszcillációs reakciók részletes mechanizmusa igen bonyolult, a megfigyelések alapján feltételezzük, hogy a növényéletben ismert maximum áthaladó auxin-hatás az oszcillációs folyamatok egyik természetes megnyilvánulási formája [4].



6. ábra

Az IES-tormaperoxidáz-oxigén rendszer redoxi-potenciáljának időfüggése, polifenolok jelenlétében.

A határmechanizmus tisztázása érdekében kutatócsoportunk olyan vizsgálatokat is végzett, amelyekben a gyökfogót – ebben az esetben a nitron csoportot – nem az oldathoz adta, hanem az auxin szerkezetébe építette be (7. ábra):



7. ábra
A vizsgált, nitron csoportot tartalmazó auxinok

Fitobiológiai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a szintetizált vegyületek nem genotoxikusak (nem módosítják a növényi kromoszómák szerkezetét), a növekedésserkentő hatásmechanizmusuk pedig megfelel azoknak a kísérleteknek, amelyekben a gyökfogót az auxin oldatához adtuk.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy az auxinok lebomlása a növényi szervezetben, természetes körülmények között gyökös mechanizmus szerint megy végbe. Az auxin „meglágyítása” során a gyökös lebomlás helyett a hidrolitikus reakcióút válik valószínűbbé, nem jelentkezik tehát a keletkező szabadgyökök gátló hatása. Hasonló eredményhez jutunk, ha az auxin oldatához természetes gyökfogókat (aszorbinsavat, polifenolokat) adunk, vagy a gyökfogót (esetünkben nitroncsoportot) beépítjük az auxin szerkezetébe. A beépített nitroncsoportot tartalmazó auxinok genotoxicitására vonatkozó vizsgálatok eredményei negatívak.

A fitobiológiában igen ritkán tapasztalt oszcillációs jelenséget is megfigyelhettünk az auxin hatásmechanizmusában az auxinkoncentráció, valamint az idő függvényében.

IRODALOM

- [1]. Antolič S, Salopek B, Kojič-Prodič B, Magnius V, Cohen JD: Plant Growth Regulation, **27**, 21 (1999).
- [2]. Bodor N: In: DeVito S, Garrett RL (eds.): Designing safer chemicals. Green Chemistry for pollution prevention. ACS Symposium Series No. 640, p. 84, Washington, 1996.
- [3]. Degn H: In: Chance B, Pye EK, Ghosh AK, Hess B (eds.): Biological and biochemical Oscillators. Chemiluminescence in oscillatory oxidation reactions catalyzed by horseradish peroxidase. Academic Press, New York-London, 1973, p. 97.
- [4]. Donáth-Nagy Gabriella, Tőkés B., Szilágyi Erzsébet: Studiul unor oscilatori fitobiologici, Revista de Medicină și Farmacie – Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle, 2004, **50**:17-20
- [5]. Szilágyi Erzsébet: Reacții oscilante. Aplicații fitobiologice. Lucrare de diplomă, Universitatea de Medicină și Farmacie, Tg. Mureș
- [6]. Tőkés B, Ferencz L, Szakács J, Kelemen L, Darkó B: Pharmazie, **55**, 3 (2000).

A templát reakciók

Template Reactions

ifj. Dr. VÁRHELYI Csaba¹, Dr. POKOL György², Dr. LIPTAY György²,
Dr. MAJDIK Kornélia¹, Dr. FARKAS György¹, Dr. VÁRHELYI Csaba¹

¹Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kémia kar, Kolozsvár

²Budapesti Műszaki és Közgazdasági Egyetem, Budapest

ABSTRACT

After a short historical survey upon this type of coordination reactions, the authors give a classification of their derivatives using the nature and number of the donor atoms: (NN, NNN, NNNN, OO, OOOO, N₂O₂, N₃O, NS, NP, OP). Some general synthesis methods were also mentioned.

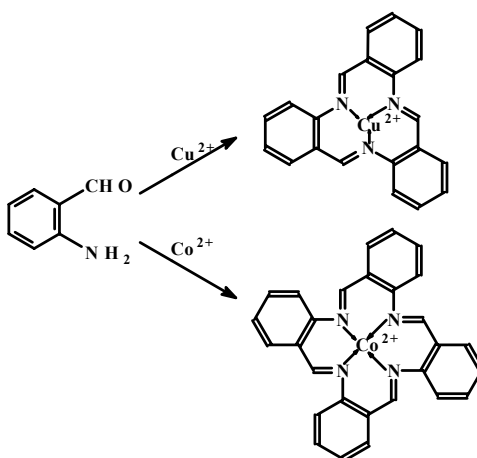
A series of new template reactions were carried out with asymmetric and symmetric α -ketoximes and various aliphatic diamines, in the presence of Ni(II), Pd(II), by refluxing in ethanol, and at room temperature, respectively.

The α -ketoxime starting materials were obtained by isonitrosation of the corresponding monoketones. The obtained macrocyclic complexes were characterized by middle and far infrared spectra (ν_{OH} , ν_{NH} , $\nu_{C=N}$, ν_{NO} , ν_{MO} , ν_{MN}) and ¹H-, ¹³C NMR measurements (δ_{OH} , δ_{CN} , δ_{CO}).

1. BEVEZETÉS

Az angol nyelvre jellemző, hogy számos olyan kifejezést használ, melyek gyakran egymástól teljesen eltérő jellegű fogalmakat jelölnek. Így vagyunk a temple-templát kifejezéssel is, mely templomot, középkori lovagrendet, meg valami szerszámot is jelöl. Bizonyára néhányan olvasták is Sienkiewicz lengyel író könyvét a "Keresztes lovagok"-at mely a templárius rablólovagok felett, a lengyel seregek győzelmének állít emléket.

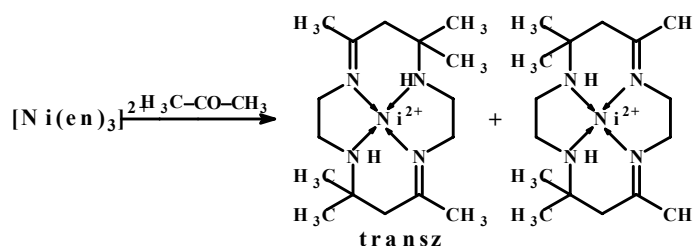
A kémiában Busch amerikai tudós munkássága nyomán merül fel e kifejezés. Klasszikusnak számító kísérletsorozattal kimutatta, hogy az o-amino-benzaldehyd hosszabb állás vagy melegítés hatására dimer, illetve trimer polimer származékká kondenzálódik önmagában. Ha e vegyület alkoholos oldatához réz (II), illetve kobalt (II) sókat keverünk, akkor az **1-es ábrán** látható makrociklusos vegyületek keletkeznek.



1. ábra

Bush klasszikus templát szintézisei

Busch felfedezésével csaknem egyidőben Curtis, újzélandi vegyész, a közismert trisz-etiléndiamin Ni(II)-sóhoz acetont kevert, s zárt üvegedényben napos helyen, talán véletlenül, állni hagyta. Az ibolyaszínű $[\text{Ni}(\text{en})_3](\text{ClO}_4)_2$ komplex eltűnt, s helyette szép barna kristályos termék keletkezett. Alapos vizsgálat során kiderült, hogy tulajdonképpen egy makrociklusos vegyületről, a „ciklám“-ról van szó, kétféle sztereoizomer módosulatban. (2. ábra).



2. ábra
Curtis felfedezése

A fémionok tehát saját koordinációs tulajdonságaiknak megfelelően irányítják megfelelő geometriai elrendeződésbe az olyan kis szerves molekulákat, melyek rendelkeznek bizonyos donoratomokkal (N, O, S, P). A Cu^{2+} tehát síknégyzetes vagy tetraédes, a Co pedig oktaédes konfigurációba irányít. A fémion tehát „szerszámként“, templát hatást fejt ki. A későbbiek során több ilyen kis molekulát változó donorokkal igyekeztek templát reakciókra kényszeríteni, több-kevesebb sikerrel.

A periódusos rendszer sok fémionját próbálták ilyen templát reakciókra bevinni, eddig azonban főleg csak az alkálifém ionok és a 3 d átmenetifém ionok, valamint a Mg^{2+} és a Ca^{2+} voltak alkalmasak ilyen célokra (1. táblázat). A dőlt betűvel jelzett fémionokra ilyen vonatkozásban csak nagyon kis számú irodalmi utalás ismeretes.

A templát reakciókra legalkalmasabb fémek

1. táblázat

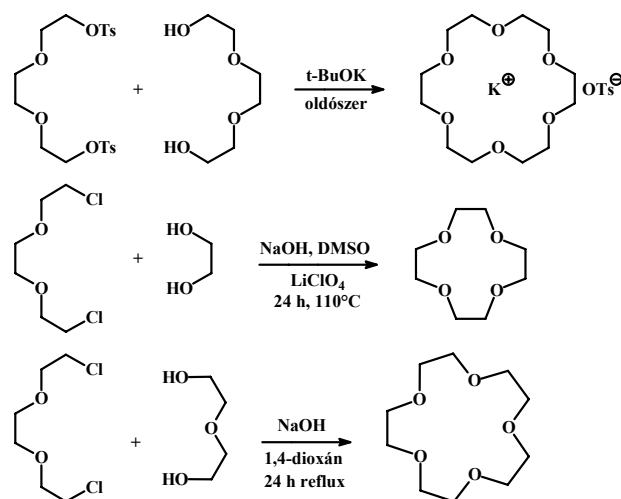
I _a	II _a	III _b	IV _b	V _b	VI _b	VII _b	VIII _b			I _b	II _b
H											
Li	Be	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Na	Mg	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd

Az említett kismolekulák templát ion nélkül különböző kisebb-nagyobb molekulákat hoznak létre, melyek eltérnek a templát reakciók eredményeitől. A templát komplexekből a fémion általában könnyen eltávolítható ásványi savakkal, H_2S -nel, Na_2S -dal, és így a makrociklusos szerves vegyületet tiszta állapotban izolálhatjuk. Bizonyos esetekben viszont nem alkalmazható ez a módszer, mert az egész makrociklusos vegyület szétbomlik, pl. a vas(II)-klatrokelátok esetében: $[\text{Fe}(\text{Diox})_3(\text{BOR})_2]$.

Megjegyzendő, hogy a szabad makrociklusos szerves vegyületek klasszikus preparatív, lépcsőzetes felépítéssel csak nagyon fáradságos soklépcsős szintézisek során lennének előállíthatók. Többségüket meg sem próbálták ily módon nyerni.

A templát reakciók során keletkező makrociklusos vegyületek jelentős részét a donor atomok szerint osztályoztatjuk: homogén származékok, csak egyféle donor-atommal, illetve heterogén, vegyes származékok többféle donoratommal (N, O, S, P). Így pl. a tetradentát makrociklusos vegyületek sematikus ábrázolása: NNNN, OOOO, SSSS, NOOO, ONNN, NNOO (legismertebb), NNNO, NSSS, stb.

A 3. ábrán néhány O-tartalmú makrociklusos vegyületet tüntettünk fel, melyek poliétereknek tekinthetők. Ezeknél a gyűrűt alkotó atomok száma 9 – 60-ig, az oxigén heteroatomok száma pedig 3 – 20-ig is változhat.



3. ábra

Alifás O,O-makrociklusos vegyületek (korona-éterek)

E csoportban legfontosabb származékok az N,O vegyes donoratomú származékok, melyek szalicilaldehid, 1,2- és 1,3-diketonok, valamint 1,2-diaminok kölcsönhatása során keletkeznek. Ezek egyes esetekben fémionok nélkül is képződnek, pl. a szalén: bisz-szalicil-aldehid-etilén-diamin.

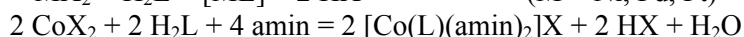
Sok esetben viszont előállításukra templát reakciót kell alkalmazni.

A fémionok jelenlétében mindegyik esetben a kondenzációs folyamat sebessége felgyorsul, a mellékreakcióké viszont lelassul. Megjegyzendő, hogy több olyan kondenzációs folyamat ismeretes makrociklusos vegyületek előállítására (N, O donorokkal), melyek klasszikus módszerrel (az amin és a karbonil-vegyület oldatainak többszörös forralása) és a gyorsabb templát reakcióval is előállítható (általában már szobahőmérsékleten való 1 – 2 napos állás során).

KÍSÉRLETI RÉSZ

Tanulmányaink során megvizsgáltunk egy sor alifás- és aromás α -ketoxim és néhány β -diketon: acetyl-aceton, benzoyl-aceton kondenzációs reakcióit diaminokkal, átmeneti fémionok: Ni, Pd, Pt, Co jelenlétében. E kondenzációs reakciók során tetradentát Schiff-bázisok kelátjai keletkeznek. Ha fémioként Co(II)-t alkalmazunk, akkor levegő atmoszférával oktaéderes Co(III)-hexadentát komplexeket nyerünk.

A képződési reakciók a következők:



Néhány templát reakcióval nyert komplexvegyület kémiai jellemzése a **2. táblázat**ban látható.

Tetradentát Schiff-bázisokkal képzett kelátok

2. táblázat

Képlet	Mól-tömeg	Hozam (%)	Mikroszkópos jellemzés	Analízis (%)		
				Fém	Számított	Talált
[NiL ¹]	280,7	60	narancs prizmák	Ni	20,9	21,1
[NiL ²]	405	70	narancs lapok	Ni	14,5	14,2
[NiL ³]	282	55	sötétvörös prizmák	Ni	20,7	21
[PdL ¹]	328,7	70	sárga szabálytalan prizmák	Pd	32,4	32,0
[PdL ²]	453	70	sárga apró hasábok	Pd	23,5	23,9
[PdL ³]	330,9	60	sárga prizmák	Pd	32,2	31,7
[PtL ¹]	417,2	60	barna mikrokristályok	Pt	46,8	47,2
[PtL ²]	541,5	80	barna mikrokristályok	Pt	36,1	35,6
[PdL ³]	419,5	70	barna rövid prizmák	Pt	46,5	46,2

Képlet	Mól-tömeg	Hozam (%)	Mikroszkópos jellemzés	Analízis (%)		
				Fém	Szá-mított	Talált
[CoL ¹ (am ¹) ₂]I	594,1	25	barna tük	Co	9,9	9,7
[CoL ¹ (am ²) ₂]I	566	40	csillogó barna romboédere prizmák	Co	10,4	10,6
[CoL ¹ (am ³) ₂]I	594,1	40	vékony hexagonális lemezek	Co	9,9	10,2
[CoL ² (am ¹) ₂]I	718,3	75	csillogó vékony barna priz mák	Co	8,2	8,0
[CoL ² (am ¹) ₂]I	690,3	80	csillogó vörös-barna hasábok	Co	8,5	8,1
[CoL ² (am ³) ₂]I	718,3	85	hosszú barna lemezek	Co	8,2	8,5

H₂L¹ = etilén-diimino-bisz-acetil-aceton (NNOO)

H₂L² = etilén-diimino-bisz-benzoil-aceton (NNOO)

H₂L³ = etilén-diimino-bisz-diacetil-monoxim (NNNN)

am¹ = anilin, am² = piridin, am³ = γ-pikolin (4-Me-Py)

Az általunk előállított új vegyületek Fourier transzformációs közepes és távoli IR-spektroszkópiai adatait a **3. táblázatban** tüntettük fel.

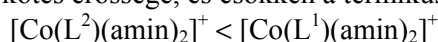
FTIR Spektroszkópiai adatok

3. táblázat

Vegyület	H ₂ L ¹	H ₂ L ²	H ₂ L ³	NiL ¹	PdL ²	NiL ³	CoL ¹ m ² ₂	CoL ² m ² ₂
ν _{C-H}	2970 k 2870 k	2960 k 2880 k	2950 k 2870 k	2960 k 2860 k	2955 k 2860 k	2970 k 2860 k	2920 k 2970 k 2870 k	2970 k 2920 k 2860 k
ν _{C-C}	2960 k 2860 k	1620 ie	–	–	1620 k	–	1595 ie	1605 ie
ν _{C=N}	1550 ie	1555 ie	1550 e	1520 e	1535 ie	1530 e	1512 ie	1525 ie
δ _{CH₃ as}	1453 e	1455 e	1460 e	1450 e	1460 k	1460 e	1470 e	1480 e
δ _{CH₂ s}	1370 k	1355 ie	1360 e	1370 k	1375 k	1360 k	1352 k	1360 k
ν _{N-O}	–	–	1280 e	–	–	1260 e 1190 k	–	–
ν _{C-O}	1143 e	1180 gy 1160 gy	1140 e	1113 e	1120 e	1125 e	1125 e	1135 k
δ _{C-C}	–	770 ie	–	–	760 e	–	755 k	755 ie
γ _{C-H}	–	715 ie	–	–	710 e	–	705 ie	705 ie
γ _{C-C} síkban	650 k	650 k	640 k	660 k	650 k	650 k	650 e	660 k
ν _{M-N}	–	–	–	500 e	495 k	500 k 510 e	560 k	540 k
ν _{M-O}	–	–	–	470 k	460 k	480 k	480 k	475 k
γ _{C-C} síkon kívül	440 k	450 k	445 k	450 k	450 k	455 k	460 k	445 k

ie = igen erős; e = erős; k = közepes; gy = gyenge

Koordinációs kémiai szempontból legfontosabbak az azometin-csoport ν_{C=N} rezgései, valamint a ν_{C-O} vegyértékrezgések. A szabad vegyes Schiff-bázisok e rezgései a komplexképződés során alacsonyabb hullámszámok felé tolódnak el. Ez a jelenség azt mutatja, hogy a fém–N és fém–O-kötések kovalens jellegűek. Az eltolódás a fenil-csoportot tartalmazó származékoknál kisebb, a fenil gyök elektronvonzó hatása miatt. Ezért utóbbiaknál gyengébb a kovalens kötés erőssége, és csökken a termikus stabilitás is.



Megjegyezzük, hogy a templát-reakciók vizsgálata egyre nagyobb biológiai, biokémiai jelentőségre tesz szert az állat- és növényi szervezetekben előforduló mikroelemek szerepének felderítésében (enzimek, biokémiai redox-folyamatok). Az utóbbi 10 évben a legfontosabb kémiai, biokémiai folyóiratok ilyen irányú tanulmányokkal vannak tele.

A termoanalitikai, NMR, tömegspektrometriai eredmények egy következő dolgozatban jelennek meg.

IRODALOM

- [1] Hubin T. J., Busch D. H., Template routes to interlocked molecular structures, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, 200 – 202, 5 – 25
- [2] Busch D. H., Fabrizzi L., *Transition Metal Ions in Supramolecular Chemistry*, Kluve, Dordrecht. Ed., 1994, 55 – 79
- [3] Gokel G. W., *Advances in Supramolecular Chemistry*, vol. 5, J. A. I. Press, Stanford, CT, USA, 1999, 20 – 50
- [4] Nakamoto K., *Infrared and Ramann Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, J.Wiley & Sons, Inc., Ed. New York, 1997, 60 – 90

Élelmiszerminták mérésére alkalmas aszorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben

Developing of Ascorbic Acid Biosensor in FIA (flow injection analysis) System Suitable for the Analysis of Food Samples

VÍG Attila¹, IGLÓI Attila¹, ADÁNYI Nóra², BÓKA Beáta¹, CSUTORÁS Csaba¹, KISS Attila¹

¹EGERFOOD Regionális Tudásközpont, Eszterházy Károly Főiskola

3300 Eger Leányka u. 6., tel.: +3636520400, fax:+3636520438, vigattila@ektf.hu, www.ektf.hu/ret

²Analitikai Osztály, Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet

1022 Budapest Herman Ottó út 15. tel.: +3613558244 fax: +3613558928 n.adanyi@cfri.hu, www.keki.hu

ABSTRACT

The aim of our present work was to improve the flow-through biosensor system previously developed. Ascorbate oxidase enzyme was immobilized on a natural protein membrane (pig's small intestine) in a thin layer enzyme cell. The enzyme cell was connected to a flow injection analysis (FIA) system with an amperometric detector. During the optimization of biosensor several parameters were examined and for measuring analyte concentrations subtraction of the signal given in the presence of enzyme from the signal given in the absence of enzyme was applied.

1. BEVEZETÉS

Aszorbinsav meghatározására számos módszer található a szakirodalomban, a klasszikus analitikai eljárások közül elsősorban a titrimetriás meghatározást alkalmazzák, amely pontos, viszont időigényessége miatt sorozat elemzésekben nem használható [1]. A műszeres módszerek között a HPLC-s meghatározás terjedt el, amely rendkívül költséges módszer [2]. Az utóbbi években kezdték el fejleszteni a bioszenzorokat különböző szubsztrátok elemzésére (pl. glükóz szenzorok), melyek olcsóságukkal, nagy pontosságukkal, specifitásukkal tűnnek ki. A bioszenzorok az analitikai módszerek új generációját jelentik, ahol a mérőfelületen valamilyen biológiailag aktív anyag van rögzítve (pl. enzim, sejtorganellum, antitest, stb.). A kapott biokémiai jel detektálása is többféle módon történhet a reakcióktól és az igényektől függően (potenciometria, amperometria, konduktometria, optikai módszerek).

Az eddigi kutatások során többfajta elektrokémiai eljárást dolgoztak ki C-vitamin (aszorbinsav) vizsgálatára, azonban a kifejlesztett rendszereknek jelentős hiányosságai voltak minden esetben (specifitás, érzékenység, költségesség, stb.).

C-vitamin tartalmú gyógyászati készítmények elemzésére próbálták meg alkalmazni a kalixarénnel módosított szénpaszta elektródot ciklikus voltametriával [3]. Ez direkt elektrokatalitikus módszernek tekinthető, Pb(II) ionok alkalmazásával sikerült az aszorbinsav leválási potenciálját 5-600mV-ról 200mV-ra csökkenteni, azonban így sem sikerült reális minták esetében megfelelő specifitást elérniük.

Szintén direkt amperometriás meghatározást választottak angol kutatók gyümölcsök minőségének, érettségének vizsgálatára [4]. A fent említett zavaró anyagok kiküszöbölésére méretkizárásos membránt alkalmaztak a választott +350mV potenciálon.

Aszorbát oxidáz enzim rögzítésével török kutatóknak nagyfokú szubsztrátspecifitást sikerült elérniük gyümölcslevek és C-vitamin tabletták elemzésénél [5]. Az enzimet zselatin gélben rögzítették glutaraldehid alkalmazásával oxigén elektród felületén. A mérés során az enzimreakcióban elfogyasztott oxigén mennyiségét mérték, aminek során azonban számos zavaró hatással kell számolni (hőmérsékletfüggés, reális mintákban az oldott oxigén zavaró hatása, nagymértékű háttérzaj, rossz érzékenység).

Brazil kutatók potenciometriás detektálással dolgoztak ki enzimátikus módszert aszorbinsav mérésére [6]. Szintén aszorbinsav oxidázt használtak, amelyet etilén-vinilacetát kopolimer membrán felszínéhez kötöttek. A mérést grafit elektróddal végezték, de a már említett hibákat nem sikerült kiküszöbölniük.

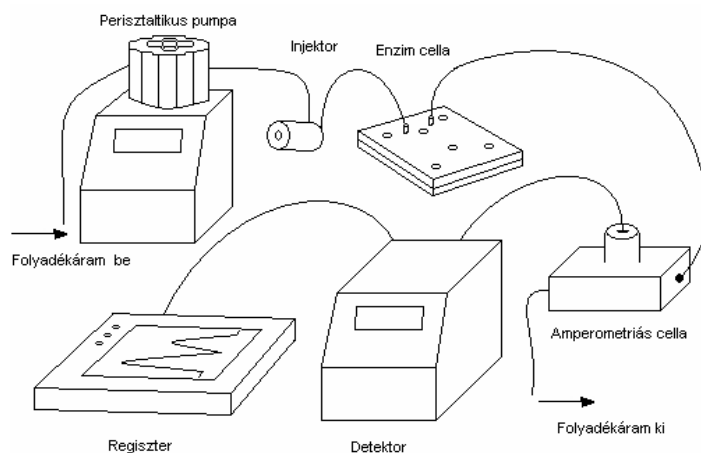
Az eddigi leghatékonyabb módszer készítői SIRE (Sensors based on Injection of the Recognition Element) típusú szenzort alkalmaztak [7]. Ebben az esetben is átfolyó rendszerben végzik a méréseket, az enzimet a mérendő oldathoz keverik, és együtt injektálják. A mérés során az aszkorbinsav enzim nélkül illetve enzimmel együtt mért amperometriás jelének különbségéből következtettek az aszkorbinsav mennyiségére. A módszer nagyon pontos, specifikus módszer, a háttér zavaró hatása sem jelentkezik. Hátrányának mondható a drágasága, mivel viszonylag sok enzim szükséges egy méréshez és a felhasznált enzim nem használható újra. A nem átfolyó cellás módszerek hátránya az átfolyó rendszerű (FIA Flow Injection Analysis) bioszenzorokkal szemben, hogy sorozat elemzésekre nem használhatók, azaz az automatizálhatóságuk korlátozott [8].

Az általunk fejlesztett aszkorbinsav bioszenzort elsősorban élelmiszerminták vizsgálatára kívánjuk alkalmazni, minthogy számos élelmiszerhez adnak L-aszkorbinsavat természetes antioxidánsként. A FIA rendszerű [9,10] bioszenzor alkalmazása során az enzimreakció hatására bekövetkező aszkorbinsav jel csökkenés mérésére került sor a teljes aszkorbinsav jellel szemben. Kísérleteinkben a következő paramétereket vizsgáltuk: aszkorbinsav jel potenciál függése, bioszenzor jel koncentráció függése, bioszenzor pH függése, ionerősség és vezető só hatása a mért jelre, Cu^{2+} ionok hatása a szenzor működésére, optimális áramlási sebesség.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A kísérleti műszer összeállítás

A folyadékáramlást Gilson Minipuls3 perisztaltikus pumpa biztosítja. A minták injektálást Rheodyne 7725i injektorral végezzük 50 μl minta bemerő hurokkal. A jelek detektálását ESA Coulochem III elektrokémiai detektorral, ESA 5040 amperometriás mérőcellával és szénüveg elektróddal végezzük. Az adatok regisztrálása Radelkis OH-105 polarográffal történik. (1. ábra.) Az enzimcella két plexilemezből és közötté elhelyezkedő teflonlappból áll. Az enzimet glutáraldehiddel természetes fehérje membránra (sertés vékonybél) rögzítjük. Méréseinkhez enzim nélküli, vak cellát is használunk, ami teljesen megegyezik az enzimcellával, a különbség, hogy a sertésbélhez nem rögzítünk enzimet.



1. ábra

A készülék sematikus rajza

2.2. Vegyszerek

Aszkorbát oxidáz (EC 1.10.3.3) (Sigma, Calbiochem), HPO_3 (alt., Merck), L-aszkorbinsav, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , (alt., Spektrum -3D).

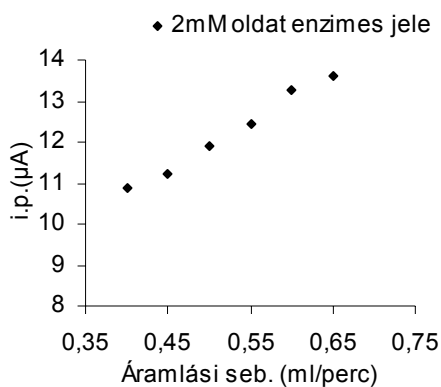
2.3. Aszkorbinsav oldat stabilizálása és oldat készítés

A metafoszforsavból 20 g/dm^3 koncentrációjú törzsoldatot készítettünk Milli-Q, HPLC vízzel (hűtőben tárolva kb. 1 hónapig stabil). A törzsoldatból az irodalmi leírásoknál 5-ször hígabb: 4 g/dm^3 hígítást készítettünk, ezzel az oldattal készültek a megfelelő koncentrációjú KH_2PO_4 és Na_2HPO_4 oldatok, s a puffer elegyek. Az így készült, megfelelő kémhatású pufferből készítettük a 10mM koncentrációjú aszkorbinsav törzsoldatot, ami stabilnak mutatkozott legalább 19 óráig hűtőben tárolva.

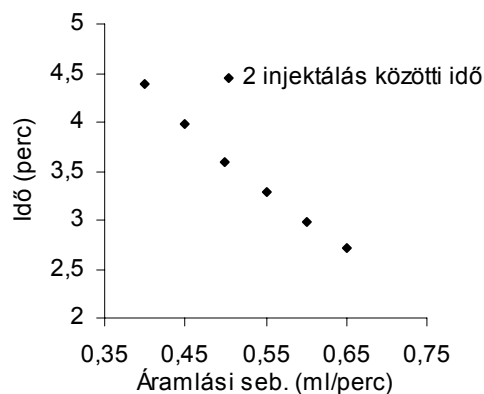
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

Az előkísérletek során vizsgáltuk az enzim reakció kinetikáját, valamint az optimális áramlási sebességet.

Az enzim reakció sebességének tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a megfelelően detektálható átalakuláshoz lassabb áramlási sebesség szükséges. Figyelembe véve, hogy a hosszabb tartózkodási idő az enzimreakciónak, ellenben a nagyobb áramlási sebesség az elektród regenerációjának kedvez, 0,55ml/perc áramlási sebességet találtuk a legalkalmasabbnak (itt a regenerálódási idő 3,3 perc). Továbbá ezen a sebességen már nem volt megfigyelhető a csúcsok torzulása sem (2. és 3. ábra).

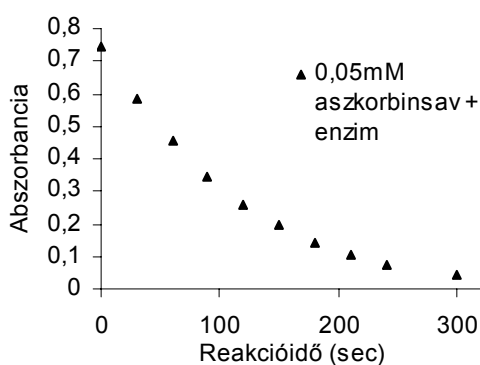


2. ábra
Jel áramlási sebesség függése

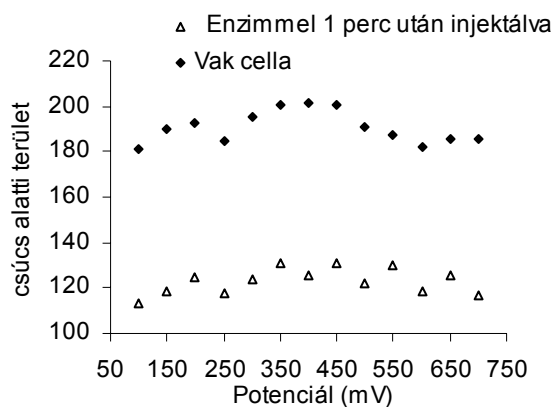


3. ábra
Regenerálódási idő az áramlás függvényében

Az amperometriás detektálás alkalmazásakor lehetőség van az O_2 fogyás mérésére negatív potenciálon, illetve az aszkorbinsav fogyás mérésére pozitív potenciálon, mivel a keletkező dehidroaszkorbinsav és víz nem ad amperometriás jelet. Vizsgálataink során mi az utóbbi mérését választottuk, mivel így szélesebb koncentráció tartományban működik a szenzor, valamint a szenzor érzékenysége is megfelelő. Az aszkorbinsav amperometriás jelét egymás után mértük referencia cellával majd enzim cellával, és a két jel különbsége volt arányos a minta aszkorbinsav tartalmával.

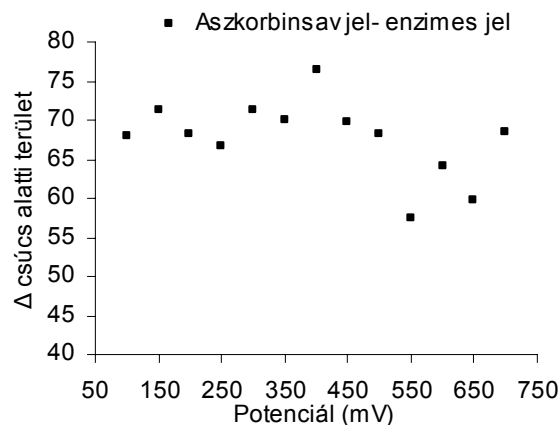


4. ábra
Szubsztrát bomlása 20 U aktivitású enzimmel



5. ábra

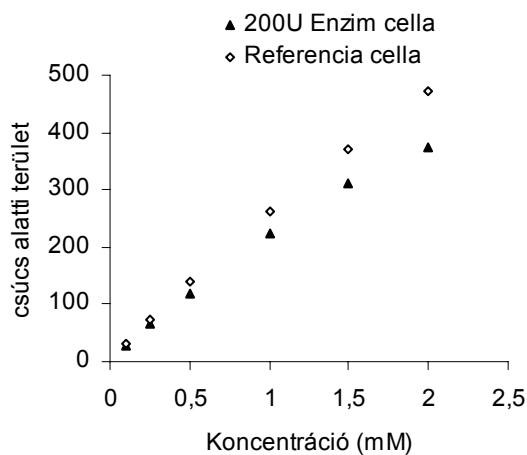
Aszkorbinsav mérése a potenciál függvényében
(1mM stand., 66mM puff., pH=6,7)



6. ábra

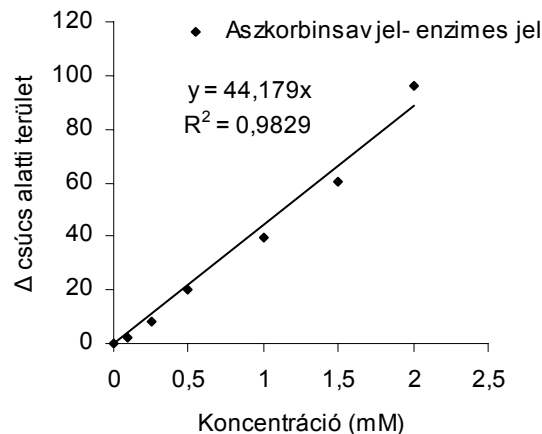
Jelkülönbségek a különböző potenciálokon

A megfelelő polarizációs potenciál meghatározásához adott koncentrációjú aszkorbinsav jel potenciál-függését illetve ugyanezen koncentrációnál meghatározott idő után enzimmel injektált jelek változásait vizsgáltuk. Ezek összehasonlítása alapján a 400mV potenciál tűnt a legmegfelelőbbnek a vizsgálatok szempontjából, mivel 350-450mV potenciál szakaszon mutat maximális értéket a jel, továbbá a görbe meredeksége itt egyfajta platóba megy át (5. és 6. ábra).



7. ábra

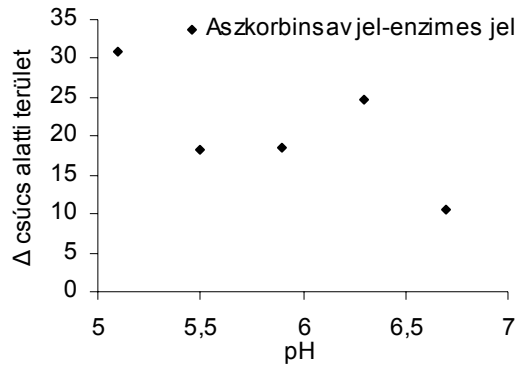
Koncentrációfüggés, 400 mV, pH=6,7



8. ábra

Kalibráció az enzim cellával

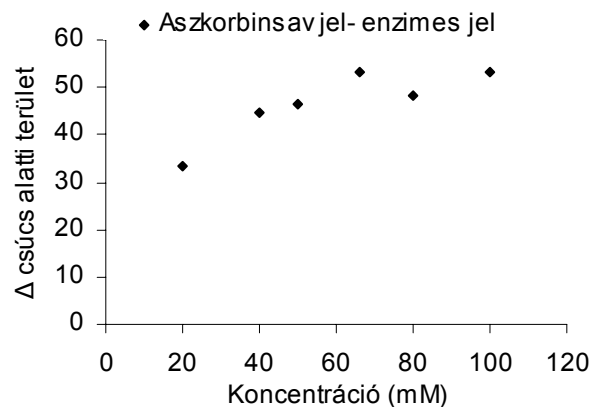
Az aszkorbinsav injektálásakor mért referencia jelek nem teljesen arányosak az eredeti koncentrációval (0,1-2 mM-ig vizsgálva), illetve a későbbiekben, a mintákban lévő elektrokémiailag aktív zavaró anyagok is adhatnak jelet (pl.: élelmiszer minta mátrixa), melyeket nem lehet elkülöníteni az aszkorbinsav jeltől. Azonban az enzimes cellával mért jel csökkenése csak az enzimreakcióhoz köthető így következtethetünk az aszkorbinsav jelenlétére, illetve mennyiségére a megfelelő kalibrációs egyenes segítségével. (7. és 8. ábra).



9. ábra

Aszkorbinsav mérése a foszfát puffer pH függvényében (66mM puffer, 400mV)

Az enzim működésének pH optimum 5,5 és 7,0 között van az irodalmi adatok alapján. Ez az optimum azonban az enzim immobilizálása során megváltozhat, ezért sor került a reakció pH függés meghatározására. A kapott eredmény alapján inkább a savas tartomány felé tolódott az enzim működésének optimuma, pH=5,5 alá. Tekintettel arra, hogy nemcsak a referencia jel nőtt az alacsonyabb pH-n, hanem a két jel különbsége is, ezért feltételezhető, hogy az enzim működése is aktívabb a pH 5,5 alatt. Ennek pontos meghatározására azonban még további vizsgálatok szükségesek (9. ábra).

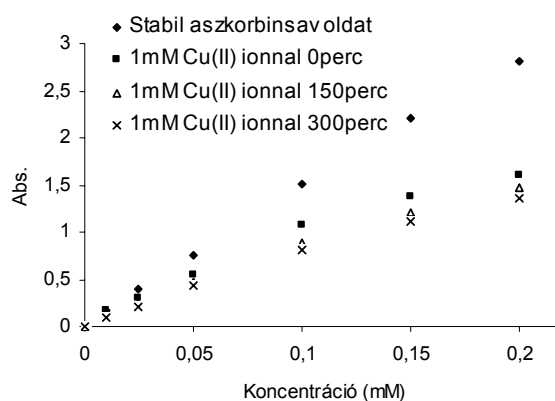


10. ábra

Aszkorbinsav mérése a puffer koncentrációjának függvényében, 400mV, pH=6,7

Az elektrokémiai vizsgálatok során fontos tényező a vezető só koncentrációja illetve az ionerősség is, mely nagyban befolyásolja a kapott jelek nagyságát, stabilitását. Jelen esetben a foszfát puffer koncentrációjának változtatásával vizsgáltuk a hatásokat (20mM-100mM konc.). (10. ábra).

Az aszkorbát oxidáz enzim egy 8 réz atomot tartalmazó oxido-reduktáz, ahol a Cu(II)→Cu(I) redoxireakció játszódik le. A Cu(II) ionokat tartalmazó oldat elvben segítheti az enzim gyorsabb regenerálódását és így a gyorsabb, hatékonyabb reakciót. Azonban ezen ion jelenléte a HPO₃-val stabilizált aszkorbinsav oldatban gyorsítja az aszkorbinsav bomlását is (11. ábra). A Cu(II) ion hatásának vizsgálatát az enzim reakcióra még a továbbiakban vizsgálni kívánjuk.



11. ábra
Aszkorbinsav oldat stabilitás, fotométerrel 265nm

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk vizsgált FIA rendszerben alkalmazott bioszenzor esetén az enzimek hatására bekövetkező aszkorbinsav jel csökkenés mérésére került sor a teljes aszkorbinsav jellel (referencia cella) szemben pozitív potenciálon. Mivel ebben az esetben a jel csökkenés csak az aszkorbinsav fogyáshoz köthető, ezért zavaró hatások mellett is lehetővé válik az aszkorbinsav mennyiségi meghatározása. Az általunk fejlesztett aszkorbinsav bioszenzor elsősorban élelmiszerminták vizsgálatára lesz alkalmazható, minthogy számos élelmiszerhez adnak L-aszkorbinsavat természetes antioxidánsként. A következő időszakban számos valós élelmiszermintán is optimalizáljuk a fejlesztett szenzort.

A méréseink alapján az aszkorbát oxidáz enzim cella legalkalmasabb paramétereinek a 400mV-polarizáló feszültséget, 0,55 ml/perc áramlási sebességet, 66mM foszfát ionerősség felett és pH=5,5 alatt történő mérést találtuk.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a Pázmány Péter Program keretében működő Egerfood Regionális Tudásközpont támogatását.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- [1.] 45.1.14 AOAC Official Method 967.21 Ascorbic Acid in Vitamin Preparations and Juices 2,6-Dichloroindophenol Titrimetric Method (First Action 1967, Final Action 1968)
- [2.] European Standard: Foodstuffs-Determination of vitamin C by HPLC Ref. No.: EN14130:2003 E
- [3.] V.S. Ijeri, M. Algarra, A. Martins: Electrocatalytic determination of Vitamin C using Calixarene modified Carbon Paste electrode, *Electroanalysis* **2004**, 16, 24.
- [4.] S. Jawaheer, S. F. White, S. D. D. V. Rughooputh, D.C. Cullen: Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality, *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, 1429-1437.
- [5.] E. Akyilmaz, E. Dincaya: New enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of L-ascorbic acid, *Talanta*, **1999**, 50, 87-93.
- [6.] J.C. B. Fernandes, L.T. Kubota, G. de Oliveira Neto: Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 385, 3-12.
- [7.] K. Kriz, M. Anderlund, D. Kriz: Real time detection of L-ascorbic acid and hydrogen peroxide in Crude food samples employing a reversed sequential differential measuring technique of the SIRE-technology based biosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, **2001**, 16, 363-369.
- [8.] G.A. Messina, A.A.J. Torriero, I.E. De Vito, J. Raba: Continuous flow/stopped flow system for determination of ascorbic acid using an enzymatic rotating bioreactor, *Talanta*, **2004**, 64, 1009-1017.
- [9.] N. Adányi, M. Tóth Markos, E.E. Szabó, M. Váradi, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, L. Campanella: Investigation of organic phase biosensor for measuring glucose in flow injection analysis system, *Analytica Chimica Acta*, **501** **2004** 219-225
- [10.] E.E. Szabó, N. Adányi, M. Váradi: Application of biosensor for monitoring galactose content, *Biosensors & Bioelectronics*, **1996** Vol. 11, No. 10, pp. 1051-1058

