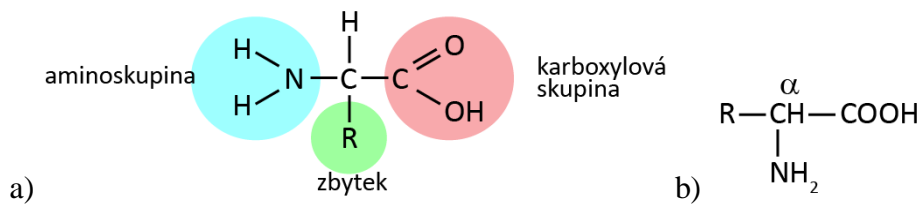


# Aminokyseliny

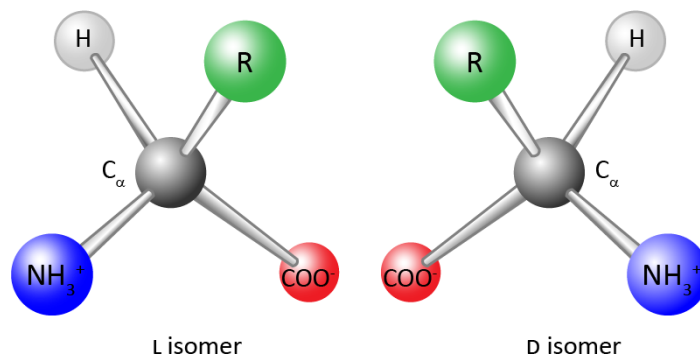
## 1 Teoretický úvod

Aminokyseliny jsou substituční deriváty karboxylových kyselin. Aminokyseliny obsahují karboxylovou skupinu ( $-\text{COOH}$ ), aminoskupinu ( $-\text{NH}_2$ ), atom vodíku a různé R- skupiny (postranní řetězce) (Obr. 1.1a). V biochemii se uplatňují především ty, které obsahují primární aminoskupinu vázanou na též uhlíkovém atomu jako karboxyl. Společný uhlíkový atom bývá označován jako  $\alpha$ -uhlík a celá skupina sloučenin jako  $\alpha$ -aminokyseliny (Obr. 1.1b).



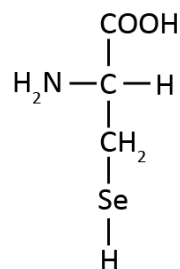
Obr. 1.1 a) Obecná struktura aminokyseliny, b) obecná struktura  $\alpha$ -aminokyseliny.

Z obecného vzorce  $\alpha$ -aminokyseliny vyplývá, že pokud R není atom vodíku, pak je na  $\alpha$ -uhlíku chirální centrum a  $\alpha$ -aminokyseliny tvoří dvě řady enantiomerů (Obr. 1.2). Nejjednodušší aminokyselinou mající asymetrický uhlík je alanin (Obr. 1.3a).  $\alpha$ -Aminokyseliny obsažené v bílkovinách jsou L-enantiomery (Obr. 1.3b). Bílkoviny jsou tvořeny 20 (21) aminokyselinami, které se tak nazývají proteinogenní (Obr. 1.4). 21. aminokyselinou je selenocystein (Obr. 1.5), který nahrazuje cystein v lidském enzymu glutathionperoxidasy a v enzimech některých bakterií.



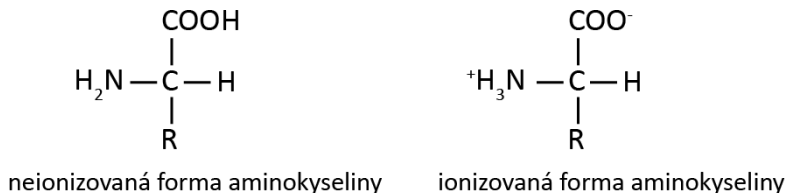
Obr. 1.2 Modely D- a L-aminokyseliny.



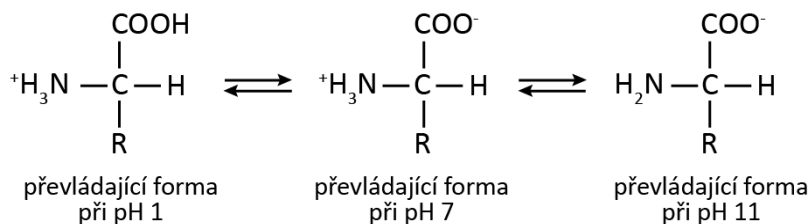


Obr. 1.5 Selenocystein.

Aminokyseliny jsou pevné krystalické látky, snadno se rozpouštějí v polárních rozpouštědlech (voda, ethanol), v nepolárních rozpouštědlech jsou nerozpustné.  $\alpha$ -Aminokyseliny se v roztoku při neutrálním pH vyskytují jako obojetný ion (zwitterion), který je elektricky neutrální, přestože nese dva náboje, které se vzájemně vyrovnávají. Ve formě obojetného iontu aminokyseliny je aminoskupina protonizovaná ( $-\text{NH}_3^+$ ) a karboxylová skupina disociovaná ( $-\text{COO}^-$ ) (Obr. 1.6). Ionizovaný stav aminokyseliny se mění v závislosti na koncentraci vodíkových iontů (pH), kdy se vzrůstajícím pH přechází z kationtu přes obojetný ion na anion (Obr. 1.7). Jednotlivé disociační stupně lze charakterizovat disociačními konstantami, které lze odečíst jako inflexní body titrační křivky aminokyseliny. Významným bodem titrační křivky je také hodnota pH, ležící uprostřed mezi disociačními konstantami kationtu a aniontu. Při této hodnotě označované jako isoelektrický bod (pI) (Obr. 1.8) je molekula ve formě obojetného iontu.



Obr. 1.6 Neionizovaná a ionizovaná forma aminokyseliny.



Obr. 1.7 Forma aminokyseliny v závislosti na pH.

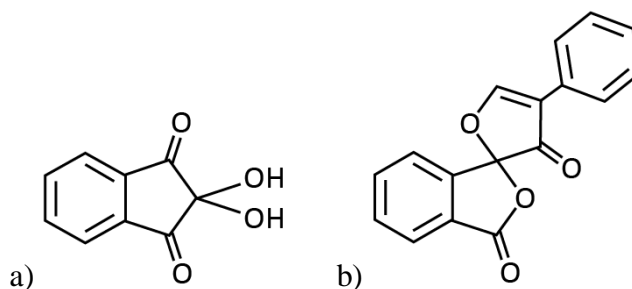
$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Obr. 1.8 Výpočet isoelektrického bodu.

Obecné chemické vlastnosti  $\alpha$ -aminokyselin vyplývají ze společné struktury na jejich  $\alpha$ -uhlíkovém atomu. Karboxylová skupina může vytvářet funkční deriváty reakcí

s nukleofilními činidly. V biochemii se uplatňuje zejména tvorba amidů, esterů, případně smíšených anhydridů. Aminokupina vytváří karboxamidy reakcí s oxidem uhličitým, acylamidy s kyselinami a Schiffovy báze s karbonylovými sloučeninami.

Aminokyseliny se prokazují reakcí s ninhydrinem (Obr. 1.9a) nebo fluoreskaminem (Obr. 1.9b). Ninhydrin dekarboxyluje aminokyseliny na oxid uhličitý, amoniak a aldehyd, redukovaný ninhydrin pak reaguje se vzniklým amoniakem za vzniku modrého komplexu. Tato reakce je základem kvantitativního stanovení aminokyselin. Fluoreskamin je citlivější činidlo, které umožňuje odhalit i nanogramová množství aminokyselin.



Obr. 1.9 a) Ninhydrin, b) fluoreskamin.

## 2 Vybavení

### 2.1 Materiál

#### *Identifikace aminokyselin v neznámém vzorku*

- roztoky neznámých vzorků aminokyselin

#### *Stanovení isoelektrického bodu kaseinu*

- sraženina kaseinu získaná z kravského mléka

#### *Zjištění přítomnosti kyseliny glutamové v potravinářských dochucovadlech*

- Podravka, bujón natur

### 2.2 Přístroje

- Vařič, sušárna, digestoř, elektrický vysoušeč (fén), vodní lázeň.

### 2.3 Chemikálie

- Hydroxid sodný, kyselina dusičná, ninhydrin, ethanol,  $\alpha$ -naftol, kyselina sírová, brom/chlornan sodný, dusitan sodný, kyselina sulfanilová, kyselina octová, uhličitán sodný, prolin, histidin, arginin hydrochlorid, glycin, tyrosin, tryptofan, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, octan sodný, kyselina glutamová, glutamát sodný.

## 2.4 Roztoky

### *Identifikace aminokyselin v neznámém vzorku*

- 1% roztoky standardů aminokyselin: prolin, arginin, glycin, tyrosin, tryptofan.
- 10% hydroxid sodný
- 0,2% ninhydrin
- 0,2%  $\alpha$ -naftol
- Bromnan sodný/Chlornan sodný
- Paulyho reagent I
- Paulyho reagent II
- 1,5 M uhličitan sodný

### *Stanovení isoelektrického bodu kaseinu*

- 1 M kyselina octová
- 0,1 M kyselina octová
- 0,1 M octan sodný
- 2% roztok kaseinu

### *Zjištění přítomnosti kyseliny glutamové v potravinářských dochucovadlech*

- Mobilní fáze ethanol-voda (7:3)
- 1% kyselina glutamová ethanolický roztok
- 1% glutamát sodný ethanolický roztok

## 3 Postup

### 3.1 Identifikace aminokyselin

Vedle acidobazických a optických vlastností jsou některé aminokyseliny charakteristické chemickými reakcemi vedlejších řetězců, které mohou být do jisté míry využity k jejich identifikaci, případně stanovení. Pomocí následujících reakcí určete, jaké aminokyseliny se nacházejí v neznámém vzorku.

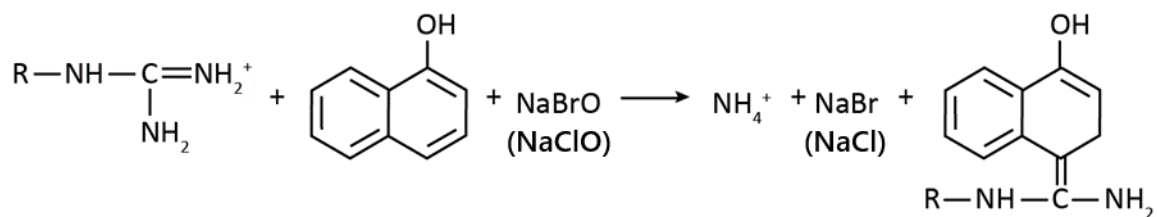
#### **Chemické reakce vedlejších řetězců aminokyselin**

- ***Sakaguchiho reakce***

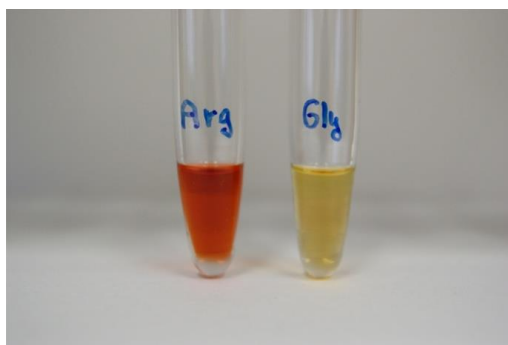
Působením alkalického bromnanu (případně chlornanu) a  $\alpha$ -naftolu na guanidinovou složku argininu vzniká charakteristické červené zbarvení vzniklého produktu oxidace, substituovaného 1,4-naftochinonu (Obr. 1.10).

*Pro reakci použijte: roztok argininu, glycinu a neznámý vzorek.*

- K 0,5 ml roztoku aminokyseliny přidejte 3 kapky 10% hydroxidu sodného, 0,25 ml 2% ethanolického roztoku  $\alpha$ -naftolu a poté 3 kapky bromnanu sodného (chlornanu sodného).
- Po promíchání vzniká červené zbarvení roztoku (Obr. 1.11).



Obr. 1.10 Sakaguchiho reakce.



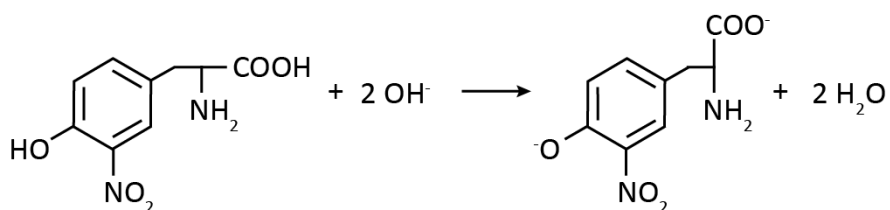
Obr. 1.11 Pozitivní a negativní Sakaguchiho reakce.

- **Xanthoproteinová reakce**

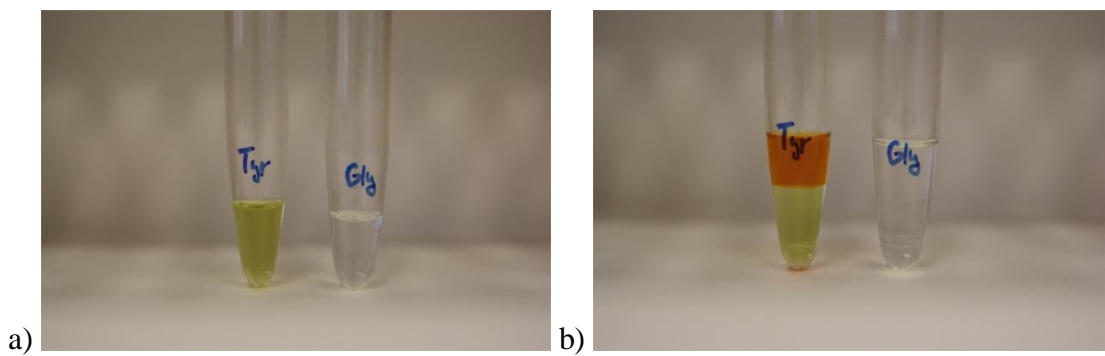
Důkaz spočívá v nitraci aromatického jádra příslušných aromatických aminokyselin (tryptofan, tyrosin a fenylalanin). Působením kyseliny dusičné nastává nitrace aromatického jádra za vzniku žlutých nitrosloúčenin. Působením alkálií se žluté zbarvení mění na oranžové (vzniká sůl aci-formy nitrosloúčeniny) (Obr. 1.12).

*Pro reakci použijte: roztok tyrosinu nebo tryptofanu, glycinu a neznámý vzorek.*

- Ve vodní lázni na vařiči zahřejte 0,5 ml roztoku aminokyseliny s 0,25 ml koncentrované kyseliny dusičné, vznikne žluté zbarvení, případně sraženina (Obr. 1.13a).
- Obsah zkumavky zalkalizujte 10–20 kapkami 10% NaOH, barva se změní na oranžovou až červenou (Obr. 1.13b).



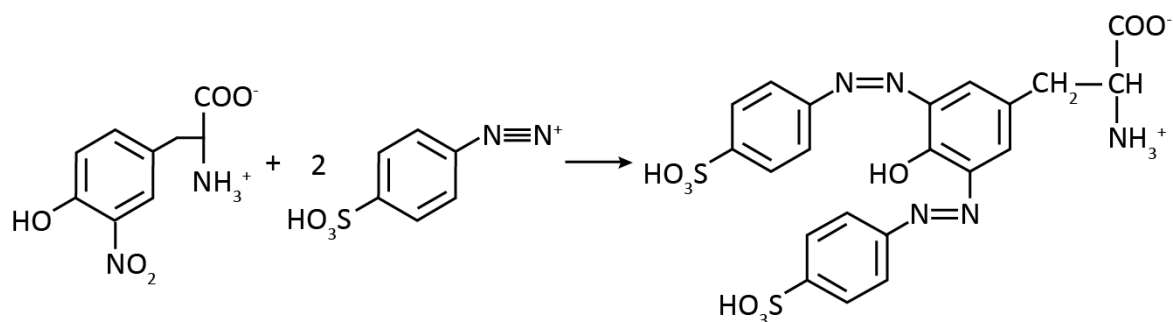
Obr. 1.12 Xanthoproteinová reakce.



Obr. 1.13 Xanthoproteinová reakce a) po přidavku kyseliny dusičné, b) po zalkalizování.

- **Paulyho reakce**

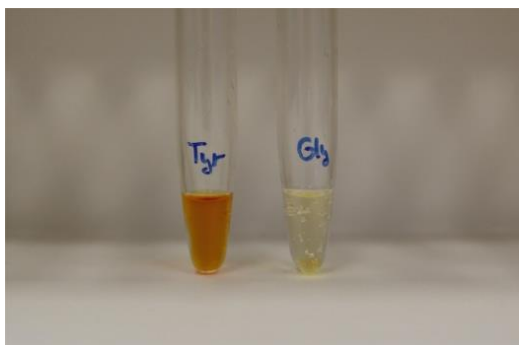
Reakcí tyrosinu a histidinu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou v alkalickém prostředí vznikají oranžové až červené kopulační produkty (azobarviva) (Obr. 1.14).



Obr. 1.14 Paulyho reakce.

*Pro reakci použijte: roztok tyrosinu, glycinu a neznámý vzorek.*

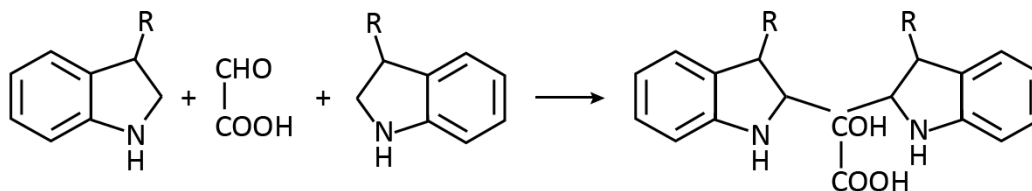
- Ve zkumavce smíchejte 0,5 ml Paulyho činidla I s 1 ml Paulyho činidla II.
- K 0,5 ml roztoku aminokyseliny přidejte 0,25 ml Paulyho činidla. Roztok zalkalizujte 2 kapkami 1,5 M uhličitanu sodného.
- Po protřepání vznikají oranžově červené kopulační produkty (Obr. 1.15).



Obr. 1.15 Pozitivní a negativní Paulyho reakce.

- **Adamkiewiczova reakce**

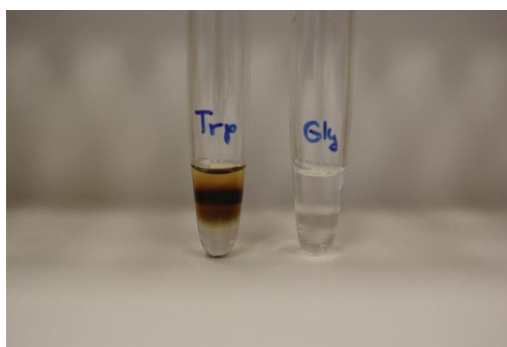
Principem tohoto důkazu je reakce indolového jádra tryptofanu s kyselinou glyoxylovou v prostředí koncentrované kyseliny sírové za vzniku červenofialového zbarvení (Obr. 1.16). Kyselina glyoxylová bývá součástí 100% kyseliny octové, kde vzniká její oxidací.



Obr. 1.16 Adamkiewiczova reakce.

*Pro reakci použijte: roztok tryptofanu, glycinu a neznámý vzorek.*

- Do zkumavky s 0,25 ml roztoku aminokyseliny přidejte 0,25 ml kyseliny octové, která obsahuje kyselinu glyoxylovou, a obsah zkumavky promíchejte.
- Velmi opatrně v nakloněné zkumavce roztok podvrstvěte 0,5 ml koncentrované kyseliny sírové.
- Po chvíli se na rozhraní obou kapalin objeví žlutohnědý prstenec (Obr. 1.17).



Obr. 1.17 Pozitivní a negativní Adamkiewiczova reakce.

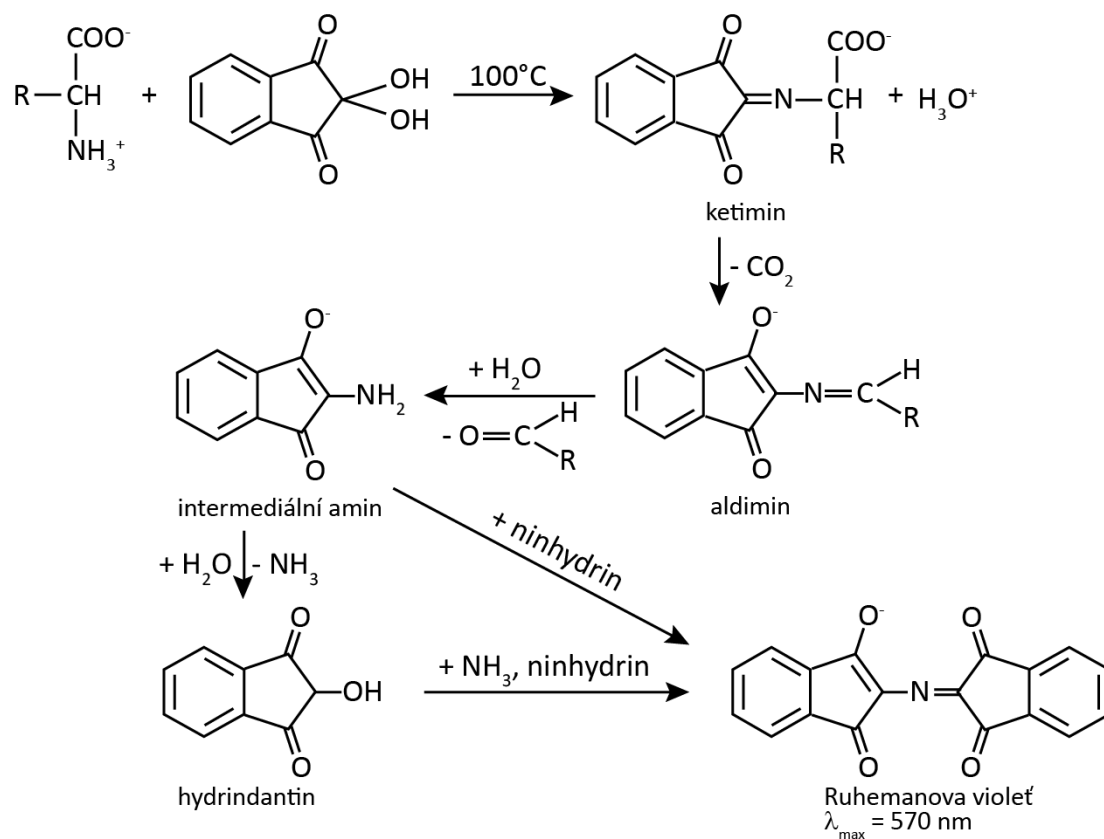
- **Ninhydrinová reakce**

Oxidačněredukční reakcí ninhydrinu (2,2-dihydroxy-1,3-indandion) s volnými amino- a imino- skupinami vznikají barevné produkty. Reakcí s primárními aminoskupinami modrofialový, který se nazývá Ruhemanova violeť ( $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$ ). Reakcí s iminoskupinami, např. u prolinu (Pro) a jeho derivátů, žlutý ( $\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$ ). V peptidech a proteinech, kde jsou aminokyseliny vázány peptidovou vazbou, reaguje pouze volná  $\epsilon$ -aminoskupina lysinu (Lys). Pro zvýšení citlivosti reakce se přidává do reakční směsi částečně redukovaný ninhydrin zvaný hydrindantin, který reaguje s reakcí uvolněným amoniakem za výrazného prohloubení zbarvení (Obr. 1.18).

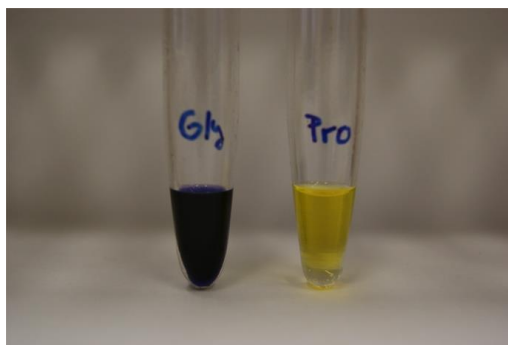
*Pro reakci použijte: roztok prolinu, glycinu a neznámý vzorek.*

- K roztoku 0,5 ml aminokyseliny přidejte 0,5 ml roztoku ninhydrinu a povařte.
- Asi po dvouminutovém varu vzniká tmavě modré zbarvení roztoku s aminokyselinou (Obr. 1.19). Prolin poskytuje zbarvení žluté (Obr. 1.19).





Obr. 1.18 Ninhydrinová reakce.



Obr. 1.19 Ninhydrinová reakce, reakce glycinu a prolinu.

### 3.2 Stanovení isoelektrického bodu kaseinu

Proteiny (bílkoviny) obsahují ve své struktuře kyselé (-COOH) i bazické skupiny (-NH<sub>2</sub>), což jim udává povahu amfolytů, jejichž forma závisí na formě prostředí. Vlastní interakcí funkčních skupin aminokyselin a vlivem pH okolního prostředí může molekula bílkoviny vyskytovat ve třech různých iontových formách a to jako kationt (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-R-COOH), aniont (NH<sub>2</sub>-R-COO<sup>-</sup>) nebo amfiont (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-R-COO<sup>-</sup>). Hodnotu pH prostředí, při kterém se molekula bílkoviny vyskytuje v amfiontu a její celkový náboj je nulový, nazýváme **isoelektrický bod (pI)**. Některé veličiny dosahují v isoelektrickém bodě extrémních hodnot, jako např. nejnižší rozpustnost bílkoviny ve vodě a nulová pohyblivost v elektrickém poli.

- Nejdříve si připravíte kasein srážením z kravského mléka. Do kádinky odměřte 15 ml kravského mléka a přiveďte jej k varu (na vařiči). Pozor, kádinku je nutné pozorně hlídat! Po krátkém povaření nechte kádinku s mlékem zchladnout na ledu po dobu 10-15 minut. Pomocí skleněné tyčinky odstraňte vzniklý škrálop a k mléku přidejte 1,5 ml koncentrované HCl. Obsah kádinky důkladně promíchejte skleněnou tyčinkou a vzniklou sraženinu kaseinu odfiltrujte.
- Nyní si připravíte roztok kaseinu. Ze sraženiny kaseinu na filtračním papíře odvážte do kádinky 1 g kaseinu a rozpusťte jej v 50 ml vody. Kádinku s roztokem kaseinu přeneste na vodní lázeň s teplotou 50 °C a za občasných míchání skleněnou tyčinkou nechte roztok proteinu rozpustit (5-10 min). Mléčně zakalený roztok bez sraženin je vhodný k dalšímu použití.
- Připravte si sadu 6 zkumavek, očísľujte je a pomocí skleněných pipet připravte sadu pufrů s objemy dle následující tabulky (Tabulka 1).

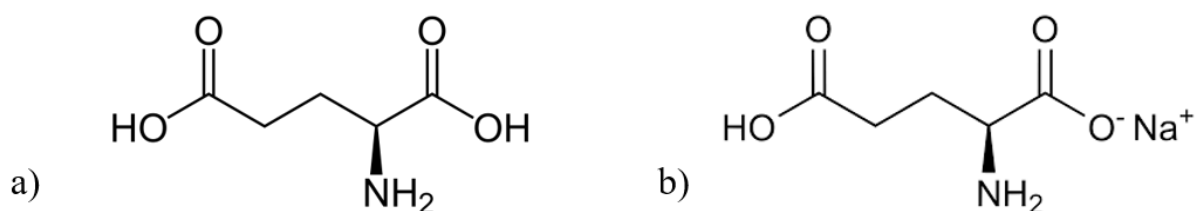
Tabulka 1: Objemy kyseliny octové a octanu sodného pipetované do jednotlivých zkumavek.

Zkumavka	1	2	3	4	5	6
0,1 M CH <sub>3</sub> COOH (ml)	0,8	1	2	2,6	4,1	-
0,1 M CH <sub>3</sub> COONa (ml)	4,2	4	3	2,4	0,9	-
H <sub>2</sub> O (ml)	3	3	3	3	3	6
1 M CH <sub>3</sub> COOH (ml)	-	-	-	-	-	2
pH	6	5,5	5	4,5	4	3

- Do každé zkumavky přidejte 2 ml připraveného roztoku kaseinu. Všechny zkumavky promíchejte pomocí vortexu a nechte stát při laboratorní teplotě 15 minut. Po 15 minutách pozorujte množství sraženiny v jednotlivých zkumavkách. pH zkumavky s největším množstvím vysráženého proteinu udává pI kaseinu.

### 3.3 Zjištění přítomnosti kyseliny glutamové v potravinářských dochucovadlech

Při výrobě potravin se v současnosti hojně využívá přísadků mnoha různých chemických látek ke zlepšení vlastností a konzervaci potravin. Využívají se například sladidla, konzervanty, regulátory kyselosti a mimo jiné také dochucovadla. Tyto látky pocházejí buď z přírodních zdrojů, nebo jsou uměle syntetizovány a obecně se vyskytují ve velmi malém množství. Pro zachování bezpečnosti těchto látek je mezinárodními regulačními úřady stanoven přijatelný denní příjem těchto látek (ADI z angl. acceptable daily intake), udáván většinou v jednotkách mg/ kg tělesné váhy. Jedním z často využívaných dochucovadel je kyselina glutamová (Obr. 1.20a) a její soli (známé jako glutamáty, či –glutamany) z nichž nejznámější je glutamát sodný (Obr. 1.20b). Kyselina glutamová je neesenciální aminokyselina, která se používá ke zvýraznění chuti masových a zeleninových pokrmů, kdy je často označovaná jako chuť „umami“. Je přirozenou složkou bílkovin masa, ale i rostlinných bílkovin (rajčata, hrášek) a tvoří asi 10-25 % obsahu celkových bílkovin. Důležitou roli hraje tato kyselina také v centrálním nervovém systému savců, kde je hlavním excitačním neurotransmiterem v mozku. V nezbytném povoleném množství (30 mg/kg tělesné váhy) jsou aditiva kyseliny glutamové součástí instantních polévek, kořenících přípravků, omáček, paštik, kečupů dresinků konzerv apod. Tato aditiva můžeme na přípravcích najít pod označením E621- 625, jejich obsah je také často skryt pod označením kvasničný či sójový extrakt.



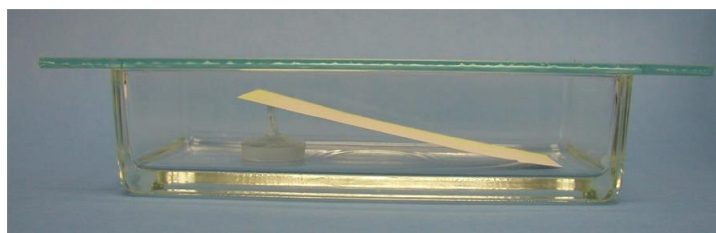
Obr. 1.20 a) Kyselina glutamová, b) Glutamát sodný.

Přítomnost glutamátu i kyseliny glutamové lze v potravinářských výrobcích zjistit pomocí chromatografických metod s následnou detekcí pomocí ninhydrinového činidla. Chromatografie se ve svých mnoha podobách a technikách stále progresivně vyvíjí a je široce používanou metodou pro dělení směsí různých látek na jednotlivé komponenty. Patří dnes mezi nejvýznamnější analytické i preparativní metody. Používá se v laboratořích chemických, biochemických i biologických, ale setkáme se s ní hojně i v různých průmyslových odvětvích, např. v průmyslu farmaceutickém. Při chromatografickém dělení směsi se uplatňuje vždy následující princip: směs námi dělených látek se pohybuje spolu s rozpouštědlem nebo je unášena ve formě par nosným plynem a je ve styku s jinou fází, která je vůči okolí nepohyblivá a různou silou zdržuje různé složky dělené směsi. Tak se některé složky pohybují přes nepohyblivou fázi rychleji, jiné pomaleji, někdy mohou být některé i zcela zadrženy.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC, thin layer chromatography) může být typu kapalina-kapalina nebo kapalina-tuhá látka. V obou případech je mobilní fáze kapalina. Stacionární fáze je v případě TLC chromatografie buď kapalina zakotvená v tenké vrstvě na podložním materiálu, nebo pevná látka (adsorbent) v podobě tenké vrstvy. Používanými mobilními fázemi jsou například: cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen apod. Stacionárními fázemi mohou být: silikagel, oxid hlinitý, iontoměniče apod. Jako podložní materiál se pro stacionární

fáze používají skleněné desky nebo hliníkové fólie (silufol). Analýza TLC se provádí následovně. Na tenkou vrstvu se na startovní místo nanese kapka analyzované směsi. Tenká vrstva se jedním koncem ponoří do mobilní fáze, tak, aby startovní pozice kapek analytu zůstaly nad hladinou mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou, přičemž dochází k transportu a dělení analyzované směsi. Analýza se ukončuje, když čelo mobilní fáze dorazí do blízkosti protilehlého konce tenké vrstvy. Čelo mobilní fáze je označeno a tenká vrstva je vysušena. Vysušená vrstva, na které jsou patrné skvrny jednotlivých složek směsi v různé vzdálenosti od startu, představuje chromatogram této metody. Chromatogram je i v případě této metody možno vyhodnocovat kvalitativně a kvantitativně. Kvalitativní vyhodnocení (o jakou látku se jedná) se provádí tak, že se současně s analyzovanou směsí o neznámém složení analyzuje na téže tenké vrstvě předem připravená směs o známém složení (standard), který je nanesen na startovní pozici vedle neznámé směsi. Pokud se na chromatogramu shodují vzdálenosti jednotlivých složek od startu v neznámé směsi a ve směsi známé, pak se jedná o tytéž látky. Kvantitativní vyhodnocení se provádí pomocí denzitometru nebo extrakcí látek z chromatogramu. Denzitometr je přístroj, který zjednodušeně řečeno, dokáže změřit intenzitu zabarvení skvrn na chromatogramu a z intenzity vypočítat koncentraci látky. Při extrakční metodě jsou jednotlivé skvrny látek extrahovány z chromatogramu do vhodného rozpouštědla a jejich koncentrace v rozpouštědle je pak určena vhodnou metodou.

- Do kádinek odvažte vždy 0,2 g Podravky nebo bujonu a rozmíchejte každý vzorek v 10 ml horké vody. Roztok přefiltrujte do malé kádiny. Do 1,5 ml eppendorfky napipetujte pomocí pasteuovy pipety 0,5 ml filtrátu a k němu přidejte 0,5 ml 96% EtOH.
- Chromatografii na silikagelu uskutečňte na tenké vrstvě na hliníkové folii zvané Silufol. Jedná se o chromatografii adsorpční. Na Silufolu vyznačte jemně slabou čáru tužkou 2,5 cm od okraje (start). Podle počtu nanášených vzorků si na startu naznačte tužkou body pro jejich nanášení a pořadí si запиšte do protokolu. Vzorky naneste pomocí plastové špičky, nebo jemnou kapilárou (3–4 kapky na stejné místo, skvrnu vždy před dalším nanesením vysušte pomocí fěnu). Skvrny vzorků nesmí být v průměru větší než 3–5 mm.
- Do chromatografické komory nalijte mobilní fázi a uzavřete ji skleněným víkem. Silufolovou folii vložte do chromatografické komůrky s rozdělovací směsí (mobilní fáze) tak, aby mobilní fáze vstupovala na folii u startu (Obr. 1.21). Čelo mobilní fáze se asi po 45 minutách dostane 1 cm od konce folie. Poté folii vyjměte, vyznačte na ní tužkou konec mobilní fáze a vysušte na vzduchu nebo opatrně fěnem. Následně v digestoři postříkejte aerosolem ninhydrinového činidla a zahřejte v sušárně 10 minut na 100 °C.



Obr. 1.21 Vložení silufolu do chromatografické komory.

## 4 Vyhodnocení:

### *Identifikace aminokyselin v neznámém vzorku*

- 1) Do tabulky přehledně uveďte výsledky provedených chemických reakcí pro standardy aminokyselin i pro neznámý vzorek.
- 2) Identifikujte složení aminokyselin v neznámém vzorku a zdůvodněte, na základě čeho jste určili, o jaké aminokyseliny se jedná.

### *Stanovení isoelektrického bodu kaseinu*

- 1) Popište změnu v jednotlivých zkumavkách a hodnotu pH, při kterém jste pozorovali pI kaseinu. Proč v isoelektrickém bodě vznikla sraženina proteinu?
- 2) Čím se vyznačuje isoelektrický bod bílkovin?
- 3) Napište schéma vystihující změnu amfiontu v kyselém a zásaditém prostředí.

### *Zjištění přítomnosti kyseliny glutamové v potravinářských dochucovadlech*

- 1) Změřte pravítkem délku dráhy mobilní fáze (start-čelo). Pro každý standard i vzorek změřte délku dráhy skvrny od startu (měří se vzdálenost středu skvrny od startu).
- 2) Vypočítejte hodnoty retenčních faktorů ( $R_f$ ) pro standardy i jednotlivé vzorky, výsledky запиšte do tabulky a porovnejte, zda vzorky obsahují glutamát sodný, či kyselinu glutamovou. Hodnota  $R_f$  je bezrozměrný podíl dráhy skvrny k dráze mobilní fáze.
- 3) Zamyslete se nad výsledkem pro každý vzorek a diskutujte přítomnost, či nepřítomnost kyseliny glutamové a glutamátu sodného ve vzorcích v porovnání se složením na obalu komerčního přípravku.