

OPRACOWANIE WARUNKÓW SYNTEZY POCHODNYCH WYBRANYCH AMINOKWASÓW DO ICH ANALIZY W ŻYWNOŚCI

Izabela Lisicka¹, Zuzanna Gralak¹, Kamil Brzuzy¹, Anna Kmieciak², Aneta Jastrzębska¹

¹Katedra Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

e-mail: 302298@stud.umk.pl

Słowa kluczowe: wolne aminokwasy, synteza, CNBF, HPLC, żywność

STRESZCZENIE

Wolne aminokwasy pełnią istotną rolę w żywności współtworząc smak i zapach, biorąc udział w szeregu reakcji zachodzących w organizmie ludzkim czy wspomagając gospodarkę hormonalną. Znaczny stopień przetworstwa żywności wpływa na zawartość tych związków w produktach jadalnych. Powoduje to, że poszukiwanie nowych metod ich oznaczania w matrycach żywnościowych jest wciąż pożądane. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z procedurą syntezy pochodnych aminokwasów jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych metod oznaczania dyskutowanych związków. W pracy zaproponowano warunki syntezy i oczyszczania pochodnych wybranych aminokwasów (histrydyna, arginina, tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina, ornityna, lizyna) z 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifuorkiem. Otrzymane pochodne scharakteryzowano za pomocą ¹H, ¹³C, ¹⁹F NMR oraz wybranych parametrów fizykochemicznych. Opracowane procedury zastosowano do analizy zawartości badanych aminokwasów w wybranych próbach żywnościowych.

1. Wstęp

W przyrodzie występuje 300 aminokwasów, z których jedynie 23 są uważane za proteinogenne [1]. Aminokwasy te mają konfigurację aldehydu L – glicerynowego, więc pomimo właściwości lewo bądź prawo skrętnych zaliczane są do L – α – aminokwasów [2]. Ze względu na możliwość syntezy poszczególnych aminokwasów w organizmie człowieka,

aminokwasy białkowe można podzielić na endogenne, czyli takie, które organizm może syntezować samodzielnie, oraz egzogenne. Są to fenyloalanina, izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, treonina, tryptofan, walina i histydyna, które muszą być dostarczane z pożywieniem. Aminokwasy są również prekursorami biocząsteczek takich jak kwasy nukleinowe, hormony, hem czy neuroprzekaźniki. Ponadto, odgrywają wiele istotnych ról w różnych procesach biologicznych, między innymi wytwarzanie energii, wchłanianie składników odżywczych, wzrost tkanek i funkcjonowanie układu odpornościowego [3]

W naszych organizmach oraz spożywanej przez nas żywności oprócz aminokwasów budujących białka istnieje pula wolnych aminokwasów (FAA), nie związanych z białkami, które mogą być syntetyzowane z prostych produktów pośrednich takich jak pirogronian, ketoglutaran i 3-fosfoglicerynian. Związki te znajdują się w żywych komórkach w ilościach zależnych od tkanek i ogólnej puli aminokwasów. Wolne aminokwasy dostarczane z pożywienia pełnią kluczową rolę w aspekcie prozdrowotnym. Ich obecność w żywności odpowiada za wiele właściwości, w tym między innymi za współtworzenie smaku i zapachu. Ich wchłanianie do krwioobiegu jest bardzo szybkie i mogą odgrywać znaczącą rolę w funkcji neuroprzekaźnikowej. Aminokwasy te biorą także udział w wielu szeregach reakcji, wśród których można wyróżnić: reakcje kataboliczne, otrzymywanie związków, których produkty podegradacyjne nie są w stanie wrócić do szeregu aminokwasów wolnych (np. aminy biogenne) czy otrzymywanie związków, które mogą w późniejszym czasie powrócić do postaci wolnych aminokwasów (np. peptydy i białka) [4]. Ze względu na powiązanie ze szlakiem metabolicznym, aminokwasy (związane i wolne), odpowiadają za procesy normujące gospodarkę hormonalną organizmu. Wyróżnić tu można, np.: histydyne (His), której niedobór powoduje utrzymujące się poczucie zmęczenia [5], tryptofan (Trp) wspomagający zdrowy sen czy kwas glutaminowy (Glu) wpływający na lepszą pamięć [6]

Analiza zawartości wolnych aminokwasów w żywności jest istotna z wielu powodów. Jednym z nich jest fakt, że proces przetwarzania żywności wpływa na zawartość tych związków. Krajowe prawo żywnościowe wymaga znakowania i deklarowania zawartości substancji alergizujących, makroskładników czy energii. Dokładny skład produktu, w tym zawartość aminokwasów zarówno wolnych jak i związanych, pozostaje jednak nieznany.

Do tej pory zaproponowano i opisano wiele procedur oznaczania aminokwasów w różnych matrycach żywnościowych, środowiskowych, biofluidach czy farmaceutykach. Metodą o historycznym znaczeniu, chociaż wciąż powszechnie stosowaną, jest chromatografia jonowa opisana już w 1948 roku przez Moore i Steina [7]. Obecnie zauważa

się duże zainteresowanie wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej czy gazowej w połączeniu z różnymi sposobami detekcji [8-11], czy metod elektromigracyjnych [12-13]. Nowoczesne metody instrumentalne stosowane do analizy aminokwasów pozwalają na znaczne skrócenie czasu, wysoką czułość, satysfakcjonujące parametry statystyczne i niższe koszty eksploatacji.

Oznaczanie wolnych aminokwasów w złożonych matrycach żywnościowych jest trudnym procesem z wielu powodów – ich zawartości w śladowych ilościach, problemów z odpowiednim przygotowaniem prób do analizy (współstrącanie białek) i w końcu fakt, że związki te są polarne (trudności w zastosowaniu chromatografii faz odwróconych) i pozbawione grup chromoforowych (konieczność przeprowadzania aminokwasów w pochodne). Obecnie dostępna jest szeroka gama odczynników do syntezy pochodnych aminokwasów, a stosowany odczynnik musi być wybierany z uwzględnieniem jego zalet i ograniczeń. Do szeroko stosowanych zalicza się aldehyd ortoftalowy, izotiocyjanian fluoresceiny, N,N-dietylo-2,4-dinitro-5-fluoroanilina, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen, 1-fluoro-2,4-dinitrofenylo-5-L-ftalaninoamid, 6-aminochinolilo-Nydroksysukcynoimidylkarbaminian, czy chlorek dansylu [14].

Jednym z odczynników stosowanym do konwersji aminokwasów i amin biogennych jest 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifuorek (CNBF), który łatwo reaguje z pierwszorzędowymi, jak i drugorzędowymi aminami. Synteza pochodnych przebiega w umiarkowanej temperaturze, a powstałe pochodne są stabilne i charakteryzują się wysoką absorpcją w ultrafiolecie i fluorescencji [15-17].

Celem pracy było zaproponowanie procedury syntezy i oczyszczania pochodnych wybranych aminokwasów (histydyna, arginina, tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina, ornityna, lizyna) z CNBF w celu otrzymania czystych i spektralnie scharakteryzowanych produktów. Zaproponowano sposób ogrzewania reagentów podczas reakcji konwersji w temperaturze 80°C z wykorzystaniem łaźni olejowej. Testowano wartość pH (pH = 9 i 10) oraz stosunek molowy aminokwasów i CNBF. Opracowane procedury zastosowano do analizy zawartości badanych aminokwasów w próbach żywnościowych za pomocą HPLC.

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki i aparatura

4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifuorek (CNBF), 98%, acetonitryl (for HPLC), metanol (do HPLC), dimetylosulfotlenek 99,8%, aminokwasy, czystości cz.d.a.: kwas glutaminowy, glutamina, tryptofan, tyrozyna, lizyna, histydyna, fenyloalanina, arginina, ornityna

zakupiono w Sigma-Aldrich, Polska. Pozostałe odczynniki, czystości cz.d.a.: kwas borowy (99,5%), kwas solny (35-38%), dichlorometan (99%), węglan sodu, wodorowęglan sodu, kwas octowy (99,5%), octan sodu, tetrahydrofuran (99,8%) zakupiono w Alchem, Polska.

Analizy chromatograficzne wykonano za pomocą chromatografu cieczowego UHPLC, SHIMADZU, LC-20AD, wyposażonego w autosampler SIL- 20AC HT i detektor SPD-M20A. Analizy prowadzono na kolumnie Gemini 5 μm NX-C18 110A, (250 x 4,6 mm). Do charakterystyki spektralnej otrzymanych pochodnych wykorzystano spektrometr magnetycznego rezonansu jądrowego Bruker Avance III 400 MHz oraz Bruker Avance 300 MHz, polarymetr Bellingham ADP430 oraz aparat do badania temperatury topnienia Mel-Temp.

2.2. Synteza i oczyszczanie pochodnych - ogólna procedura

W kolbie okrągłodennej umieszczono 5 mg aminokwasu i dodano 2 cm^3 buforu boranowego (pH=9). Następnie dodano odpowiednią ilość roztworu 0,2 M CNBF w acetonitrylu tak, aby zachować stosunek molowy: 1 mmol/dm^3 aminokwasu i 1,1 mmol/dm^3 CNBF. Kolbę zaopatrzone w chłodnicę zwrotną i ogrzewano na łaźni olejowej ciągle mieszając aż do uzyskania temperatury 60°C. Proces ogrzewania prowadzono jeszcze przez 30 minut. Następnie dodano 0,01 cm^3 roztworu HCl (2 mol/dm^3). Otrzymane próby odparowano na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Otrzymane mieszaniny poreakcyjne oczyszczano z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym (*silica gel* 230-400 mesh). Jako eluent zastosowano mieszaninę dichlorometanu i metanolu w stosunku objętościowym 9:1.

Związki po oczyszczeniu scharakteryzowano za pomocą metod spektralnych, wybranych parametrów fizykochemicznych (temperatury topnienia, skręcalności właściwej), oraz oznaczono za pomocą HPLC.

2.3. Synteza pochodnych - dobór wybranych parametrów

W pracy testowano wartość pH reakcji poprzez dodawanie odpowiedniej ilości buforu boranowego (pH = 9), węglanowego (pH = 10), oraz stosunek molowy aminokwasów i CNBF: 1:1,1 mmol/dm^3 ; 1:2,2 mmol/dm^3 oraz 1:4,4 mmol/dm^3 . Syntezę prowadzono jak powyżej zmieniając ilość roztworu CNBF oraz stosowany bufor.

2.4. Próba i przygotowanie prób

Przeprowadzono analizę zawartości wybranych aminokwasów w próbach napoi alkoholowych (próby piw dostępne na rynku konsumenckim) oraz soków z kiszonych warzyw (sok z kiszonej marchwi, selera, kapusty i ogórków) zakupionych w lokalnym markecie ze zdrową żywnością. Napoje alkoholowe odgazowano za pomocą wytrząsarki

oraz przefiltrowano. Próby soków z kiszonych warzyw odwirowano (15 min, 9000 rpm) i przefiltrowano. Do syntezy pobierano 5 cm³ próby i prowadzono ją zgodnie z opisem w punkcie 2.2. Następnie odparowano rozpuszczalnik a suchą pozostałość przeniesiono do kolb miarowych o poj. 10 cm³ za pomocą metanolu do HPLC. Otrzymane roztwory przelano do vialek i analizowano za pomocą HPLC. Uzyskane wyniki przeliczono na zawartość aminokwasów.

Zaproponowano również ekstrakcję otrzymanych pochodnych po etapie syntezy za pomocą octanu etylu. Warstwę organiczną zebrano w kolbie stożkowej i pozostawiono nad środkiem suszącym na dobę. Następnie środek suszący odsączono, a rozpuszczalnik odparowano do sucha korzystając z wyparki próżniowej. Kolejne etapy wyglądały analogicznie jak poprzednio.

2.5 ¹H, ¹³C, ¹⁹F NMR

W celu doboru warunków syntezy pochodnych aminokwasów suchą pozostałość, po odparowaniu rozpuszczalników, rozpuszczono w 0,5 cm³ deuterowanego dimetylosulfotlenku (DMSO-d₆), przeniesiono do rurek NMR i zarejestrowano widma ¹H NMR. Z otrzymanych widm czystych aminokwasów oraz otrzymanych produktów, wyznaczono konwersję aminokwasu do odpowiedniej pochodnej.

W celu pełnej charakterystyki spektralnej otrzymanych pochodnych, produkty po procesie oczyszczania odparowano a suchą pozostałość rozpuszczono w deuterowanym dimetylosulfotlenku.

2.6. RP-HPLC

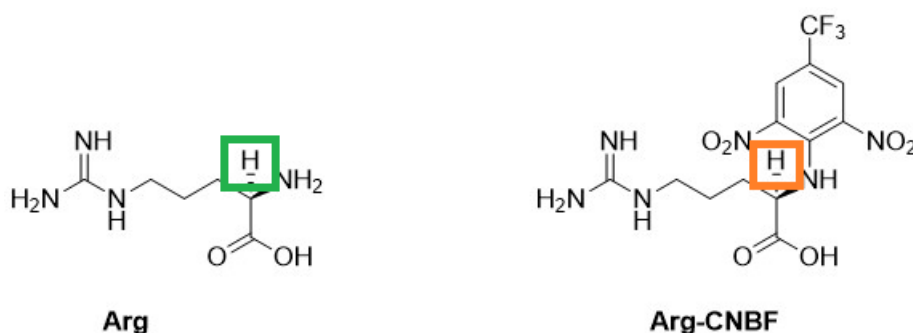
Analizy chromatograficzne wykonano z wykorzystaniem elucji gradientowej z użyciem faz: (A): acetonitryl; (B): 50 mM bufor octanowy/acetonitryl/trietyloamina [82,8:17:2], stosowany gradient: 0-15 min faza A - 20%; 15-35 min faza A - 48%; 35-38 min faza A 49%; 38-43 min faza A 75%; 43-50 min faza A - 75%; 50-60 min faza A - 20%. Zastosowano przepływ fazy ruchomej - 0,32 cm³/min, temperatura 35°C, długość fali λ = 275 nm [Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.].

Roztwory wzorcowe pochodnych (o stężeniu 0,5 mmol/dm³) otrzymano przez odważenie odpowiedniej ilości związku i rozpuszczenie w 10 cm³ metanolu do HPLC. Roztwory wzorcowe do krzywych kalibracyjnych (zakres stężeń 0,05-0,25 mmol/dm³) otrzymano poprzez rozcieńczenie roztworów wzorcowych w metanolu do HPLC, w kolbach miarowych o poj. 10 cm³.

3. Wyniki i Dyskusja

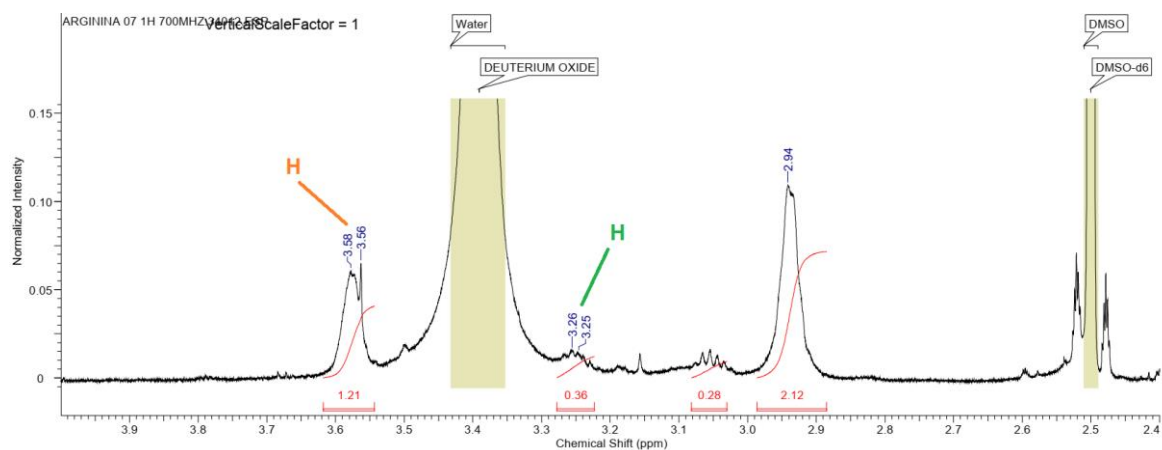
3.1. Dobór warunków syntezy

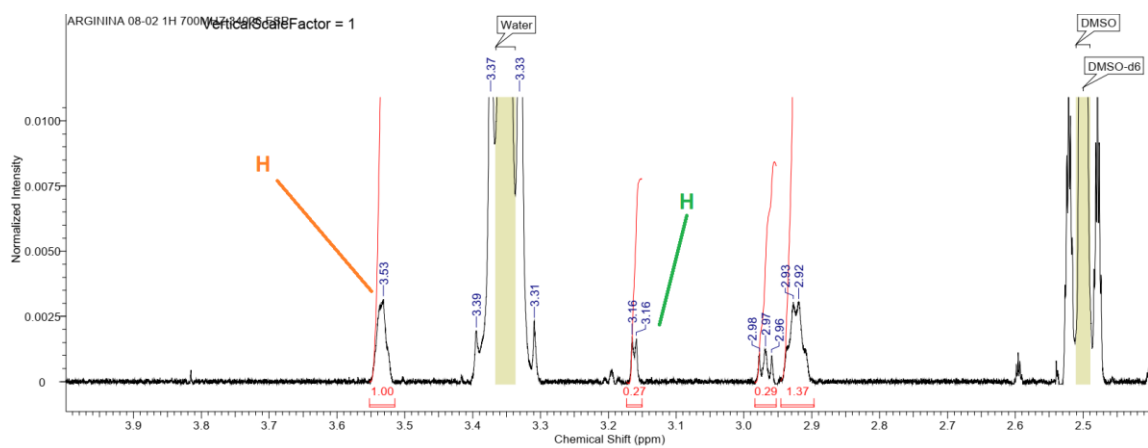
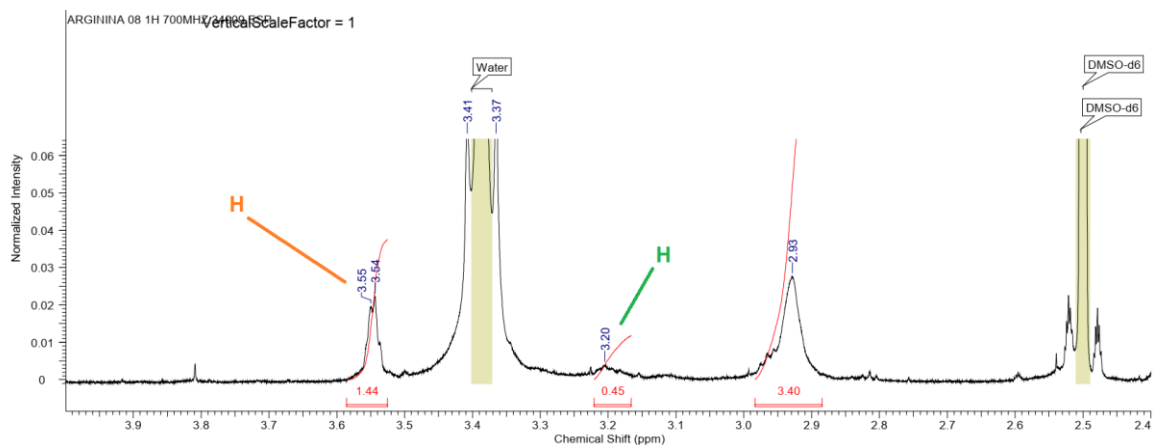
W celu doboru optymalnych warunków syntezy wyznaczono procent przereagowania aminokwasu w odpowiednią pochodną (konwersję). Wzięto pod uwagę integrację sygnałów na widmie ^1H NMR (aminokwasu i pochodnej) pochodzących od atomu wodoru znajdującego się przy węglu α połączonego z grupą aminową w aminokwasie. Poniżej przedstawiono sposób wyznaczenie konwersji aminokwasu w pochodną na przykładzie arginy



Rys. 1. Wzory Arginy oraz pochodnej arginy z CNBF z zaznaczonym wodorem α

Na załączonych, przykładowych fragmentach widm pochodnych arginy z CNBF zaznaczono piki pochodzące od atomu wodoru (CNH) w argynie (3,2 ppm) oraz w pochodnej z CNBF (3,5 ppm).





Rys.2. Widmo ^1H NMR pochodnej arginy; widna od góry: arginina-CNBF: 1 mmol do 4 mmol, bufor boranowy; arginina-CNBF: 1 mmol do 4 mmol, bufor węglanowy; arginina-CNBF, 1 mmol do 1 mmol; bufor boranowy.

$$Konw. = \frac{intPOCH}{intPOCH + intARG} \cdot 100\%$$

gdzie:

intPOCH- integracja dla pochodnej Arg-CNBF,

intARG- integracja dla arginy

Uzyskane wyniki dla badanych aminokwasów przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 1. Procent przereagowania aminokwasu w pochodną obliczony na podstawie widm ^1H NMR

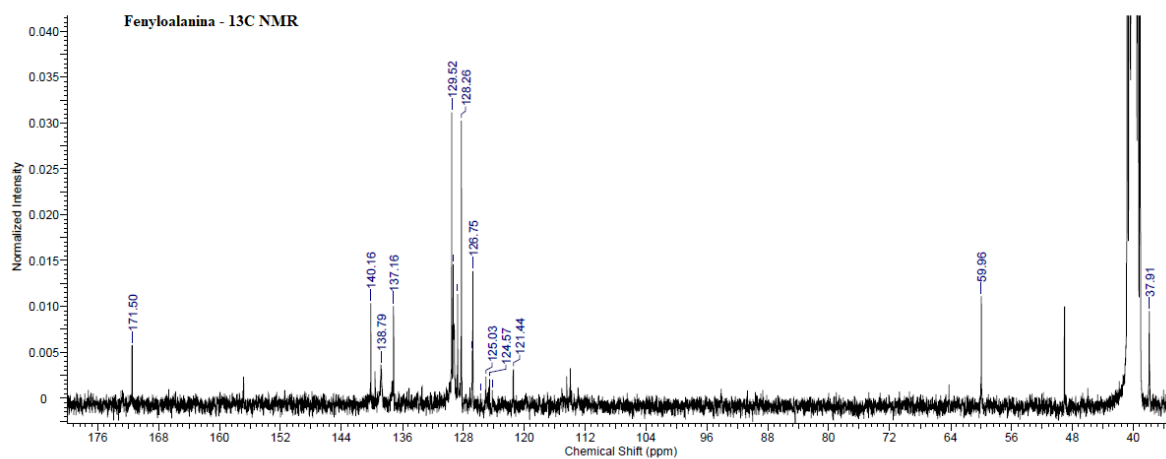
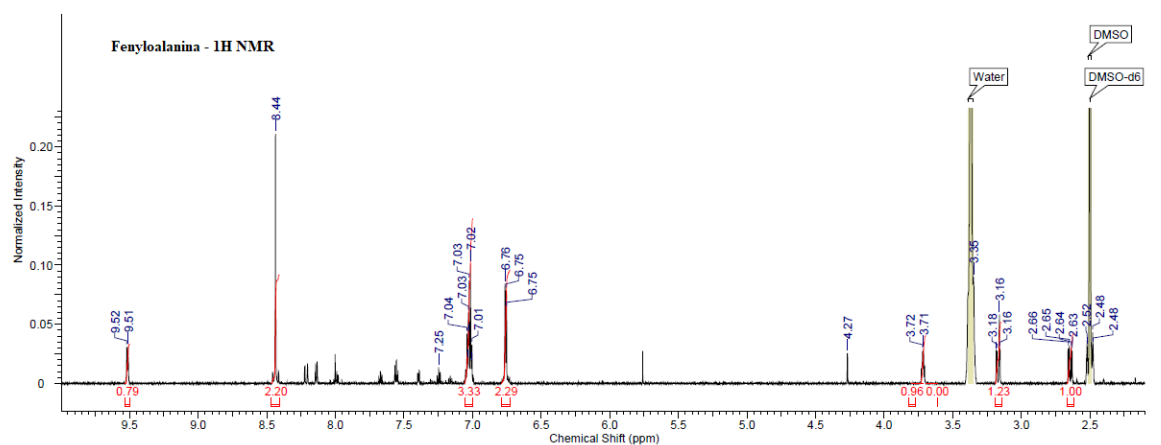
Nazwa aminokwasu	pH	Stosunek CNBF do aminokwasu	% pozostałego aminokwasu	% otrzymanej pochodnej
Arginina	9	1:4,4	23	77
Arginina	10	1:4,4	24	76
Arginina	9	1:2,2	28	72
Arginina	10	1:2,2	Widmo nieczytelne	
Arginina	10	1:1,1	21	79
Arginina	9	1:1,1	64	36
Fenylalanina	9	1:4,4	0	100
Fenylalanina	10	1:4,4	0	100
Fenylalanina	9	1:2,2	0	100
Fenylalanina	10	1:2,2	0	100
Fenylalanina	9	1:1,1	0	100
Fenylalanina	10	1:1,1	0	100
Glutamina	9	1:4,4	15	85
Glutamina	10	1:4,4	Widmo nieczytelne	
Glutamina	9	1:2,2	10	90
Glutamina	10	1:2,2	Widmo nieczytelne	
Glutamina	9	1:1,1	7	93
Glutamina	10	1:1,1	61	39
Ornityna	9	1:4,4	Widmo nieczytelne	
Ornityna	10	1:4,4	20	80
ornityna	9	1:2,2	10	90
ornityna	10	1:2,2	20	80
Ornityna	9	1:1,1	0	100
Ornityna	10	1:1,1	Widmo nieczytelne	
Ornityna	9	1:2,2	0	100
Tryptofan	9	1:4,4	0	100
Tryptofan	10	1:4,4	0	100
Tryptofan	9	1:1,1	0	100
Tryptofan	10	1:1,1	0	100
Tyrozyna	9	1:2,2	0	100

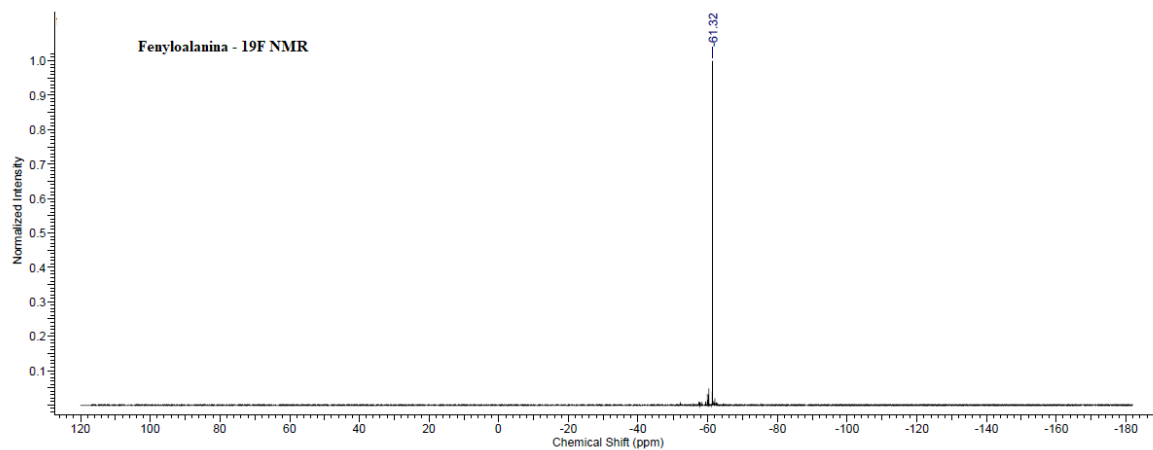
Histydyna	9	1:2,2	0	100
-----------	---	-------	---	------------

Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano, że w pH = 9 (bufor boranowy) uzyskano zdecydowanie wyższe wartości konwersji badanych aminokwasów w pochodne w stosunku do pH = 10. Z kolei biorąc pod uwagę stosunek molowy CNBF do aminokwasu nie zauważono, aby większy nadmiar odczynnika w procesie syntezy wpływał na procent przereagowania aminokwasu w oczekiwany produkt. Do dalszych badań zastosowano dlatego następujące warunki; pH = 9 oraz stosunek molowy aminokwas/CNBF - 1:1,1 mmol/dm³.

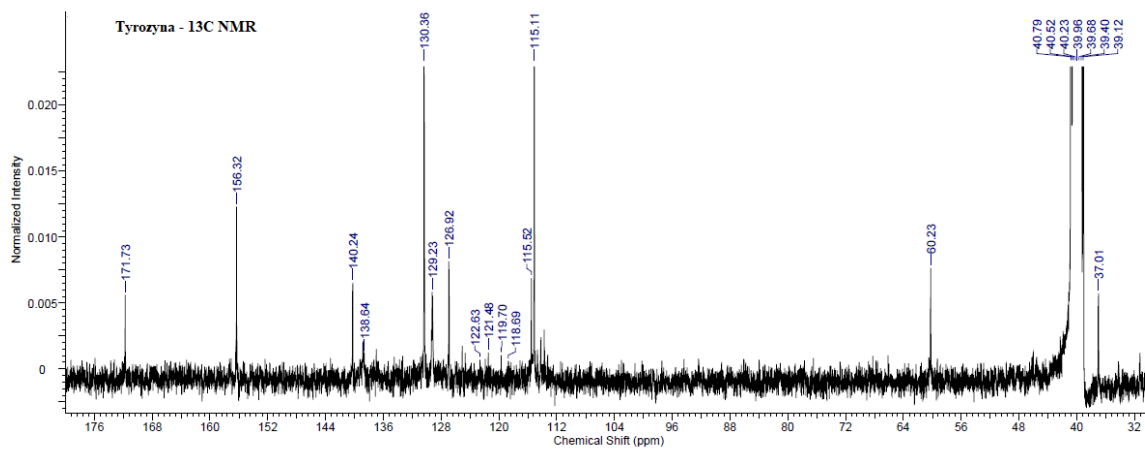
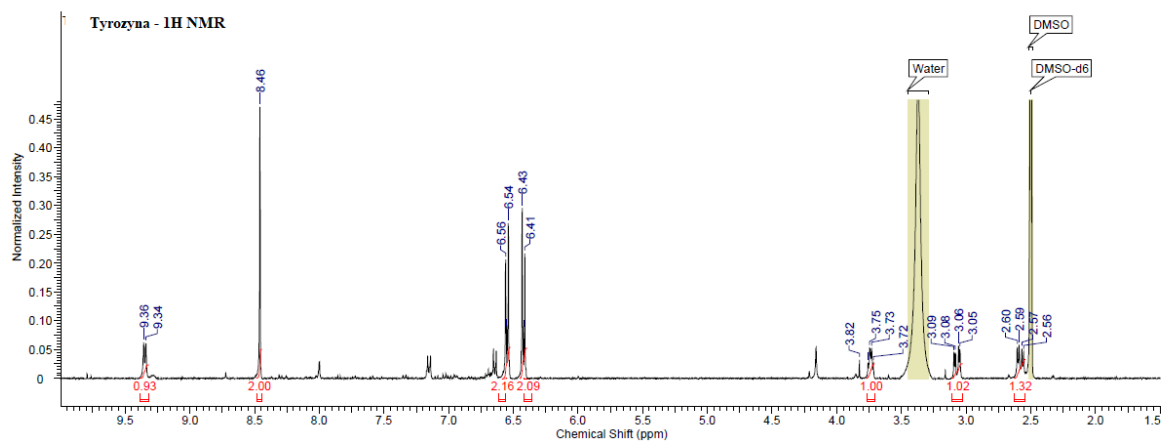
3.2. Charakterystyka otrzymanych pochodnych

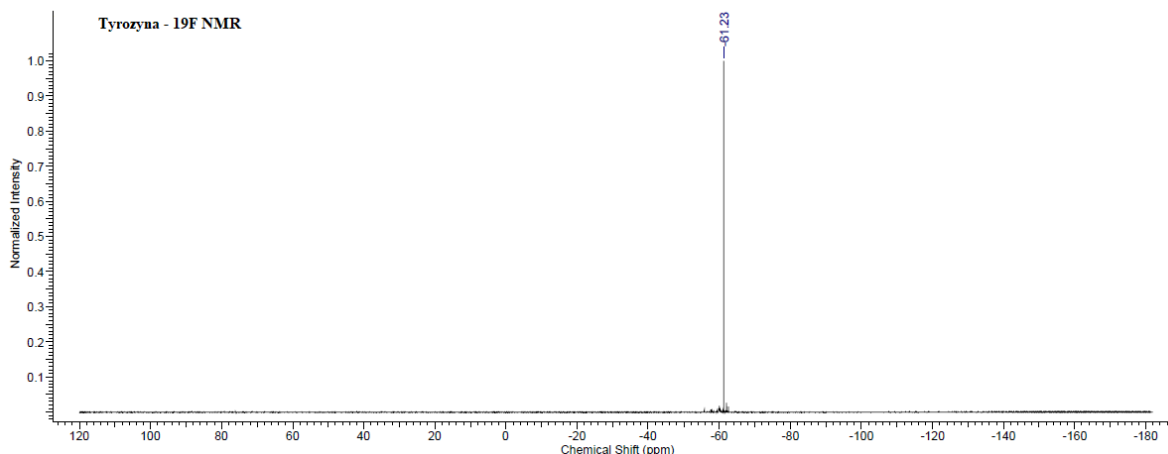
W celu scharakteryzowania otrzymanych pochodnych wykonano analizę widm ¹H, ¹³C, ¹⁹F NMR. Przykładowe widma przedstawiono poniżej, a opis widm NMR otrzymanych pochodnych zebrano w *Tabela 2*.





Rys. 3. Widma ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR otrzymane dla pochodnej fenylalaniny z CNBF





Rys. 4. Widma ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR otrzymane dla pochodnej tyrozyny z CNBF

Tabela 2. Widma ^1H , ^{19}F oraz ^{13}C otrzymanych pochodnych aminokwasów z CNBF

Pochodna	
Tyrozyna- CNBF	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) ppm 2.58 (dd, $J=14.09$, 5.58 Hz, 1 H), 3.07 (dd, $J=14.38$, 4.11 Hz, 1 H), 3.71 - 3.77 (m, 1 H), 6.39 - 6.45 (m, 2 H), 6.52 - 6.57 (m, 2 H), 8.46 (s, 2 H), 9.35 (d, $J=6.75$ Hz, 1 H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) ppm 37.01, 60.23, 115.11 (2 C), 115.52, 120.66, 126.92, 129.23 (2 C), 130.36 (2 C), 138.64, 140.24 (2 C), 156.32, 171.73 (1 C, COOH) ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) ppm -61.23
Fenylalanina - CNBF	^1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6) ppm 2.64 (dd, $J=14.27$, 5.74 Hz, 1 H), 3.14 - 3.19 (m, 1 H), 3.72 (d, $J=4.54$ Hz, 1 H), 6.73 - 6.79 (m, 2 H), 7.00 - 7.06 (m, 3 H), 8.44 (s, 2 H), 9.52 (d, $J=6.54$ Hz, 1 H) ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) ppm 37.91, 59.96, 121.44, 124.96, 126.75, 126.84, 128.26 (2 C), 128.75, 129.32, 129.52 (2 C), 137.16, 138.79, 140.16, 171.50 (1 C, COOH) ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) ppm -61.32
Ornityna- CNBF	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) ppm 1.44-1.56 (m, 2H), 1.58-1.79 (m, 2H), 2.84-2.96 (m, 2H), 3.80-3.84 (m, 1H), 8.44 (s, 2H), 8.53 (s, 2H) ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) ppm -61.41, -61.38
Lizyna- CNBF	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) ppm 1.02-1.10 (m, 2H), 1.36-1.51 (m, 2H),

	1.60-1.69 (m, 2H), 2.74-2.82 (m, 2H), 3.52-3.55 (m, 1H), 8.48 (s, 2H), 8.49 (s, 2H), 9.94 (bs, 1H, NH) ¹⁹ F NMR (376 MHz, DMSO-d ₆) ppm -61.40, -61.37
Histydyna- CNBF	¹ H NMR (700 MHz, DMSO-d ₆) ppm 2.65 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 6.55 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 8.46 (s, 2H), 9.48 (bs, 1H, NH) ¹⁹ F NMR (376 MHz, DMSO-d ₆) ppm -61.31
Arginina - CNBF	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) ppm 1.28-1.33 (m, 2H), 2.84-2.95 (m, 4H), 3.53-3.56 (m, 1H), 7.76 (bs, 2H, NH ₂), 8.53 (s, 2H), 8.66 (bs, 1H, NH), 9.70 (bs, 1H, NH) ¹⁹ F NMR (376 MHz, DMSO-d ₆) ppm -61.23
Tryptofan - CNBF	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) ppm 3.00 - 3.08 (m, 1 H), 3.10 - 3.18 (m, 1 H), 3.82 - 3.92 (m, 1 H), 6.69 (td, J=7.41, 1.03 Hz, 1 H), 6.86 - 6.95 (m, 3 H), 7.13 (d, J=7.92 Hz, 1 H), 8.17 (s, 2 H), 9.43 (d, J=7.34 Hz, 1 H), 10.78 - 10.87 (m, 1 H) ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO-d ₆) ppm 27.86, 60.38, 109.01, 111.09, 112.94 (CF ₃ , q, J=34.6 Hz), 116.90, 118.27, 120.51, 120.92, 123.71, 124.51, 127.44, 128.25, 135.48, 139.99, 171.87 ¹⁹ F NMR (376 MHz, DMSO-d ₆) ppm -61.43 (s, 3 F)
Kwas glutaminowy - CNBF	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) ppm 1.94-1.99 (m, 2H), 2.20-2.30 (m, 2H), 3.89-3.94 (m, 1H), 8.56 (s, 2H), 8.66 (d, 1H, CNH) ¹³ C NMR (176 MHz, DMSO-d ₆) ppm 25.48, 29.32, 56.93, 115.17 (q, J=36.10 Hz), 122.66 (q, J=272.60 Hz), 128.81, 138.68, 139.54, 171.71, 173.38 ¹⁹ F NMR (376 MHz, DMSO-d ₆) ppm -61.44 (s, 3 F)

Interpretując otrzymane widma można stwierdzić, że synteza pochodnych badanych aminokwasów z CNBF w zaproponowanych warunkach zakończyła się sukcesem. Widma ¹⁹F potwierdziły powstanie pochodnych, zaobserwowano sygnał pochodzący od grup CF₃ z CNBF. Ponadto, na widmach ¹H pochodnych aminokwasów są obecne sygnały pochodzące od grup CH w układzie aromatycznym CNBF.

Dla ornityny i lizyny zaobserwowano powstanie pochodnych, w których obie grupy aminowe uległy podstawieniu za pomocą CNBF. Świadczy o tym obecność na widmie ¹H NMR dwóch singletów (przesunięcie chemiczne ok. 8,5 ppm), z których każdy integruje na dwa aromatyczne atomy wodoru.

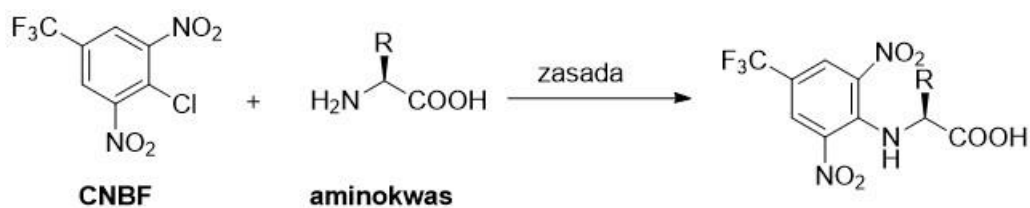
Przeprowadzone badania sugerują, że udało się uzyskać pochodne badanych aminokwasów z CNBF w założonych warunkach syntezy. Nazwy dla otrzymanych pochodnych wraz z wybranymi parametrami fizykochemicznymi przedstawiono w *Tabela 3*.

Tabela 3. Zestawienie stałych fizykochemicznych otrzymanych aminokwasów

Aminokwas	Nazwa pochodnej z CNBF	T.T [°C]	Skręcalność [°]
Tryptofan	2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-tryptofan	193,6 – 196,4	-42,02
Tyrozyna	2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-tyrozyna	175,8 – 178,3	-10,48
Fenylalanina	2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-fenylalanina	92,1 – 94,8	-9,04
Kwas glutaminowy	2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-kwas glutaminowy	-	-14,6
Histydyna	2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-histydyna	218 - 220	-7,84
Arginina	2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-arginina	123,7 - 126	-7,36
Lizyna	N ² ,N ⁶ -bis (2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenylo)-lizyna	107,2 - 109	-9,36
Ornityna	N ² ,N ⁵ -bis(2,6-dinitro-4(trifluorometylo)fenylo)-ornityna	103,2 – 105,4	-7,16

Gdzie - T.T - temperatura topnienia

Schemat reakcji aminokwasów z CNBF przedstawiono na Rys. 5



Rys. 5. Synteza pochodnych aminokwasów z CNBF

3.3. Analiza zawartości badanych wolnych aminokwasów w próbach żywnościowych

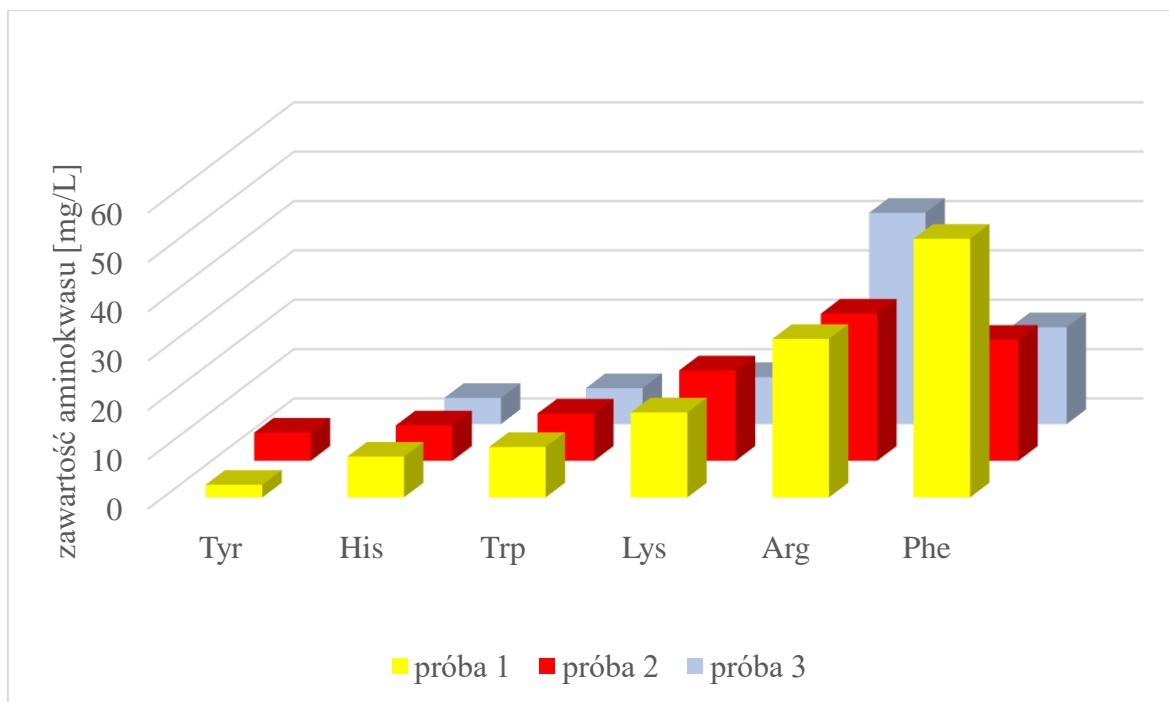
Otrzymane produkty zastosowano jako wzorce do analizy HPLC. W *Tabela 4* zestawiono czasy retencji oraz parametry krzywych wzorcowych.

Tabela 4. Czasy retencji pochodnych aminokwasów z CNBF

Aminokwas	Czas retencji ± [min]	R ²	DL	QL
Histydyna	11,4 ± 0,4	0,9987	0,015	0,050
Arginina	18,0 ± 0,1	0,9993	0,020	0,070
Tyrozyna	25,2 ± 0,2	0,9992	0,017	0,060
Tryptofan	26,2 ± 0,2	0,9996	0,014	0,050
Fenylalanina	28,5 ± 0,2	0,9997	0,015	0,050
Ornityna	38,7 ± 0,1	0,9986	0,018	0,060
Lizyna	40,3 ± 0,2	0,9990	0,015	0,05

Opracowane procedury zastosowano do oznaczania badanych aminokwasów w produktach żywnościowych (piwa oraz soki z kiszonych warzyw). W pracy testowano dwa sposoby przygotowania prób: bez ekstrakcji otrzymanych pochodnych i z etapem ekstrakcji otrzymanych po syntezie pochodnych. Pierwszy sposób okazał się niewystarczający i pozwolił na oznaczenie jedynie niektórych z badanych aminokwasów. Dla badanych napoi alkoholowych udało się oznaczyć tylko fenylalaninę, tyrozinę, argininę (próba nr 1), fenylalaninę, tryptofan, argininę i ornitynę (próba nr 2) oraz fenylalaninę i argininę (próba nr 3). Na otrzymanych chromatogramach obserwowano duży wpływ matrycy co utrudniało ich interpretację. Ponadto, otrzymane wyniki precyzji i dokładności nie były satysfakcjonujące. Ten sam problem zauważono dla prób soków z kiszonych warzyw.

Zastosowanie ekstrakcji otrzymanych pochodnych w badanych próbach zdecydowanie poprawiło wygląd otrzymanych chromatogramów. Uzyskane wyniki przedstawiono na *Rys. 6*.



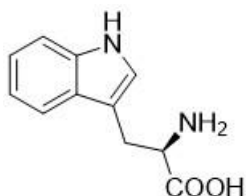
Rys. 6. Zawartość aminokwasów w badanych próbach napojów alkoholowych, gdzie: *Tyr* - tyrozyna; *His* - histydyna; *Trp* - tryptofan; *Lyz* - lizyna; *Arg* - arginina; *Phe* - fenyloalanina

Piwo jest napojem docenianym przez wielu ludzi na całym świecie - głównie ze względu na niepowtarzalny i łagodny smak. Smak tego napoju jest wynikiem skomplikowanych i dynamicznych interakcji w szlakach metabolicznych, które zachodzą zarówno podczas procesu warzenia, jak i podczas przechowywania. Analiza zawartości wolnych aminokwasów jest jednym ze sposobów oceny jakości piwa. Związki te biorą udział w większości szlaków metabolicznych, ponieważ są prekursorami wyższych alkoholi i aldehydów, dwóch klas związków, które są bardzo ważne dla rozwoju nieprzyjemnego posmaku w piwie [18].

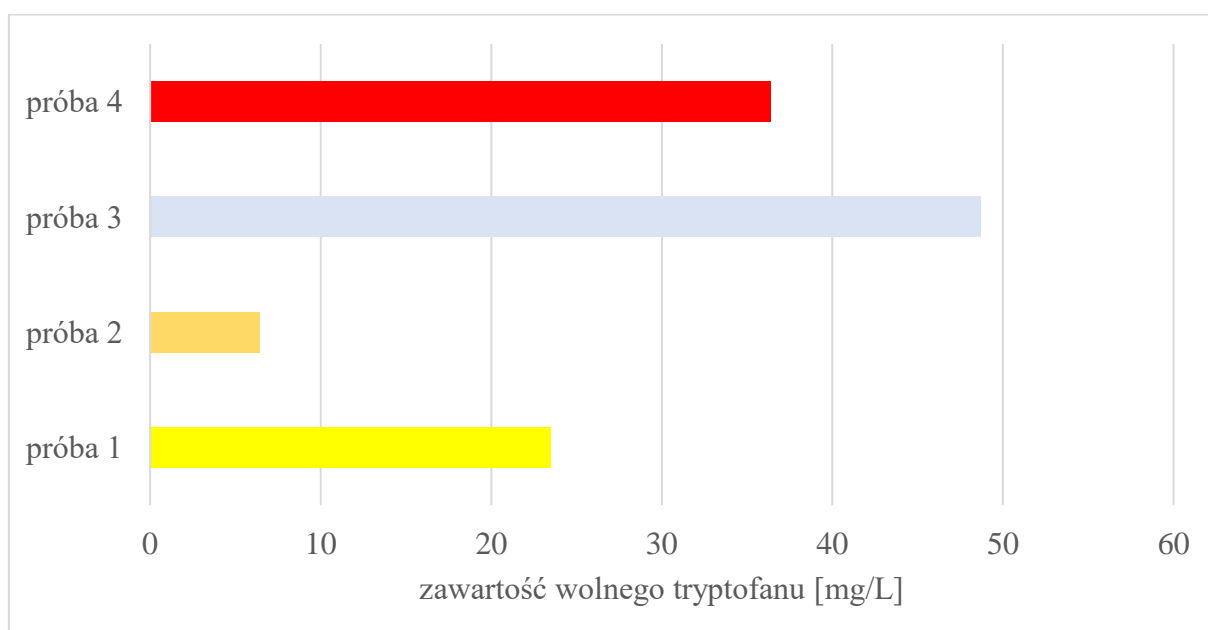
Otrzymane wyniki pokazują, że wśród badanych aminokwasów najwyższe stężenia uzyskano dla fenyloalaniny, argininy oraz lizyny. Są to aminokwasy występujące w znacznych ilościach w brzeczce piwa [18]. To w jaki sposób drożdże za pomocą enzymów mogą wykorzystywać wolne aminokwasy wpływa na ostateczny skład piwa. Oznaczone w pracy aminokwasy o dominującej zawartości, tj. arginina, lizyna i fenyloalanina, należą do grupy związków szybko jak i bardzo szybko absorbowanych podczas etapów wytwarzania piwa. Ich duża zawartość w produkcie gotowym może więc zdecydowanie wpływać na jego smak. Tak np. fenyloalanina nadaje smak słodki, natomiast arginina i lizyna gorzki. W pracy

nie oznaczono ornityny, co jest zgodne z danymi literaturowymi [19]. Precyzja otrzymanych wyników, ilustrowana współczynnikami zmienności była satysfakcjonująca i mieściła się w granicach 2,54%-6,21%.

Wśród wolnych aminokwasów, oznaczonych w sokach z kiszonych warzyw, na szczególną uwagę zasługuje tryptofan (Rys 7). Tego typu produkty zyskują coraz większą popularność wśród współczesnych konsumentów, ze względu na dużą zawartość probiotyków, witamin i innych cennych składników. Wśród nich są również wolne aminokwasy, których obecność determinuje smak i jakość produktu. Z drugiej strony, duża dostępność wolnych aminokwasów i proces fermentacji mlekowej powoduje, że w kiszonych produktach - zarówno soku jak i warzywach, powstają aminy biogenne, które w nadmiernej ilości mogą negatywnie wpływać na nasze zdrowie.



Rys. 7. Wzór tryptofanu



Rys. 8. Zawartość wolnego tryptofanu w badanych sokach z kiszonych warzyw
gdzie: próba 1 - sok z kiszonej marchwi; próba 2 - sok z kiszzonego selera; próba 3 - sok z kiszonych ogórków; próba 4 - sok z kiszzonej kapusty

Otrzymane wyniki sugerują zauważalnie wyższą zawartość wolnego tryptofanu w soku z kiszonych ogórków w porównaniu do soku z kiszzonego selera. Warto podkreślić, że wolny tryptofan w naszej diecie przyczynia się do zwiększonej zawartości serotoniny w naszych organizmach. Tym samym otrzymane wyniki wskazują na prozdrowotny charakter tego typu produktów.

4. Wnioski

Opracowano metodę syntezy wzorców wybranych aminokwasów z CNBF oraz metodę ich oznaczania w produktach żywnościowych, tj. w piwie oraz sokach z kiszonych warzyw. Analiza za pomocą HPLC prób żywnościowych po reakcji z CNBF wykazała duży wpływ maskujący matrycy produktu, co udało się wyeliminować stosując ekstrakcję. Przeprowadzone analizy żywnościowe pozwalają stwierdzić, że CNBF jest użytecznym odczynnikiem do zastosowania w oznaczaniu wolnych aminokwasów.

5. Podziękowania

**Autorzy dziękują Narodowemu Centrum Nauki, za finansowanie badań:
grant numer: 2020/39/B/NZ9/01694.**

6. Literatura

- [1] M. M. Dziągwa-Becker, J.M. Marin Ramos, J.K. Topolski, W. A. Oleszek, Determination of free amino acids in plants by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Anal. Methods*, 7 (2015) 7574-2581
- [2] R. K. Murray, D. K. Granner, V. W. Rodwell, *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008 [str. 17 – 20]
- [3] E.Ö. Er, S. Erarpat, S. Bodur, Ö. T. Günkara, B. Özbek, S.n Bakirdere, Accurate determination of amino acids by quadruple isotope dilution-reverse phase liquid Chromatography-Tandem mass spectrometry after derivatization with 2-Naphthoyl chloride, *J. Chromatogr. A* 1667 (2022) 462870
- [4] B. Gołębiowska, L. Szewczyk, Free Amino Acids Set in Human Organism, *Pediatr. Endocrinol. Vol. 11* (2012) nr 2(39)
- [5] Ł. Gawiński, T.H. Wierzbą, Effect of histidine on hearth rate variability in the rat, *Ann. Acad. Med. Gedan.* 36 (2006) 53-61

- [6] S. Kowalska, E. Szlyk, A. Jastrzębska, Simple extraction procedure for free amino acids determination in selected gluten-free flour samples, *Eur. Food Res. Technol.* 248 (2022) 507–517
- [7] G. Gałęzowska, J. Ratajczyk, L. Wolska, Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: critical review, *Amino Acids* 53 (2021) 993–1009
- [8] H. Vakili, Z. Talebpour, F. Haghghi, Development, validation, and uncertainty measurement of HPLC-DAD method for determination of some free amino acids in infant formula and medical food products for inborn errors of metabolism, *Food Chemistry* 390 (2022) 133204
- [9] L. Zhao, X. Zhao, Y. Xu, X. Liu, J. Zhang, Z. He, Simultaneous determination of 49 amino acids, B vitamins, flavonoids, and phenolic acids in commonly consumed vegetables by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 344 (2021) 128712,
- [10] Jitka Klikarová, Lenka Česlová, Jan Fischer, Rapid analysis of phenyl isothiocyanate derivatives of amino acids present in Czech meads, *J. Chromatogr. A*, 1644 (2021) 462134,
- [11] S. Gao, B. Xu, X. Zheng, X. Wan, X. Zhang, G. Wu, Z. Cong, Developing an analytical method for free amino acids in atmospheric precipitation using gas chromatography coupled with mass spectrometry, *Atmos. Res.* 256 (2021) 105579,
- [12] P. Tůma, Determination of amino acids by capillary and microchip electrophoresis with contactless conductivity detection – Theory, instrumentation and applications, *Talanta*, 224 (2021) 121922
- [13] H. Yen Ta, F. Collin, L. Perquis, V. Poinot, V. Ong-Meang, F. Couderc, Twenty years of amino acid determination using capillary electrophoresis: A review, *Anal. Chim. Acta* 1174 (2021) 338233
- [14] S. Ferre, V. González-Ruiz, D. Guillarme, S. Rudaz, Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1132 (2019) 121819
- [15] T. Shi, T. Tang, K. Qian, F. Wang, J. Li, Y. Cao, High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride, *Anal. Chim. Acta* 654 (2009) 154–161
- [16] M. Guo, T. Shi, Y. Duan, J. Zhu, J. Li, Y. Cao, Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization, *J. Food Compos. Anal.* 42 (2015) 84–90

- [17] W. Li, M. Hou, Y. Cao, H. Song, T. Shi, X.u Gao, D. Wang, Determination of 20 Free Amino Acids in Asparagus Tin by High-Performance Liquid Chromatographic Method after Pre-Column Derivatization, *Food Anal. Methods* 5 (2012) 62–68
- [18] Inês M. Ferreira, Luís F. Guido, Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review, *Fermentation* 4 (2018) 23
- [19] Miaomiao Tian, Junfu Zhang, Amara Camara Mohamed, Yingzi Han, Liping Guo, Li Yang, Efficient capillary electrophoresis separation and determination of free amino acids in beer samples, *Electrophoresis* 35 (2014) 577–584