

Első lépésként a munkaterv szerint új eljárást dolgoztunk ki különböző pórusszerkezetű szilikagélek reprodukálható előállítására, 9-25 nm pórusméret tartományban, nagyon jó reprodukálhatósággal. Ezután a szilikagéleket C18 és C30 alkil láncokkal borítottuk és a tölteteket felhasználtuk különböző, kritikus folyadékromatográfiás elválasztások céljaira. A munkatervben említett tokoferol izomerek elválasztását sikerült nagy szelektivitással megoldani.

A kísérletek új, elméleti jelentőségű eredményhez is vezettek. Az alkalmazott kromatográfiás pórusszerkezet meghatározási eljárással mérve a szilikagélek és a kémiaailag modifikált töltetek pórustérfogatát, a mért térfogatkülönbségből egy ún. Térfogati Borítottságot számoltunk. Bizonyítottuk, hogy a kromatográfiás tulajdonságok és a térfogati borítottságok között sokkal szorosabb az összefüggés, mint a kromatográfiás tulajdonságok és az általánosan használt tömeg szerinti borítottság között.

A nagy borítottságú szilikagél alapú töltetek kutatásának területén új, eddig nem alkalmazott vizsgálati eljárást vezettünk be. Igazoltuk, hogy porózus szilikagélek kromatográfiásan legfontosabb porozitás jellemzőit (átlagos pórusméret, pórus térfogat, fajlagos felület) közeli infravörös spektrofotometriával (NIR) pontosan és gyorsan mérni lehet, függetlenül a szilikagél eredetétől és szemcseméretétől. Az eljárás jelentős, mert az eddig alkalmazott eljárások (nitrogén adszorpció, higany penetrációs porozimetria, kizárásos kromatográfia) ugyan igen pontos és jól reprodukálható eljárások, de idő és vegyszer igényesek, míg az általunk kidolgozott eljárás gyors, gyakorlatilag nincs anyagigény. (A méréshez szükséges kb. 0,1 g minta a mérés után ismét felhasználható.)

A töltet kitűnően alkalmazható bioaktív vegyületek elválasztására. Növényi mintákból anionok elválasztását oldottuk meg nagy hatásossággal. Részletes elemzéseket végeztünk csalánteák nitrát tartalmának vizsgálatára. Egyszerű minta-előkészítés (hidrogénperoxidos oxidálás), elégséges volt a zöld növényi részekből a nitráttartalom megbízható mérésére (validált eljárást dolgoztunk ki). Igazoltuk, hogy a talaj nitrogéntartalma és a zöld növényi részek nitráttartalma között közvetlen összefüggés van. Eljárásunk alkalmazható más zöld növényi részekből is a nitráttartalom meghatározására.

Alkalmaztuk az új C30-as töltetet fullerének elválasztására is. Meglepően jó elválasztásokat értünk el, a szelektivitás messze felülmúlja a kereskedelmi, fullerének elválasztására ajánlott, töltetek szelektivitását.

A kifejlesztett C30 fázis új utakat nyitott a bor polifenolok analízisében. Az ezzel kapcsolatos kísérletek jelenleg is folynak intézetünkben.

Első lépésként sikerült borokban (fehér és vörösborokban egyaránt), minta-előkészítés nélkül, a két jelentősebb, szőlőben előforduló, polifenolt a rezveratrolt és glükozidját (piceid) elválasztani. (E vegyületek az cardio-vasculáris rendszerre különösen jó hatással vannak, ez az ún. francia paradoxon). Bizonyították az óta a rezveratrol citoprotektív és gyulladáscsökkentő hatását is.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük a vörösborok további potenciálisan cardioprotectiv hatású polifenoljainak meghatározására is (galluszsav, tirozol, kaftársav, katechin, procianidin, kávéssav, epikatechin, kumarinsav, rutin, kvercetin, ferulsav), valamint, a borok antocián tartalmának gyors meghatározására is (delfinidin, petunidin, peonidin, malvidin). Ez utóbbi vegyületek cardioprotectiv hatása alacsonyabb a rezveratrol által elérhető hatáznál, viszont a borban nagyságrenddel nagyobb mennyiségben található, így hatásuk mégis jelentős.

Megállapítottuk, hogy a transz rezveratrol UV fény hatására nem csak az eddig ismert izomerizációt mutatja (cisz rezveratrol keletkezik), hanem új vegyületek is keletkeznek a besugárzás során. Kísérletesen, a C30 állófázisok hatékony elválasztási tulajdonságát kihasználva, elsőként bizonyítottuk, hogy a transz rezveratrol oxidációs terméke közeli UV fény hatására az eddig ismert cisz-rezveratrol mellett egy, a szénláncban hármassal kötött, polifenol (3,4',5-trihidroxi-difenilacetilén) és egy, gyűrűzáródással a cisz rezveratrolból keletkező fenantrén származék. Mindkét (dehidrogénezett) termék móltömege megegyezik. Szerkezetigazolásuk HPLC-MS-MS úton történt. Bemutattuk azt is, hogy ha az oldat enyhén redukáló hatású (pl. C-vitamint tartalmaz, mint a gyümölcsben), akkor ezek az átalakulások nem mennek végbe. Nagyszámú borminta analízisével kimutattuk, hogy a vörösborok polifenoltartalma - erősebben függ a borkészítés technológiájától (a borásztól!), mint földrajzi, vagy időjárási körülményektől.

2005 év folyamán munkacsoportunk, a tanszék másik munkacsoportjával (Sümegei Balázs professzor úr munkacsoportja) pályázatot nyert, melynek eredményeként - munkacsoportomat kiegészítve - egy proteomikai laboratóriumot építettünk ki. E laboratóriumi háttér tette lehetővé a fullerének és származékai vizsgálatát MALDI-TOF ill. MALDI-TOF/TOF eljárással.

A fullerének vizsgálatában első lépéseként a natív fullerének esetleges toxikusságát kívántuk felderíteni. Tekintve, hogy ezek az anyagok vízoldhatatlanok, így toxicitásukra vonatkozó ismereteink sincsenek. (Az irodalom vízoldékony fullerén származékok toxikológiáját természetesen tárgyalja.) Felfedezésünk, miszerint a natív fullerének növényi olajokban jól oldódnak, lehetővé tette a fullerének toxikológiai vizsgálatát, mely nagy hatással lesz minden további fullerén kutatásra. Sikerült a C<sub>60</sub> és C<sub>70</sub> fulleréneket növényi olajokban, jelentős mennyiségben, oldanunk (0,1-1%). Különösen jó az oldhatóság olíva olajban. Az így nyert olajos oldatok olajos injekciók formájában kísérleti állatoknak adhatók és megindulhatott a fullerének toxicitás vizsgálata a gyakorlathoz közeli körülmények között! Mivel eddig még senkinek nem sikerült biokompatibilis oldószerben fulleréneket oldani, így azok toxicitásának vizsgálatára sem kerülhetett sor. Az oldódás exoterm, azaz a hőmérséklet emelésével az oldhatóság csökken. Az oldat koncentrációja elegendő volt egereken történő vizsgálatokhoz. Megállapítottuk, hogy 1. A fullerének az érfalakban nem csapódnak ki (az egyik legnagyobb veszély erősen hidrofób anyagok esetén); 2. az agyba nem jutnak el; 3. többhetes adagolás után sem megfigyeléssel, sem a levágott állatok szöveteinek mikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatával kóros elváltozás nem állapítható meg (zsírszövetek nagyobbodása volt megfigyelhető, ez azonban az oldószer (olíva olaj) hatása). Ennek igazolására a kísérleteket kevesebb olajjal megismételtük, a kísérleti állatok zsírszöveteinek növekedése valóban az oldószerként alkalmazott olaj következménye.

Fullerén kutatásaink területén két jelentős felfedezést tettünk.

Egyrészt igazoltuk, hogy a fullerének mátrixanyag alkalmazása nélkül közvetlenül lézer deszorpciós eljárással ionizálhatók és repülési idő tömegspektrométerben (MALDI-TOF) analizálhatók. Ez egyben felvetette azt a lehetőséget is, hogy a fullerének, mint mátrix anyagok felhasználhatóak lehetnek MALDI-TOF

tömegspektrometriában. Ennek igazolására mechanokémiai eljárással (analitikai malomban) szérumalbuminból és C60 fullerénből adduktokat képeztünk, melyek MALDI-TOF tömegspektrométerben analizálhatóaknak bizonyultak.

Másrészt fullerének, mint kromatográfiás állófázisok vizsgálatában kimutattuk, hogy szilikagél alapú, fullerén C60 borított szorbensek kiválóan alkalmazhatók hidrofil biomolekulák (foszfopeptidok, glikált peptidok, flavonoidok) koncentrálására, sómentesítésére, frakcionálására. Vizsgáltuk ezen újszerű szorbensek terhelhetőségét, alkalmasságát fehérjeszerkezet meghatározására. Vizsgálatainkhoz kis mólsúlyú peptidokat, humán szérum albumint és fibrinogént, valamint ezek glikált származékait használtuk. A makromolekulákból tripszines bontással készült peptid keveréket fullerén oszlopon frakcionáltuk. A frakciók MALDI-TOF-TOF tömegspektrometriás analízise minden eddiginél nagyobb szerkezet lefedettséget adott. Megállapítottuk, hogy a szokásos fordított fázisú szorbensekhez viszonyítva, hidrofil biomolekulák prekoncentrálására a fullerén borított szorbensek sokkal hatásosabban alkalmazhatóak. Fullerének, mint a MALDI-TOF tömegspektrometriában alkalmazható mátrixvegyületek vizsgálatánál bizonyítottuk azt is, hogy a MALDI TOF eljárással csak nehezen analizálható szteroidhormonok (ösztrogének, androgének) ionizálására a fullerének kitűnően felhasználhatók.