

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

Laisvų amino rūgščių nustatymas augalinėje žaliavoje dujų chromatografijos metodu

Magistro baigiamasis darbas

Darbą parengė: Matas Gaivenis, 1 gr

Darbo vadovas: Prof., Dr., Liudas Ivanauskas

Kaunas

2018

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
FARMACIJOS FAKULTETAS
ANALIZINĖS IR TOKSIKOLOGINĖS CHEMIJOS KATEDRA

TVIRTINU:

Farmacijos fakulteto dekanė Ramunė Morkūnienė

Laisvų amino rūgščių nustatymas augalinėje žaliavoje dujų
chromatografijos metodu

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas:

Prof., dr., Liudas Ivanauskas

Data

Parašas

Recenzentas:

Data:

Parašas:

Darbą atliko:

Magistratas Matas Gaivenis

Data:

Kaunas, 2018

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
SANTRUMPOS.....	8
1. ĮVADAS	9
2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
3. LITERATŪROS ANALIZĖ	11
3.1 Amino rūgštys.....	11
3.2 Amino rūgščių stereoizomerija	13
3.3 Amino rūgščių reguliacinė funkcija	14
3.4 Amino rūgščių apsauginė funkcija	14
3.5 Amino rūgštys perduoda nervinius impulsus	14
3.6 Amino rūgščių išskyrimas	15
3.7 Amino rūgščių nustatymas dujų chromatografijos metodu	15
3.8 Amino rūgščių derivatizacijos metodai	16
3.9 Sėjamasis grikiš (Fagopyrum esculentum).....	18
3.10 Daržinis krogas (Crocus sativus).....	19
3.11 Pluoštinė kanapė (Cannabis sativa)	20
4. TYRIMO OBJEKTAS IR METODIKA	21
4.1 Tyrimo objektas	21
4.2 Dujų chromatografijos metodika	22
5. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	23
5.1 Amino rūgščių kokybinis nustatymas.....	23
5.2 Amino rūgščių kiekybinis nustatymas.....	25
5.3 Amino rūgščių nustatimo metodikos validacija	26
5.3.1 Tarpinis preciziškumas	26
5.3.2 Rezultatų pakartojamumas	27

5.3.3 Minimali nustatoma koncentracija.....	28
5.4 Amino rūgščių ekstrakcijos sąlygos	30
5.5 Laisvų amino rūgščių nustatymas grikių sėklose	33
5.6 Laisvų amino rūgščių nustatymas krokų gumbuose.....	35
5.7 Laisvų amino rūgščių nustatymas kanapių sėklose	36
5.8 Skirtingoje augalinėje žaliavoje esančių amino rūgščių kiekių palyginimas	36
6. IŠVADOS	38
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	39
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	40
9. MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO REZULTATŲ MOKSLINĖ SKLAIDA	43
10. PRIEDAI.....	44

SANTRAUKA

Laisvų amino rūgščių nustatymas augalinėje žaliavoje dujų chromatografijos metodu

Mato Gaivenio magistro baigiamojo darbo vadovas prof. Dr. Liudas Ivanauskas; Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Farmacijos fakulteto, Analizinės ir toksikologinės chemijos katedra, Kaunas.

Darbo tikslas: Nustatyti ir parinkti tinkamiausias derivatizacijos sąlygas amino rūgščių nustatymui augalinėje žaliavoje dujų chromatografijos metodu.

Darbo uždaviniai: 1. Atlikti mokslinės literatūros analizę ir nustatyti galimus derivatizacijos metodus. 2. Parinkti tinkamiausią derivatizacijos reagentą. 3. Optimizuoti derivatizacijos ir ekstrakcijos sąlygas. 4. Palyginti laisvų amino rūgščių kiekius skirtingose augalinėse žaliavose.

Metodai: Tirta ekologiškai irintencyviai užaugintos nelukštentos grikių sėklos. Naudota dujų chromatografijos metodika su masių spektrometrijos detektoriumi.

Išvados:

1. Atlikus eksperimentus su derivatizatoriais nustatyta, jog tinkamiausias derivatizacijos reagentas yra MTBSTFA (N-metil-N-(tert-butildimetilsilyl)trifluoroacetamidas).
2. Optimaliausias ekstrakcijos ir derivatizacijos sąlygos yra: tiriamas 1g augalinės žaliavos ekstrakcija atliekama metanoliu. Žaliava paveikiama ultragarsu, o vėliau paliekama stovėti 24 valandoms.
3. Optimaliausios derivatizacijos sąlygos. Ekstraktas kaitinamas kartu su derivatizatoriumi ir acetonitrilu 100 laipsnių temp. glicerolio vonioje 2,5 val.
4. Didžiausias bendras amino rūgščių kiekis nustatytas pluoštinės kanapės sėklose (197,51mg/ml). Mažiausias ekologiškai augintose grikių sėklose (12,2 mkg/ml). Lyginant skirtingais metodais augintas grikių kultūras 1,7 karto didesni kiekiai nustatyti intensyviai augintuose grikių sėklose

SUMMARY

Detection of free amino acids in plant material using Gas Chromatography method

Matas Gaivenis final thesis for master's degree/ scientific supervisor prof. dr. Liudas ivanauskas; Lithuanian University Of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, department of Analytical and Toxicological Chemistry. – Kaunas.

Aim of the work: detect and choose optimal condition for detection of amino acids in plant material.

Tasks of work: perform analysis of scientific literature and evaluate possible derivatisation agent for amino acid detection; choose and test possible derivatisation agent; optimize derivatization and extraction conditions; compare free amino acids amounts in different plant material.

Object and methods: Buckwheat seeds grown under organic and conventional farming conditions, croc tubers and Cannabis sativa seeds. Assay analysis performed by gas chromatography coupled with mass spectrometer.

Conclusions:

1. The best result was achieved when (N-methylN(tertbutyldimethylsilyl)trifluoroacetamide) MTBSTFA was used.
2. Optimal conditions for extraction are 1g of plant material, extraction is carried with methanol. Plant material is poured with 10 ml methanol, ultrasonicated, and left to extract for 24 hours.
3. Optimal conditions for derivatization are extract is heated with derivatizator and acetonitrile in glycerol at 100°C for 2,5 hours
4. Biggest total amino acid quantity was found in cannabis seeds (197,51 mkg/ml) and lowest on ecologically grown buckwheatseed (12,2 mkg/ml). Results gotten comparing buckwheat seeds showed that 1,7 times bigger total amount of amino acids where in conventionally cultivated buchwheat seeds.

Padėka

Už suteiktas darbo sąlygas ir pagalbą atliekant mokslinį tiriamąjį darbą „Amino rūgščių nustatymas dujų chromatografijos metodu“ dėkoju analizinės ir toksikologinės katedros vedėjui, prof. Liudui Ivanauskui. Taip pat už suteiktas konsultacijas bei pagalbą nuoširdžiai dėkojulekt. Mindaugui Marksai.

SANTRUMPOS

AR – amino rūgštys

DC – dujų chromatografija

MS – masių spektrometrijos detektorius

FID – liepsnos jonizacijos detektorius

BSTFA - (N,O-bis(trimetil-silil)-trifluoroacetamidas) derivatizatorius

MTBSTFA - (N-metil-N-(tret-butildimetilsilil)trifluoroacetamidas) derivatizatorius

SSN – Standartinė santykinė paklaida

LoD - Minimali nustatoma koncentracija

LOQ - Minimali kiekybinio nustatymo koncentracija

HCL – vandenilio chlorido rūgštis

1. ĮVADAS

Amino rūgštys yra vienas iš fundamentalių vienetų žmogaus organizme [1]. Jos atlieka struktūrinę, apsauginę, signalinę funkciją, dalyvauja įvairių junginių, tokių kaip hormonai, sintezėje [2]. Tačiau padidėję jų kiekiai gali ir pakenkti, nes gali sukelti neurologines ligas, oksidacinį stresą, širdies ir kraujagyslių ligas. Amino rūgščių preparatai Lietuvoje dažniausiai yra registruojami kaip maisto papildai, todėl jų kokybės tyrimai yra patikėti gamintojams ir papildomai nėra tikrinami. Išimtis taikoma amino rūgščių preparatui, skirtam naudoti intraveniškai.

Šiuo metu yra daug metodų, padedančių nustatyti amino rūgštis augalinėse žaliavose, tačiau dažniausiai yra pasirenkama efektyvioji skysčių chromatografija taikant įvairius detektorius. Naudojant šį prietaisą mėginius galima nustatyti tiek kiekybiškai, tiek kokybiškai. Taip pat galima tirti atskiras medžiagas ir jų mišinius. Medžiagos identifikuojamos pagal jų sulaikymo laiką, o tiriamųjų medžiagų kiekiai nustatomi pagal chromatografinės kreivės piko plotą [3]. Dujų chromatografija yra greitesnis medžiagų nustatymo metodas. Analizė dažniausiai užtrunka keliolika minučių [4]. Tačiau šis metodas turi ir trūkumų. Dujų chromatografijos metodu galima tirti tik lakius junginius, o amino rūgštys tokios nėra, todėl sprendžiant šią problemą yra naudojamas derivatizacijos metodas siekiant suteikti junginiams papildomų savybių, o šiuo konkrečiu atveju - suteikti lakumą. Stengiantis išspręsti šią problemą, šio tyrimo metu buvo ieškoma tinkamo derivatizacijos metodo bei parenkamos optimalios sąlygos derivatizacijai vykti.

Laisvų amino rūgščių nustatymui pasirinktas dujų chromatografijos metodas. Metodas, pasirinktas tyrimui atlikti, yra vienas iš naujausių, todėl iki šiol katedroje dar nebuvo taikomas siekiant nustatyti nelakius junginius. Po atliktų tyrimų buvo pasirinktas MTBSTFA - (N-metil-N-(tert-butildimetilsilyl)trifluoroacetamidas) derivatizatorius, ištirtos ir optimizuotos ekstrakcijos ir derivatizacijos sąlygos. Kaip augalinės žaliavos pavyzdžiai buvo pasirinktos sėjamojo griekio sėklos, daržinio kroko gumbai ir pluoštinės kanapės sėklos. Šios žaliavos pasirinktos remiantis tuo, jog trūksta duomenų apie jų kaupiamas laisvas amino rūgštis.

2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: Parinkti derivatizacijos reagentą laisvoms amino rūgštims nustatyti, atrasti optimalias sąlygas jai vyksti ir nustatyti laisvų amino rūgščių kiekius skirtingose augalinėse žaliavose.

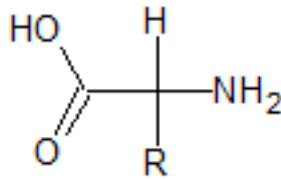
Darbo uždaviniai:

1. Atlikti mokslinės literatūros analizę siekiant išsiaiškinti galimus derivatizacijos metodus;
2. Parinkti tinkamiausią derivatizacijos reagentą;
3. Optimizuoti derivatizacijos ir ekstrakcijos sąlygas;
4. Palyginti laisvų amino rūgščių kiekius skirtingose augalinėse žaliavose.

3. LITERATŪROS ANALIZĖ

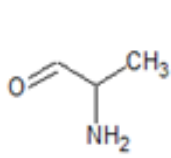
3.1 Amino rūgštys

Amino rūgštys tai viena iš fundamentalių dalelių gyvame organizme. Jos atlieka daug įvairių funkcijų, tokių kaip struktūrinę, receptorinę [6], energetinę, fermentinę [7]. Tai organiniai junginiai, kurie turi karboksi grupę, amino grupę ir anglies atomų skeletą. Bendra α -amino rūgščių struktūrinė formulė pavaizduota 1 paveikslėlyje.

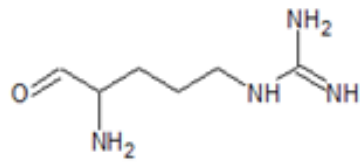


1 paveikslas. Bendra amino rūgščių struktūrinė formulė [8].

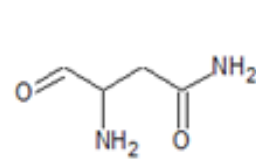
Priklausomai nuo anglies atomų skaičiaus ir išsidėstymo jos yra skirstomos į atskiras amino rūgštis [2]. Gamtoje yra randama daugiau nei 300 amino rūgščių, tačiau tik 20 iš jų yra panaudojamos baltymų sintezėje. Šie junginiai dar yra skirstomi į pakeičiamąsias ir nepakeičiamąsias amino rūgštis.



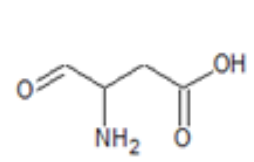
Alaninas



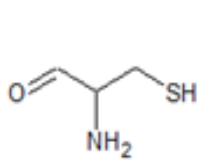
Argininas



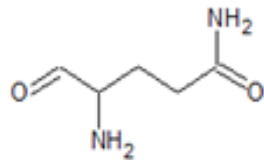
Asparginas



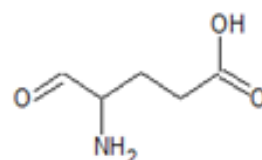
Asparto r.



Cisteinas



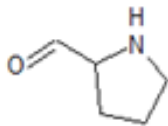
Glutaminas



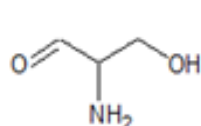
Glutamo r.



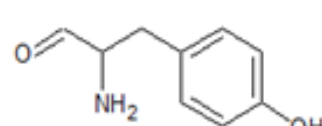
Glicinas



Prolinas



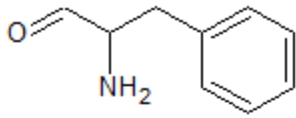
Serinas



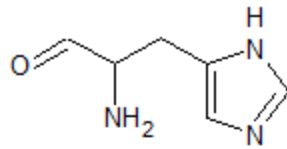
Tirozinas

2 paveikslėlis. Pakeičiamosios amino rūgštys. [9]

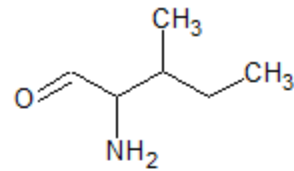
Nepakeičiamoms amino rūgštims priklauso valinas, treoninas, lizinas, triptofanas, fenilalaninas, leucinas, izoleucinas (Pav.3).



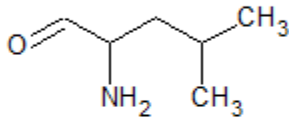
Fenilalaninas



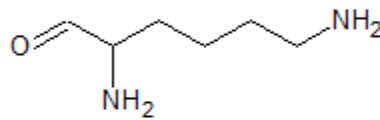
Histidinas



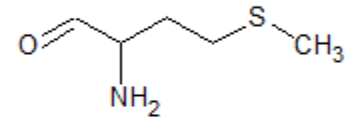
Izoleucinas



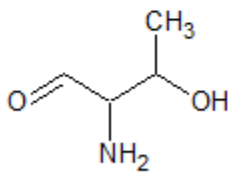
Leucinas



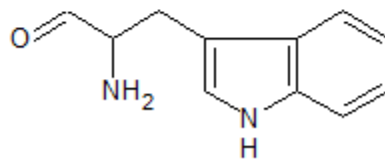
Lizinas



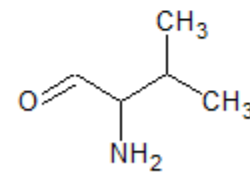
Metioninas



Treoninas



Triptofanas



Valinas

3 paveikslas. Nepakeičiamos amino rūgštys.

Nepakeičiamomis amino rūgštys vadinamos todėl, kad organizmas jų nesintetina ir jos yra gaunamos tik su maistu. Labai svarbu tirti maiste ar vaistuose esančių amino rūgščių kiekį, nes esant jų trūkumui gali sutrikti medžiagų absorbcija, organizmo augimas, pasireikšti nenormalus elgesys ar net ištikti mirtis [10].

3.2 Amino rūgščių stereoizomerija

Amino rūgštys, išskyrus gliciną, turi asimetrinį anglies atomą. Tai reiškia, jog prie šio atomo yra prisijungę 4 skirtingi pakaitai. Dėl šio anglies atomo amino rūgštys turi optinį aktyvumą, kuris matomas tiriant optinį poliarizuotos šviesos sukimo kampą [8].

Kadangi amino rūgštys taip pat turi chiralinį anglies atomą, jos gali turėti D ir L enantiomerus. Gamtoje dažniausiai yra sutinkami L enantiomerai, o D enantiomerai randami tik baltymuose, kurie yra sintetinami atliekant posttransliacines modifikacijas [11].

3.3 Amino rūgščių reguliacinė funkcija

Šiuo metu daugiausiai nagrinėjamos amino rūgštys, siejamos su reguliacine funkcija, yra glutaminas ir argininas. Atlikti tyrimai parodė, jog vartojant papildus su argininu yra padidinama genų ekspresija atsakinga už ląstelės augimą ir oksidantų pašalinimą [12]. Manoma, jog amino rūgštys reguliuoja genų ekspresiją keliais mechanizmais:

- 1) pakeisdamos specialių RNR polimerazių aktyvatorių specifiškumą;
- 2) prisijungdamos prie DNR sekoje esančių slopiklių, kurie yra netoli ar persidengia su aktyvatorių regionu;
- 3) pakeisdamos transkripcijos kofaktorių [12].

3.4 Amino rūgščių apsauginė funkcija

Amino rūgštys randamos visuose gyvuose organizmuose. Kaip ir žinduoliuose, taip ir augaluose jos yra naudojamos sintetinant baltymus, tačiau gali atlikti žinduoliams nebūdingas funkcijas, tokias kaip apsauginę nuo augalėdžių gyvūnų ar vabzdžių. Pavyzdžiui, augaluose yra sintetinami gliukozinatai. Šie junginiai yra gaunami iš amino rūgščių kaip antriniai metabolitai. Kai augalas sužeidžiamas, gliukozinatai yra hidrolizuojami iki isotiocinātų, nitrilų ir tiocinātų. Šie skilimo produktai atlieka įvairias funkcijas, tokias kaip detergentai, pritraukėjai, ir atlieką svarbią rolę apsaugant augalą [13].

3.5 Amino rūgštys perduoda nervinius impulsus

D- amino rūgštys nėra naudojamos baltymų sintezėje. Dėl šios priežasties susidaro depai, todėl šie junginiai yra panaudojami impulsų perdavimui. Pavyzdžiui, tyrimai parodė jog D - serinas yra kaupiamas žiurkių smegenyse [14] ir agonistiškai veikia į N-metil- D- aspartato receptorių. Jei šis receptorių dirginamas per daug, yra stabdoma Mg^{2+} jonų blokada ir padidėja Ca^{2+} jonų patekimas. Šie pokyčiai ilgainiui gali sukelti neurodegeneracines ligas, tokias kaip Alzheimerio, Parkinsono ar Hantigtono liga [15].

3.6 Amino rūgščių išskyrimas

Vienas iš svarbiausių žingsnių norint nustatyti amino rūgštis augalinėse žaliavose yra išskyrimas arba ekstrakcija. Siekiant parinkti tinkamą ekstrakcijos metodą reikia atsižvelgti į daugelį veiksnių. Vienas iš jų yra tirpiklio parinkimas. Remiantis T. E. Needham atliktu tyrimu paaiškėjo, jog amino rūgštys yra tirpios poliniuose tirpikliuose [16]. Todėl anot šio tyrimo, vieni iš galimų polinių tirpiklių yra metanolis arba etanolis. Taip pat svarbus ne tik tirpiklio parinkimas, o ir išskyrimo metodika. Kinijoje atliktame tyrime augalinė žaliava buvo atsveriamą, užpilama metanoliumi iki 5ml ribos ir paliekama 24 valandoms. Galima ir kita metodika, kai veikiama ultragarsu augalinė žaliava yra užpilama tirpikliu, įdedama į ultragarso vonelę ir paliekama 10 min reikiamoms medžiagoms išsiskirti. Tačiau neatlikus daugiau žingsnių yra nustatomos tik laisvos, į baltymų sudėtį neįeinančios amino rūgštys. Siekiant iškart hidrolizuoti baltymus galima naudoti metodiką, panaudotą Robert H. Glew tyrime [17]. Mėginiai buvo ištirpinti 6 N HCl rūgštyje, kaitinti 20 h, 110 °C. Po to rūgštis buvo pašalinta naudojant vakuumą. Mėginiai pertirpinti 0,4 ml 1mM HCl ir atlikta derivatizacija.

3.7 Amino rūgščių nustatymas dujų chromatografijos metodu

Dujų chromatografija - analitinis metodas, pritaikomas nustatant mėginius tiek kokybiškai, tiek kiekybiškai. Metodo veikimo principas yra medžiagų atskyrimas remiantis molekuline mase ir afinitetu (giminingumu) nejudriai fazei. Medžiagų atskyrimas paremtas dalelių pasiskirstymu tarp dviejų fazių - judrios ir nejudrios. Dujų chromatografijos pagrindinis skirtumas nuo skysčių chromatografijos yra tas, jog dujų chromatografijoje judri fazė yra dujos, o skysčių – skystis.

Dujų chromatografija turi pranašumų prieš kitas chromatografijas:

- greita analizė;
- didelis medžiagų atskyrimas (atskiria ir izo formas, tokias kaip leucinas ir izoleucinas);
- didelis jautrumas;
- galima kombinuoti kelis detektorius iš eilės, nes nesunaikina mėginio, pavyzdžiui, masių spektrometriją ir liepsnos jonizacijos detektorių;
- galima tirti ir nedidelius medžiagos kiekius (injekcijai užtenka ir 1 µl);
- nebrangi [4].

Tačiau turi ir kelis trūkumus:

- be papildomo paruošimo galima tirti tik lakius junginius;
- netinka termiškai nestabiliems junginiams [4].

Amino rūgštims tirti dažniausiai yra naudojamos kapiliarinės kolonėlės, pagamintos iš suspausto silikagelio [18], parenkant vidutinį kolonėlės ilgį – 25-30m ir 0,25mm vidinio ploto [19]. Kaip detektoriai dažniausiai renkamos masių spektrometrija (dėl galimybės patikrinti junginius duomenų bazėse) arba liepsnos jonizacijos detektorius (FID), dėl didesnio tikslumo [20]. Kaip judri fazė dėl savo inertiškumo yra pasirenkamos vandenilio dujos.

3.8 Amino rūgščių derivatizacijos metodai

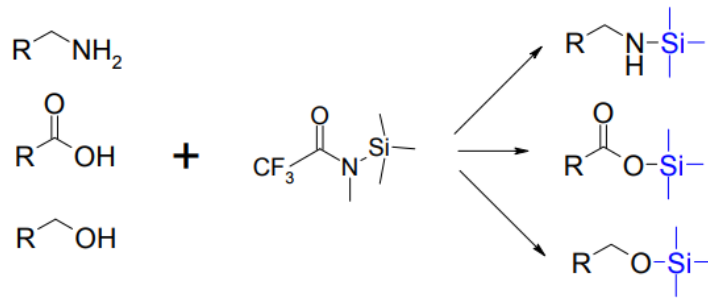
Derivatizacija - metodas, kai prijungiama speciali funkcinė grupė, kuri junginiui suteikia papildomas savybes, tokias kaip didesnis aktyvumas, tirpumas, lakumas, didėja ar mažėja virimo ir lydymosi temperatūra ar pakeičiama agregatinė būseną. Pagrindiniai derivatizacijos tipai:

- sililinimas;
- alkilinimas;
- acilinimas;
- chiralinė derivatizacija.

Taip pat yra galima prieš kolonėlinė ir po kolonėlinė derivatizacija. Kadangi amino rūgštys yra nelakūs junginiai, po kolonėlinė derivatizacija yra negalima, nes norint jas nustatyti dujų chromatografijos metodu būtina joms suteikti lakumą.

Iš derivatizacijos metodų dažniausiai yra pasirenkamas sililinimas [21,22].

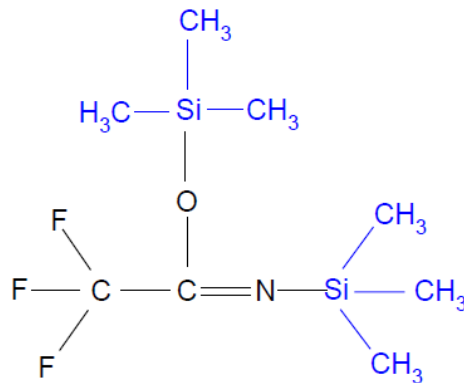
Sililinimas vyksta prijungiant silil grupę. Ši grupė pakeičia vandenilius. Šios reakcijos vyksta gana sudėtingai, tačiau panaudojus stiprius sililinimo reagentus ir katalizatorius, amino rūgštys yra derivatizuojamos. Reakcija, kaip vyksta derivatizacija naudojant silil preparatus pateikta 3 paveikslėlyje.



4 Paveikslėlis. Derivatizacijos reakcija naudojant silininimo schemą [23].

Atliekant šią derivatizaciją labai svarbu, jog tiek mėginys, tiek tirpikliai būtų miltelių pavidalo, nes silil grupės yra jautrios drėgmei ir lengvai skyla.[23]

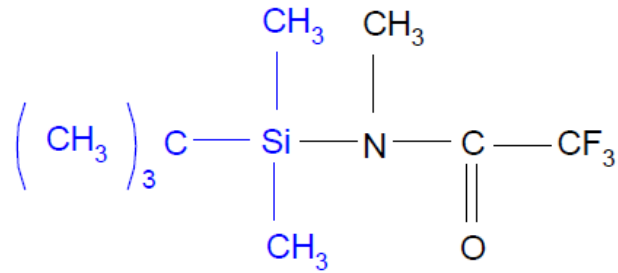
Amino rūgštims derivatizuoti taip pat dažnai renkamas BSTFA. Jo struktūrinė formulė pateikta 4 paveiksle.



5 Paveikslas. BSTFA (N,O-bis(trimetil-silil)-trifluoroacetamidas) derivatizarotiaus struktūrinė formulė [23].

Panaudojus šį derivatizatorių daugiausia derivatizuojami pirminiai aminai, mažiau antriniai [24]. Norint palengvinti reakciją kaip katalizatorius dažnai yra naudojamas trimetil-chlor-silanas [25].

Kitas dažnas silininimo atstovas yra MTBSTFA (N-metil-N-(tert-butildimetilsilyl)trifluoroacetamidas). Jo struktūrinė formulė pateikta 5 paveiksle. MTBSTFA pranašumas prieš BSTFA yra tas, jog jo derivatai yra daug atsparesni hidrolizei, nei BSTFA. Šis efektas yra pasiekiamas todėl, kad silil grupė yra apsaugoma didelėmis tert-butyl grupėmis.



6 Paveikslas. MTBSTFA (N-metil-N-(tert-butildimetilsilyl)trifluoroacetamidas) struktūrinė formulė [23].

Teoriškai pranašesnis derivatizacijos metodas yra acilinimas. Dažniausiai yra atliekamas panaudojant alkil-chloroformato reagentus [26]. Ši derivatizacija yra pranašesnė, nes nereikalauja sudėtingų sąlygų, kadangi derivatai yra atsparesni hidrolizei lyginant su silil derivatais. Esant tokiai savybei, derivatizaciją galima atlikti taip, kaip nurodo Norvegijoje atlikto tyrimo metodika [27]. Šio tyrimo metu mėginys buvo sumaišytas suderivatizatoriumi metilchloroformatu ir maišomas maišyklėje vieną minutę.

Likusios dvi derivatizacijos rūšys amino rūgštims nustatyti nėra naudojamos. Alkilinimas vyksta pakeičiant aktyvius vandenilius alkil grupėmis. Po reakcijos gaunami esteriai, eteriai, alkilaminai, alkilamidai. Chiralinė derivatizacija – derivatizacijos metodas, kai yra prijungiama prie specifinių grupių siekiant sudaryti diasteromerus, kurie turi skirtingas savybes lyginant su pradiniais junginiais.

3.9 Sėjamasis grikis (*Fagopyrum esculentum*)



7 paveikslas. Žydintis sėjamasis grikis ir jo sėklos [28].

Sėjamasis grikis (lot. *Fagopyrum esculentum*) priklauso rūgtinių šeimai (lot. *Polygonacea*). Vienmetis žolinis augalas. Remiantis FAOSTAT 2010 duomenimis Lietuva yra minima kaip viena iš daugiausiai grikius auginančių Europos šalių [29]. Dažniausiai sėjamasis grikis yra kultivuojamas maistinėms reikmėms ir dėl antioksidacinio poveikio [30]. Vaisiai - tribriauniai riešutėliai. Grikiai vaisiuose kaupia apie 12 proc. baltymų, 2,79 proc. riebalų, 48,74 proc. tirpių angliavandenių, 17,79 proc. skaidulų ir kitų medžiagų [31]. Baltymai sudaro gana didelę dalį sėklos. Atlikus mokslinius tyrimus ir sėkloje esančius baltymus hidrolizavus gauti amino rūgščių kiekiai yra šie: lizinas 7 proc., histidinas 3,1 proc., argininas 11,6 proc., asparto r. 12,1 proc., serinas 5,2 proc., glutamo r. 19,4 proc., prolinas 4,3 proc., glicinas 6,5 proc., alaninas 4,7 proc., valinas 5,4 proc., metioninas 3proc., izoleucinas 4proc., leucinas 6,6 proc [32]. Tačiau sėklų sudėtis priklauso nuo augimo sąlygų ir augimo vietos.

3.10

Daržinis krokas (*Crocus sativus*)



8 paveikslas. Daržinis krokas [33]

Daržinis krokas (lot. *Crocus sativus*) priklauso vilkdalgių šeimai (lot. *Iridaceae*). Tai daugiametis žolinis augalas. Užauga iki 30 cm aukščio. Krokai neturi antžeminio stiebo. Lapai ilgi, linijiški išaugę kuokštais. Žiedai stambūs 3-6 cm skersmens. Gumbasvogūnis apie 3cm dydžio.

Natūraliai auga viduržiemio jūros regione. Lietuvoje paplitęs kaip dekoratyvinis augalas. Farmacijoje yra naudojamos purkos, dar kitaip vadinamos šafranu. Jos yra naudojamos kaip apetitą gerinanti priemonė.

3.11 Pluoštinė kanapė (*Cannabis sativa*)



9 paveikslas. Pluoštinė kanapė ir jos sėkla [34]

Pluoštinė kanapė (lot. *Cannabis sativa*) priklauso kanapinių šeimai (lot. *Cannabaceae*). Tai vienmetis augalas. Turi statų, šakotą stiebą. Užauga nuo 50 iki 180 cm aukščio. Ant stiebo išsidėstę priešiniai, ilgi, vagoti lapai su aštriais plaukuotais lapkočiais. Pastarieji yra lancetiški, giliai pirštiškai suskaldyti su pleištišku pagrindu ir dantytais kraštais. Žiedai yra kuokeliniai, susitelkę į ilgus šluotelinius žiedynus. Žiedynų apyžiedis sudarytas iš penkių balsvai žalios spalvos bukų lapelių. Paplitusi visame pasaulyje. Daugiausiai auginama Indijoje, Jamaikoje, Kazakstane. Naudojama maistui ir gaunama tvirto puošto, kadangi turi daug celiuliozės. Vaisius - pilkos spalvos riešutėlis. Atlikus tyrimus buvo nustatyta, jog 24,8 proc sėklos svorio sudaro baltymai, o iš jų 1,28 % alanino; 3,10% arginino; 2,78% apsarto r.; 4,75% glutamo r.; 1,14% glicino; 0,71% histidino; 0,98 proc. izoleucino; 1,72 proc. leucino; 1,03 proc. lizino; 0,58 proc. metionino; 1,17 proc. fenilalanino; 1,15 proc. prolino; 1,27 proc. serino; 0,88 proc. treonino; 1,14 proc. triptofano ir 1,28 proc. valino [35].

4 TYRIMO OBJEKTAS IR METODIKA

4.1 Tyrimo objektas

Nelukštentos, ekologiškai augintos grikių sėklos (Vokės filialas). Šioms sėklos nebuvo naudojamos trąšos ar kitos augimą pagreitinančios ar palengvinančios medžiagos. Žaliava surinkta 2014 metais.

Nelukštentos, intensyviai augintos grikių sėklos. (Vokės filialas). Šiems grikiams buvo naudojamos mineralinės azoto, fosforo ir kalio trąšos. Surinkta žaliava išdžiovinta sausoje, atokiai nuo saulės spindulių esančioje patalpoje, ne aukštesnėje nei 50 °C temperatūroje. Žaliava surinkta 2014 metais.

Krokų gumbai (Ukraina). Žaliava surinkta 2017 metais, išdžiovinta sausoje, gerai vėdinamoje vietoje. Supakuota į popierinius maišelius, saugoma ir laikoma tamsioje ir vėsioje vietoje.

Pluoštinės kanapės sėklos ARG B4 Futūra, 75 Rokiškio r., Panemunėlio m.

Medžiagos

Distiliuotas vanduo, acetonitrilas (99.99%) (Sigma – Aldrich, Vokietija), MTBSTFA derivatizatorius (>97%) (Sigma – Aldrich, Vokietija), aminorūgščių standartų mišinys (2,5 μmol/ml kiekvienos AR) (Sigma-Aldrich, Vokietija).

Įranga

Analizei naudojama dujų chromatografinė sistema Shimadzu GC-2010 plus (Shimadzu Corporation, Japonija), su masių spektrometrijos detektoriumi. Atskyrimui naudojama spausto silikagelio kolonėlė (Rxi®-5ms), 30m ilgio ir 0,25 mm vidinio skersmens, 0,25μm nejudančios fazės sluoksnio storio Nešančios dujos - helis. Analitinės svarstyklės Shimadzu Auw 120 D(Duisburgas, Vokietija), ultragarso vonelė „WiseClean“.

4.2 Dujų chromatografijos metodika

Tiriamąojo tirpalo ruošimas

1g augalinės žaliavos yra atsveriama analizinėmis svarstyklėmis, užpilama metanoliumi iki 10ml ribos. Mėginys 10 min įdedamas į ultragarso vonelę. Gautas tirpalas nucentrifuguojamas, atskiriama skysta fazė ir iš jos paimama 100 μl mėginio. Mėginys visiškai išgarinamas po azoto dujų srove iki sauso likučio. Gautos nuosėdos užpilamos 100 μl acetonitrilo ir 100 μl MTBSTFA derivatizatoriaus. Šis tirpalas kaitinamas 100 °C temperatūroje 2,5 valandos, glicerolio vonioje. Po to 1 μl tiriamojo mėginio injekuojama į dujų chromatografą.

Etaloninio tirpalo ruošimas:

Amino rūgščių standartų mišinio paimama 100μL ir išdžiovinama po azoto srove iki sauso likučio. Tuomet sausos nuosėdos užpilamos 100 μL acetonitrilo ir 100μL MTBSTFA derivatizatoriaus. Gautas tirpalas kaitinamas 100 laipsnių temperatūroje glicerolio vonioje 2,5 valandos.

Tyrimo metodika

Kolonėlė (Rxi®-5ms), 30m ilgio ir 0,25μm skersmens, su 0,25μm nejudančios fazės sluoksnio storiumi. Kolonėlės temperatūra 75 °C. Tekėjimo kolonėlė greitis: 1,5ml/min, slėgis 100,0 kPa, bendras tekėjimo greitis: 34,4 ml/min. Metodas atliekamas per 41 min. Temperatūra kolonėlėje buvo užprogramuota: pradinė kolonėlės temperatūra 75 °C išlaikant pastovę 5 min, po to didinant 10°C/min ir keliami iki 290 °C, laikoma pastovi 5 min, toliau temperatūra keliami kas 20°C/min iki 320°C ir laikoma pastovi 5 min. Mėginiai injekuoti, taikant srauto dalinimą santykiu 1:10. Injekcijos tūris 1 μl. Injekavimo temperatūra 260 °C. Tyrimai kartoti po 3 kartus tarp jų paleidžiant metodiką vien su tirpikliu – acetonitrilu, siekiant išvalyti kolonėlę.

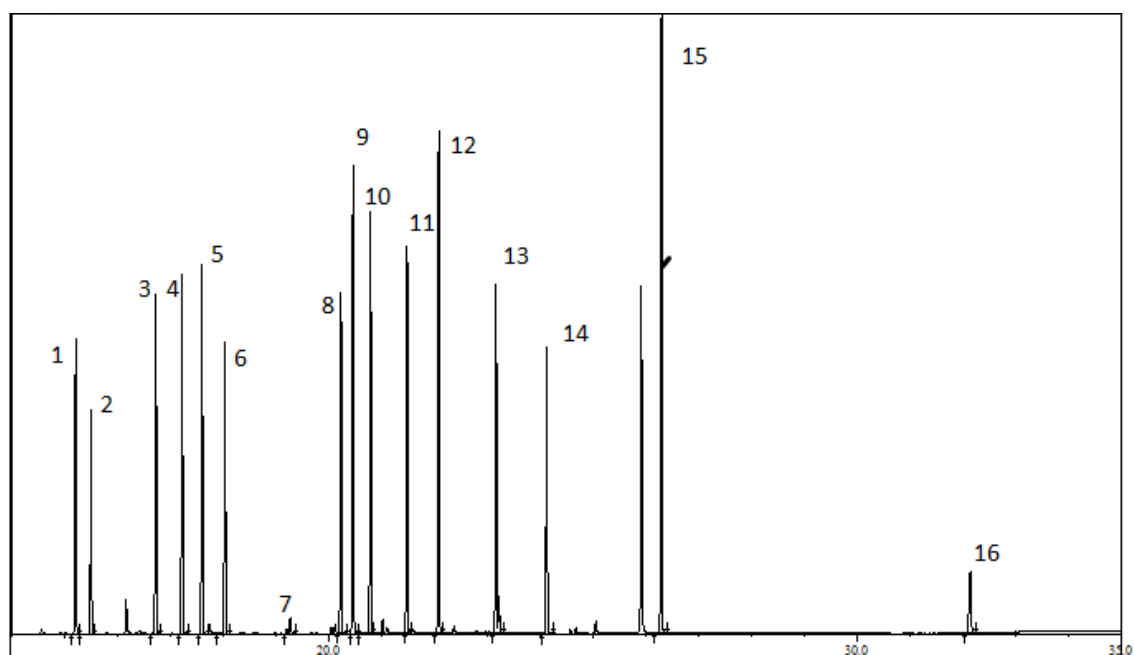
5. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

5.1 Amino rūgščių kokybinis nustatymas

Pirmiausia buvo siekiama išsiaiškinti, kokį derivatizatorių pasirinkti tyrimams. Pirmas bandytas buvo BSTFA. Kaip tiriamasis mėginys buvo naudotas amino rūgščių standartų mišinys. Mėginiai paruošti paimant 100 µl standartų mišinio, įpilant į talpas ir išdžiovinant iki sauso likučio po azoto srove, kadangi derivatizatorius gali skilti tuo atveju, jei atsiranda drėgmės. Tuomet įpilama 100 µl BSTFA derivatizatoriaus ir 100 µl acetonitrilo. Toliau talpos buvo sandariai uždaromos ir kaitinamos 103 °C glicerolio vonelėje 2,5 valandos. Amino rūgštys identifikuotos remiantis duomenų baze ir pagal sulaikymo laiką. Atlikus tyrimą negauta norimų rezultatų, nebuvo rasta amino rūgščių.

Kaip kitas pasirinkimas buvo išbandytas MTBSTFA. Tiriamasis mėginiui paruošti buvo naudotas amino rūgščių standartų mišinys. Paruošta buvo taip pat kaip ir su pirmuoju derivatizatoriumi. Atlikus tyrimus, buvo rasta septyniolika amino rūgščių: alaninas (sulaikymo laikas 15,227 sek), glicinas (15,51 sek), valinas (16,74 sek), leucinas (17,241 sek), izoleucinas (17,621 sek), prolinas (18,054 sek.), metioninas (20,250 sek), serinas (20,478 sek), treoninas (20,810 sek), fenilalaninas (21,501 sek), apsrto r. (22,103 sek), glutamo r. (23,186 sek) lizinas (24,145 sek), histidinas (25,936 sek), tirozinas (26,317 sek), cisteinas(32,526 sek).

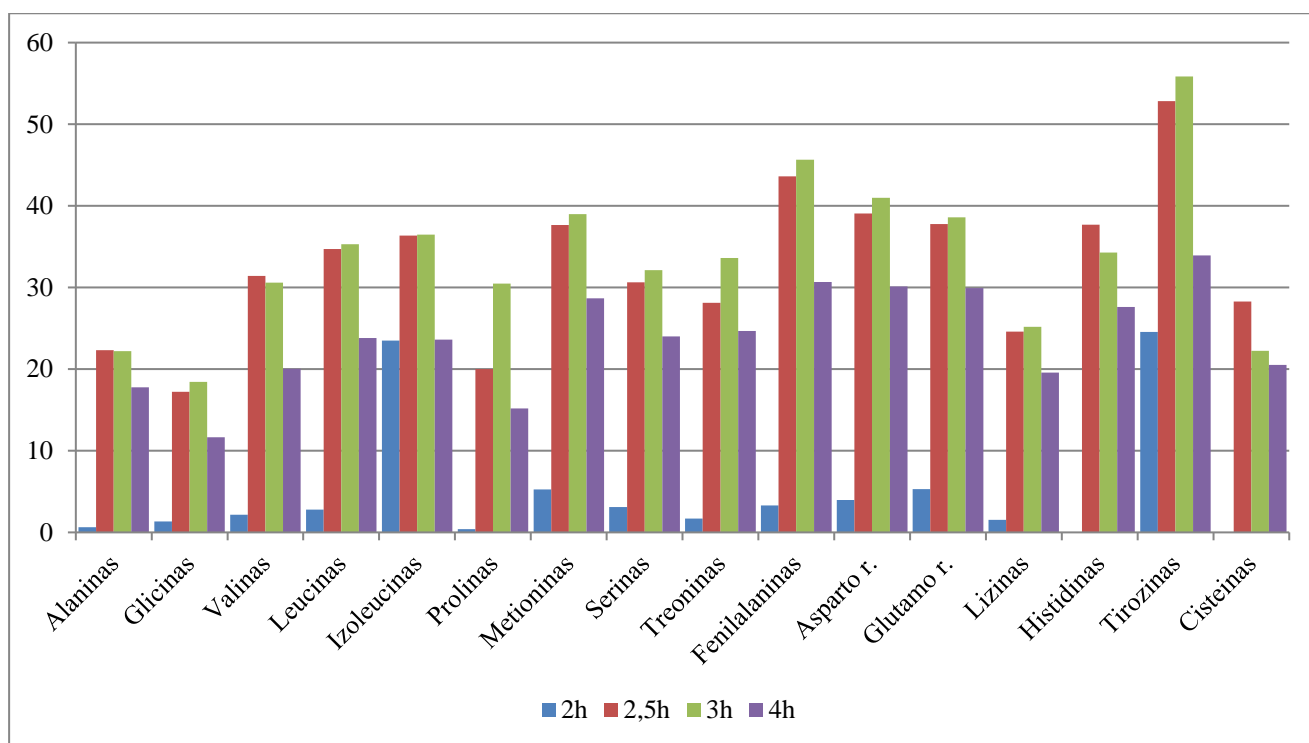
Chromatograma matoma 6 paveiksle.



11 Paveikslas. Amino rūgščių standartų chromatograma. 1 – alaninas, 2 – glicinas, 3 – valinas, 4 – leucinas, 5 – izoleucinas, 6 – prolinas, 7 – metioninas, 8 – serinas, 9 – treoninas, 10 – fenilalaninas, 11 – apsrto rūgštis, 12 – glutamo rūgštis, 13 – lizinas r., 14 – histidinas, 15- tirozinas, 16 - cisteinas

Atsižvelgiant į gautus rezultatus ir juos apibendrinant galima pateikti išvadą, jog MTBSTFA yra tinkamesnis derivatizatorius nei BSTFA, nes naudojant šį metodą buvo nustatyta daugiau amino rūgščių.

Kitas etapas buvo tirta laiko priklausomybė. Buvo bandyta 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 valandos. Kaitinimas pagreitina derivatizacijos reakciją, todėl galima mėginius tirti jau po kaitinimo. 7 paveiksle pateikiamas 2,5, 3 ir 4 valandų chromatogramos.



12 paveikslas. Amino rūgščių standartai su derivatizacijos reagentu kaitinti 2,5; 3; 4 valandas. (mkg/ml)

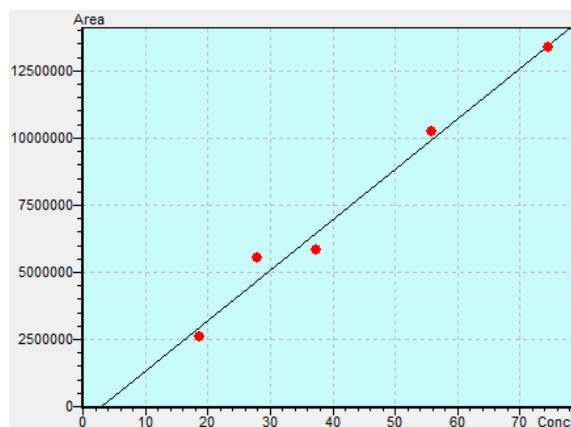
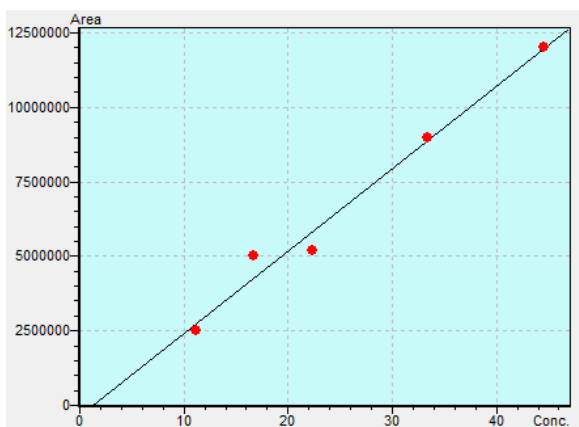
Atlikti tyrimai parodė, jog didžiausi kiekiai gaunami kaitinant 3 valandas, tačiau atlikus statistinę analizę nenustatyta reikšmingo skirtumo tarp 2,5 ir 3 valandų kaitimo, todėl siekiant optimizuoti sąlygas pasirinkta 2,5 valandos kaitinimo. Tokie rezultatai gauti todėl, kad derivatizacijos reakcijos įvyksta ne iš karto. Kaitinant ilgiau amino rūgščių kiekiai pradeda mažėti. Manoma, jog taip įvyksta, nes karštyje skyla susidarę amino rūgščių derivatai.

Statistiškai palyginus rezultatus gauta išvada, jog nėra reikšmingų skirtumų tarp 2,5 ir 3 h, išskyrus šioms amino rūgštims: prolinui, treoninui, fenilalaninui, tirozinui. Todėl siekiant optimizuoti sąlygas buvo pasirinkta kaitinti 2,5 valandos.

5.2 Amino rūgščių kiekybinis nustatymas

Amino rūgštys buvo identifikuotos pagal amino rūgščių standartų kalibracinių grafikų tiesinės regresijos lygtį. Ši lygtis yra sudaroma pagaminant skirtingų koncentracijų standartų tirpalus. Tirpalų koncentracijos buvo 25, 50, 75, 100, 150, 200 proc. standartinio tirpalo. Tirpalai buvo paruošti kaip etaloniniai tirpalai.

Kartu buvo ir nustatomas tiesiškumas, kuris parodo gebėjimą gauti detektoriaus atsako įverčius chromatogramose, kurie tiesiogiai proporcingi analitės kiekiui koncentracijai mėginyje. Kalibraciniai grafikai alaninui ir metioninui pateikti 8 paveiksle.



13 paveikslas. Alanino ir metionino kalibraciniai grafikai.

Buvo įvertinti koreliacijos koeficientai (R^2) alaninui (0,99); glicinui ir cisteinui (0,98); valinui, leucinui, izoleucinui, metioninui, prolinui, serinui, tirozinui, fenilalaninui, apsarto ir gliutamo rūgštims, lizinui, histidinui, treoninui – (0,99). Kadangi koreliacijos koeficientas yra artimas vienetui, tai galima daryti išvadą, jog amino rūgščių kiekiai yra nustatyti tiksliai. Šis koeficientas neturėtų būti žemesnis nei 0,98.

5.3 Amino rūgščių nustatimo metodikos validacija

Validuojant metodiką buvo atlikti šie tyrimai:

- tarpinis preciziškumas;
- rezultatų atkartojamumas;
- minimali nustatoma koncentracija (LoD);
- minimali kiekybinio nustatymo koncentracija (LOQ).

5.3.1 Tarpinis preciziškumas

Tarpinis preciziškumas skaičiuojamas kelias dienas atliktų to paties bandinio analizių rezultatų. Tinkamumas įvertinamas variacijos koeficientu, kuris nėra tiksliai apibrėžtas, tačiau kiekybiniam metodui neturėtų viršyti 10 proc.

Tarpinio preciziškumo vertinimui buvo atlikta aštuoniolika to paties mėginio injekcijų per šešias dienas. Gauti rezultatai pateikiami 1 lentelėje:

1 lentelė. Tirpalų komponentų santykiniai standartiniai nuokrypiai

Amino r.	SSN sulaikymo laikui (proc.)
Alaninas	0,01
Glicinas	0,01
Valinas	0,009
Leucinas	0,01
Izoleucinas	0,008
Prolinas	0,01
Metioninas	0,008
Serinas	0,008
Treoninas	0,01
Fenilalaninas	0,009
Asparto r.	0,01
Glutamo r	0,009
Lizinas	0,01
Tirozinas	0,04
Cisteinas	0,01

Kaip matoma iš lentelės, SNN sulaikymo laikui daugumos komponentų santykiniai standartiniai nuokrypiai buvo 0,01 ar mažiau. Išsiskyrė tik tirozinas, kurio santykinė standartinė paklaida buvo 0,04.

Apibendrinant rezultatus, gautus apskaičiuotus amino rūgščių standartines santykinės paklaidas, įrodyta, jog jos neviršija rekomenduojamos 5 proc. ribos, todėl galima teigti, jog metodo tarpinis preciziškumas yra tinkamas.

5.3.2 Rezultatų pakartojamumas

Pakartojamumas parodo analizės pakartojimų tikslumą tomis pačiomis veikimo sąlygomis per trumpą laiko tarpą. Jis skaičiuojamas iš tą pačią dieną viena po kitos atliktų analizių rezultatų. Gali būti skaičiuojama iš mažiausiai šešių analizės pakartojimų naudojant 100 proc. tiriamąjį tirpalą. Rezultatai pateikiami santykiniu standartiniu nuokrypiu. Rezultatai pateikiami 2 lentelėje

2 Lentelė Tiriamų amino rūgščių pakartojamumo santykiniai standartiniai nuokrypiai

Amino r.	SSN sulaikymo laikui (proc.)
Alaninas	0,01
Glicinas	0,01
Valinas	0,009
Leucinas	0,01
Izoleucinas	0,008
Prolinas	0,01
Metioninas	0,008
Serinas	0,008
Treoninas	0,01
Fenilalaninas	0,009
Asparto r.	0,01
Glutamo r	0,009
Lizinas	0,01
Tirozinas	0,04
Cisteinas	0,01

Kaip matoma iš lentelės, SNN sulaikymo laikui daugumos komponentų 0,01 ar mažiau. Išsiskyrė tik tirozinas, kurio santykinė standartinė paklaida buvo 0,04.

Apibendrinant rezultatus, gautus apskaičiavus visų amino rūgščių nustatymo standartines santykinės paklaidas, įrodyta, jog jos neviršija rekomenduojamos 5 proc. ribos, todėl galima teigti, jog metodo pakartojamumas yra tinkamas ir remiantis šiuo aspektu metodas yra tinkamas amino rūgščių kiekybiniam nustatymui.

5.3.3 Minimali nustatoma koncentracija

Minimali nustatoma koncentracija - tai tokia koncentracija, kuria galima išskirti chromatogramos iš triukšmo ir identifikuoti gautą mėginį. Ji yra paskaičiuojama pagal formulę:

$$LoD = \frac{\frac{S}{n} * 3}{c}$$

S/N – atsako ir triukšmo santykis

C – mažiausia koncentracija, naudota sudarant kalibracinį grafiką.

Skaičiuojant minimalią nustatomą koncentraciją buvo naudota 20 proc. standartinio tirpalo koncentracija.

Minimali kiekybinio nustatymo koncentracija – tai mažiausia koncentracija, kuria galima ne tik identifikuoti junginį, bet ir nustatyti jo kiekį. Ši koncentracija yra apskaičiuojama pagal formulę:

$$LoQ = \frac{\frac{S}{n} * 10}{c}$$

S/N – atsako ir triukšmo santykis

C – mažiausia koncentracija, naudota sudarant kalibracinį grafiką.

Gauti skaičiavimų rezultatai yra pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Amino rūgščių mažiausia identifikavimo koncentracija ir mažiausia kiekybinio nustatymo koncentracija.

Amino r.	LoD	LoQ
Alaninas	0,720	2,400
Glicinas	0,656	2,185
Valinas	0,585	1,930
Leucinas	0,1257	0,459
Izoleucinas	0,125	0,491
Treoninas	0,370	1,234
Prolinas	0,184	0,213
Metioninas	0,132	0,440
Serinas	0,3745	0,482
Treoninas	0,308	0,362
Fenilalaninas	0,195	0,651
Asparto r.	0,34	0,144
Glutamo r.	0,53	1,76
Lizinas	0,104	0,348

Amino r.	LoD	LoC
Histidinas	0,546	0,511
Tirozinas	0,47	1,57

Remiantis visai atliktais bandymais ir skaičiavimais galima teigti, jog optimizuotas dujų chromatografijos metodas yra tinkamas amino rūgščių nustatymui augalinėje žaliavoje.

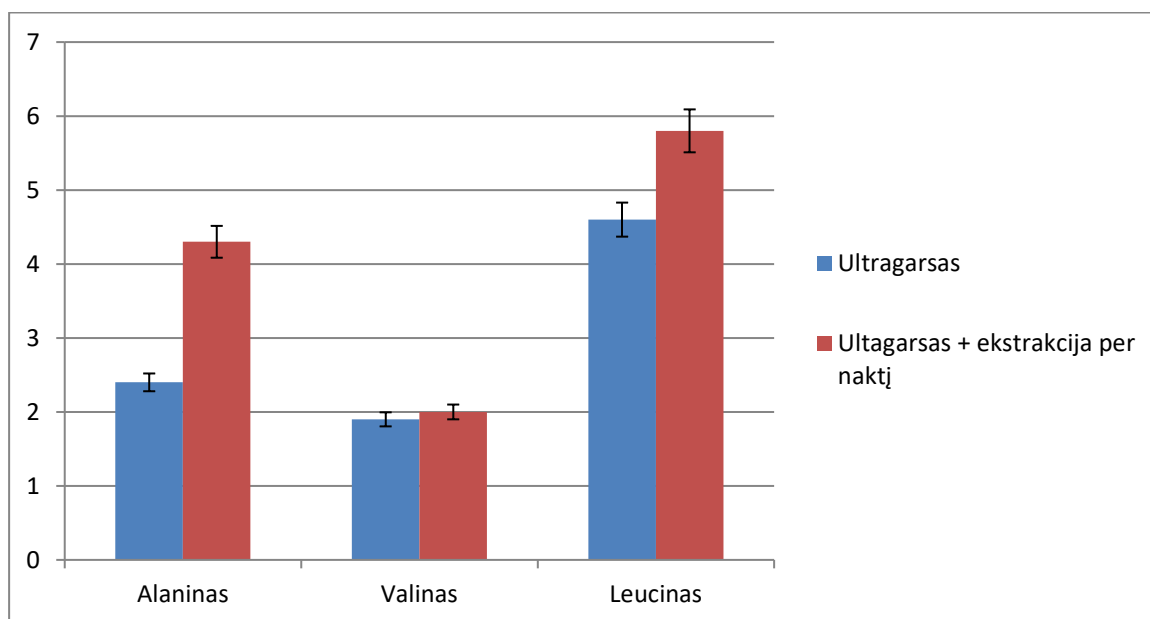
5.4 Amino rūgščių ekstrakcijos sąlygos

Siekiant nustatyti galimas ekstrakcijos sąlygas, o vėliau ir jas optimizuoti, pirmiausia buvo bandyta metodika, kuria gaminamos tinktūros. Augalinė žaliava atsveriamą, brinkinama dalyje tirpiklio (2 ml) išbrinkti, o vėliau supilamas likęs tirpiklis (8 ml) ir paliekama 24 valandoms. Gautas ekstraktas nucentrifuguojamas, atliekama derivatizacija ir vėliau ekstraktas analizuojamas. Atlikus šia metodika paruošto mėginio analizę chromatogramoje nebuvo nustatyta amino rūgščių.

Kitas galimas ekstrahavimo būdas naudojant ultragarsą. Žaliava atsveriamą, užpilama 10 ml etanolio ir 10 min. laikoma ultragarso vonelėje, atliekama derivatizacija ir analizė dujų chromatografijos metodu. Šis metodas pagrįstas sienelės suardymu ultragarse, todėl reikiami junginiai geriau pereina į tirpiklį. Šiuo ekstrakcijos metodu buvo nustatytos trys amino rūgštys: alaninas, valinas ir leucinas.

Dar vienas bandymas buvo sujungti iki tol darytus ekstrakcijos metodus ir papildomai palaikyti per naktį. Taip buvo ilgiau atliekama ekstrakcija, gaunami didesni amino rūgščių kiekiai. Atlikus ekstrakciją trečiuoju metodu buvo nustatyti didžiausi amino rūgščių kiekiai.

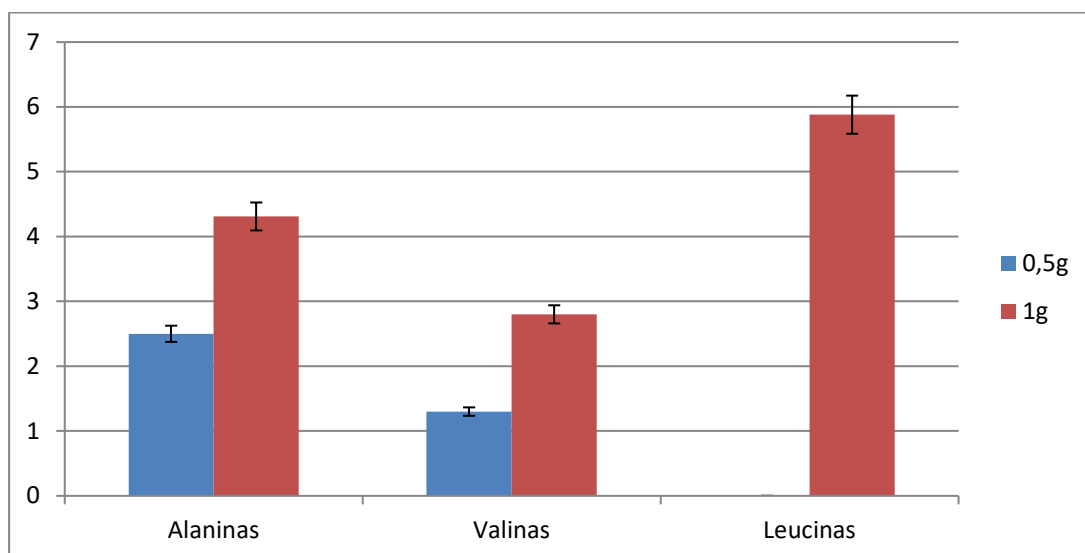
Tyrimų rezultatai pateikiami 1 lentelėje:



14 paveikslas. Ekstrakcijos metodų palyginimas.

Kaip matoma iš lentelės, didžiausi visų amino rūgščių kiekiai buvo nustatyti panaudojus trečiąją ekstrahavimo (metodiką: alaninas ($4,31 \pm 0,01$ mkg/ml), valinas ($2,08 \pm 0,005$ mkg/ml), leucinas ($5,88 \pm 0,02$ mkg/ml). Atsižvelgus į tai nutarta, jog geriausias ekstrakcijos metodas yra ekstrahuoti su metanolium, tuomet pritaikyti ultragarsą ir palaikyti per naktį. Rezultatuose yra nustatytas nedidelis amino rūgščių skaičius. Manoma, jog taip nutiko, nes nebuvo hidrolizuoti baltymai, o nustatomos tik laisvosios amino rūgštys. O taip pat šie griekiai buvo užauginti naudojant ekologinę žemdirbystę.

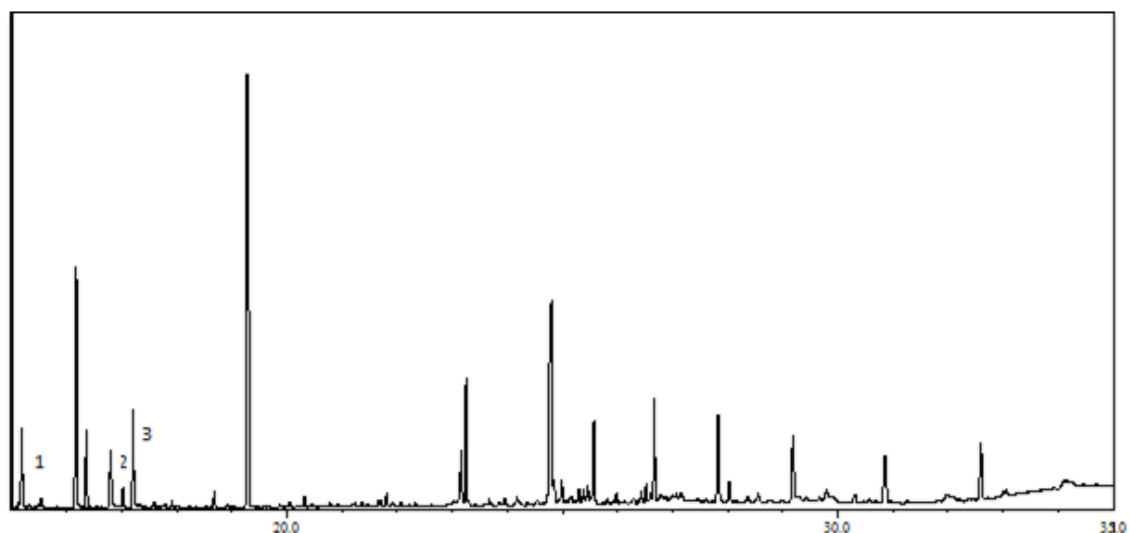
Kitas bandymas atliktas nustatant, koks augalinės žaliavos kiekis yra optimaliausias analizei. Bandymui buvo pasirinkta 0,5 ir 1 gramai žaliavos, atsižvelgiant į turėtą žaliavos kiekį. Mėginiai paruošti ekstrahuojant metanolium palaikant 10 min ultragarso vonelėje ir tuomet dar palaikoma parą. Didesni kiekiai amino rūgščių buvo nustatyti iš 1 g žaliavos. Rezultatai pateikiami 5 lentelėje



15 Paveikslas. Skirtingo žaliavos kiekio tyrimo rezultatai

Kaip matoma iš lentelės, didesni amino rūgščių kiekiai buvo nustatyti naudojant 1 g žaliavos: alaninas ($4,31 \pm 0,01$ mg/ml), valinas ($2,08 \pm 0,01$ mg/ml), Leucinas ($5,88 \pm 0,02$ mg/ml). Leucino pusėje gramo koncentracijoje nustatyta nebuvo.

Paskutinis pasirinktas tyrimas siekiant optimizuoti metodiką buvo tirpiklio nustatymas. Siekiant tai išsiaiškinti buvo bandyti keli tirpikliai, HCl ir metanolis. Mėginiai paruošti atsveriant 1 g žaliavos, ją sumalant, užpilant 10 ml metanolio, tuomet 15 min palaikant ultragarso vonelėje, nucentrifuguojant, tuomet pamatuojant 100 μ l ekstrakto ir perkeliant į chromatografinį buteliuką, išdžiovinant po azoto srove iki sauso likučio. Tuomet įpilama 100 μ l MTBSTFA derivatizatoriaus ir 100 μ l acetonitrilo. Paliekama kaitinti dvi su puse valandos. Atlikus analizę pastebėta, jog naudojant HCl kaip tirpiklį amino rūgščių nustatyta nebuvo. Gauti rezultatai naudojant metanolį pateikiami 7 paveiksle.



9 paveikslas. Chromatograma gauta atlikus grikių sėklų analizę, kaip ekstrahentą naudojant metanolį.

Kaip matoma iš chromatogramos, buvo nustatytos tik kelios amino rūgštys: alaninas, glicinas ir leucinas. Taip pat buvo rasta daug priemaišų. Manoma, jog taip įvyko dėl to, kad buvo nustatinėjamos tik laisvos amino rūgštys, o norint pilnai įvertinti aminorūgščių kiekius, reikia hidrolizuoti baltymus.

Apibendrinant rezultatus nustatyta, jog daugiausiai amino rūgščių ir didžiausias jų kiekis buvo nustatytas tiriant 1 gramą žaliavos, kaip ekstrahentą naudojant metanolį. Ekstrakcijos eiga: žaliava atsveriama, užpilama metanoliumi, tuomet 10 minučių paveikiama ultragarsu ir paliekama parą vykti ekstrakcijai. Tuomet 100 µl ekstrakto perkeliama į chromatografinį buteliuką, išgarinama iki sauso likučio, įpilama 100µl derivatizatoriaus ir 100µl acetonitrilo ir kaitinama 2,5 valandos kol vyksta derivatizacija.

5.5 Laisvų amino rūgščių nustatymas grikių sėklose

Nustatyta ekologiškai augintų grikių sėklų laisvų amino rūgščių sudėtis. Rezultatai pateikiami 6 lentelėje.

6 lentelė. Ekologiškai augintų grikių sėklų laisvų amino rūgščių sudėtis.

Amino rūgštis	Kiekis (mkg/ml)
Alaninas	4,31
Valinas	2,08
Leucinas	5,88

Iš galimų 16 amino rūgščių nustatytos buvo tik trys. Daugiausiai rasta leucino ($5,88 \pm 0,02$ mkg/ml), mažiausiai - valino ($2,08 \pm 0,01$ mkg/ml). Bendras visų nustatytų amino rūgščių kiekis buvo 12,2 mkg/ml. Tokiems rezultatams galėjo daryti įtaką tai, jog augalinė žaliava buvo auginta ekologiškai.

Panašios krypties mokslinių tyrimų, kuriuose būtų nustatinėjamas laisvų amino rūgščių kiekis naudojant dujų chromatografijos metodą atlikta nėra. Lyginant šio tyrimo rezultatus ir Lietuvos sveikatos mokslų universitete 2016 m. atlikto tyrimo rezultatus, kuriame tirtos Lietuvos agrarinių ir miško mokslų centro Vokės filialo bandymų centre surinktos grikių sėklos ir nustatinėjamos laisvos amino rūgštys, dabar atlikto tyrimo rezultatuose kiekiai buvo mažesni [33]. Šiame tyrime buvo atsveriami 0,5 g grikių sėklų, jos sumalamos, užpilamos 15 ml 60 % koncentracijos etanoliu. Tuomet ekstrahuojama 5 min ultragarso vonelėje. Vėliau ekstraktai dedami į centrifugą ir centrifuguojami 5 min. Gautas ekstraktas nupilamas. Tie patys žingsniai kartojami dar du kartus. Gauti ekstraktai nupilami į 10 ml kolbutes ir pripilama etanolio iki 10 ml ribos. Ekstrakto analizė atliekama efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Tyrime nurodoma, jog nustatyti alanino, valino ir leucino kiekiai atitinkamai buvo $18,76 \pm 1,97$ mkg/g, $10,14 \pm 1,06$ mkg/g ir $10,15 \pm 1,06$ mkg/g. Šie kiekiai atitinkamai 4,3; 4,8 ir 1,75 karto didesni už gautus šiame tyrime. Manoma, jog galėjo būti gauti mažesni kiekiai, nes skiriasi nustatymo metodai.

Taip pat buvo nustatytos laisvos amino rūgštys intensyviai augintų grikių sėklose. Rezultatai pateikiami 7 lentelėje:

7 lentelė Laisvų amino rūgščių sudėtis intensyviai augintuose grikių sėklose.

Amino rūgštis	Kiekis (mkg/ml)
Alaninas	1,938
Glicinas	1,352
Leucinas	0,988
Izoleucinas	3,402
Prolinas	13,277

Ekstrakte nustatytos penkios amino rūgštys iš galimų šešiolikos. Daugiausiai buvo surasta prolino ($13,277 \pm 1,09$ mkg/ml) mažiausiai - leucino ($0,988 \pm 0,05$ mkg/ml). Bendras surastų amino rūgščių kiekis - 20,975 mkg/ml. Tokiems rezultatams galėjo daryti įtaką tai, jog buvo nustatomos tik laisvos amino rūgštys. Norint nustatyti visas esamas amino rūgštis reiktų hidrolizuoti baltymus.

Lyginant rezultatus su Lietuvos sveikatos mokslų universitete atliktu tyrimu buvo nustatyta mažiau amino rūgščių. Penkios amino rūgštys nustatytos šiame tyrime, o atliktame LSMU surasta penkiolika amino rūgščių. Taip pat buvo ir mažesni surastų aminorūgščių kiekiai, išskyrus gliciną ir proliną, kurių kiekiai atitinkamai 3 ir 1,5 karto didesni nei nustatyta šio tyrimo metu. Likę junginiai – alaninas, leucinas ir izoleucinas, atitinkamai 1,9; 2,3; 3,49 karto mažiau. Tokius rezultatus galėjo nulemti tai, jog buvo naudotos skirtingos nustatymo metodikos - efektyvioji skysčių chromatografija ir dujų chromatografija.

5.6 Laisvų amino rūgščių nustatymas kroko gumbuose

Buvo nustatytos laisvos amino rūgštys kroko gumbuose. Rezultatai pateikiami 8 lentelėje.

8 lentelė. Laisvų amino rūgščių sudėtis kroko gumbuose.

Aminorūgštis	Kiekis (mkg/ml)
Alaninas	6,835
Glicinas	1,816
Valinas	2,183
Leucinas	3,131
Izoleucinas	0,419
Prolinas	55,171
Serinas	2,431
Treoninas	1,03
Fenilalaninas	0,584
Asparto rūgštis	0,662

Kroko gumbuose buvo nustatytos devynios amino rūgštys. Daugiausiai surasta prolino ($55,171 \pm 2,85$ mkg/ml) mažiausiai - izoleucino ir fenilalanino ($0,419 \pm 0,01$ mkg/ml). Bendras surastas amino rūgščių kiekis - 74,262 mkg/ml.

Panašios krypties mokslinių tyrimų, kuriuose būtų nustatytos laisvos aminorūgštys kroko gumbuose, rasti nepavyko.

5.7 Laisvų amino rūgščių nustatymas kanapių sėklose

Laisvos amino rūgštys buvo nustatytos ir kanapių sėklose. Mėginiai paruošti kaip tiriamieji tirpalai. Gauti rezultatai pateikiami 9 lentelėje.

9 Lentelė. Laisvų amino rūgščių kiekiai kanapių sėklose.

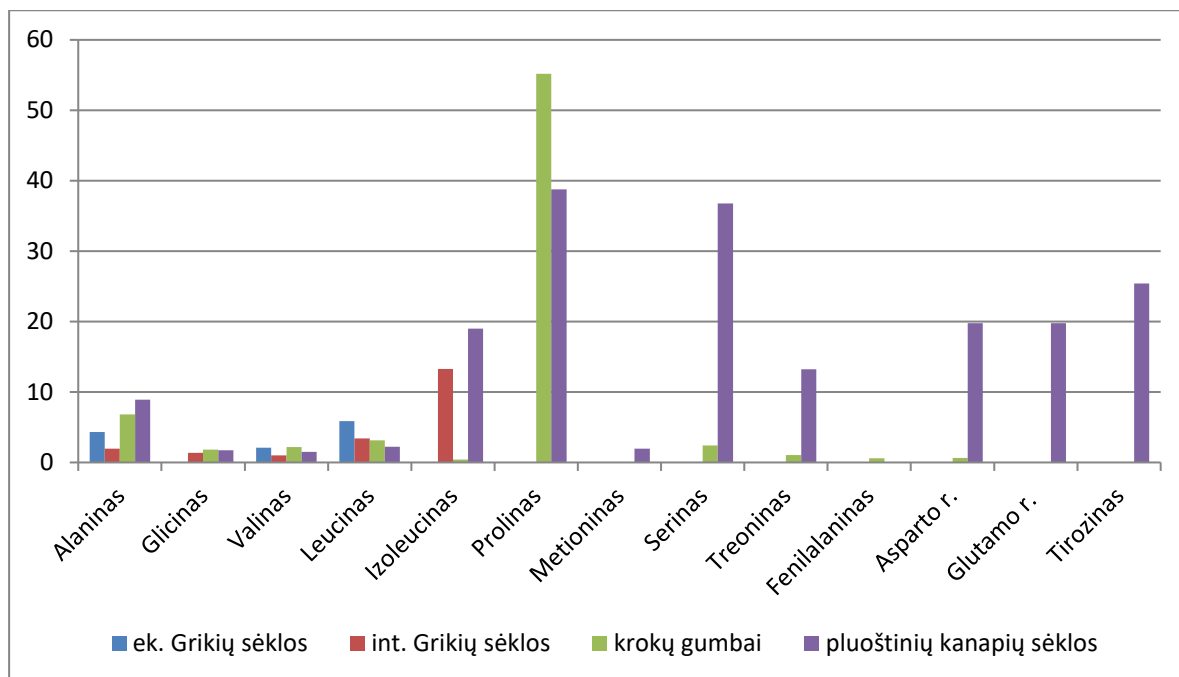
Amino rūgštis	Kiekis (mkg/ml)
Alaninas	8,906
Glicinas	1,724
Valinas	1,518
Leucinas	22,12
Izoleucinas	18,998
Prolinas	38,770
Metioninas	1,948
Serinas	36,759
Treoninas	13,299
Asparto r.	28,191
Glutamo r.	19,793
Tirozinas	25,392

Kanapių sėklose buvo nustatytos dvylika amino rūgščių iš galimų 16. Daugiausiai buvo nustatyta proline $38,770 \pm 2,24$ mkg/ml bei serino $36,759 \pm 2,02$ mkg/ml, o mažiausiai - glicino $1,724 \pm 0,05$ mkg/ml. Bendras nustatytų amino rūgščių kiekis - 197,51 mkg/ml.

Atliktų panašios krypties mokslinių tyrimų, naudojant dujų chromatografiją, rasti nepavyko.

5.8 Skirtingoje augalinėje žaliavoje esančių amino rūgščių kiekių palyginimas

Atlikus kokybinę amino rūgščių analizę sėjamojo griekio sėklose, daržinio kroko gumbuose ir pluošinės kanapės sėklose buvo nustatyta dvylika amino rūgščių: alaninas, glicinas, valinas, leucinas, izoleucinas, prolinas, metioninas, serinas, treoninas, asparto rūgštis, glutamo rūgštis. Taip pat buvo įvertintas šių junginių kiekybinis pasiskirstymas taip visų tirtų augalinių žaliavų. Sėjamųjų griekių augintų skirtingais metodais kiekių palyginimas pateikiamas 13 paveiksle.



16 paveikslas. Skirtingų laisvų amino rūgščių kiekiai skirtingose augalinėse žaliavose.

Kaip matome iš paveikslo daugiausiai jų buvo nustatyta pluoštinės kanapės sėklose – dvylika amino rūgščių. Šiose sėklose surasta tokių amino rūgščių kaip metioninas, apsarčio r., glutamo r. ir tirozinas, kurių kituose tirtuose preparatuose nerasta. Didžiausias bendras amino rūgščių kiekis taip pat nustatytas pluoštinių kanapių sėklose (197,51 mkg/ml). Mažiausias ekologiškai augintose grikių sėklose (12,2 mkg/ml). Skirtingų amino rūgščių didžiausi kiekiai skiriasi. Kanapių sėklos daugiau už kitus augalus kaupia alanino ($6,835 \pm 0,08$ mkg/ml), glicino ($1,724 \pm 0,03$ mkg/ml), isoleucino ($18,998 \pm 1,2$ mg/ml), serino ($36,759 \pm 2,02$ mkg/ml), treonino ($13,299 \pm 0,92$ mkg/ml), apsarčio r. ($28,191 \pm 1,745$ mkg/ml), glutamo r. ($19,793 \pm 1,24$ mkg/ml), tirozino ($25,392 \pm 1,56$ mkg/ml).

Lyginant rezultatus gautus tiriant amino rūgščių kiekius skirtingai užaugintose grikių sėklose galima teigti, jog bendras amino rūgščių kiekis yra 1,7 karto didesnis intensyviai augintose grikių sėklose nei ekologiškose. Taip yra dėl to, jog buvo nustatytos papildomos dvi amino rūgštys, kurios nebuvo surastos ekologiškai augintose grikių sėklose.

6. IŠVADOS

1. Atlikus eksperimentus su derivatizatoriais nustatyta, jog tinkamiausias derivatizacijos reagentas yra MTBSTFA (N-metil-N-(tert-butildimetilsilyl)trifluoroacetamidas).
2. Optimaliausias ekstrakcijos sąlygos yra: tiriamas 1g augalinės žaliavos, ekstrakcija atliekama metanoliu. Ekstrahuojama ultragarsu ir paliekama 24valandoms.
3. Optimaliausios derivatizacijos sąlygos yra: ekstraktas kaitinamas kartu su derivatizatoriumi ir acetonitrilu 100°C temperatūroje glicerolio vonioje 2,5 h.
4. Didžiausias bendras amino rūgščių kiekis nustatytas pluoštinės kanapės sėklose (197,51mkg/ml). Mažiausias bendras amino rūgščių kiekis nustatytas ekologiškai augintose grikių sėklose (12,2 mkg/ml). Lyginant skirtingais metodais augintas grikių kultūras buvo nustatyti 1,7 karto didesni bendri amino rūgščių kiekiai intensyviai augintuose grikių sėklose.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Nustatyta, jog didžiausi laisvų amino rūgščių kiekiai yra pluoštinės kanapės sėklose. Į tai reikėtų atsižvelgti kultivuojant augalus amino rūgščių ekstraktų gamybai.
2. Buvo nustatytos tik laisvos amino rūgštys, norit sužinoti visas amino rūgštis, esančias augalinėje žaliavoje, reikėtų tolimesnių tyrimų siekiant hidrolizuoti baltymus ir juos nustatyti.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sobolevsky T, Revelsky A, Miller B, Oriedo V, Chernetsova E, Revelsky I. Comparison of silylation and esterification/acylation procedures in GC-MS analysis of amino acids. *Journal of Separation Science*. 2003;26(17):1474-1478.
2. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition [Internet]. Springer ink. 2009 [cited 11 December 2017]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-009-0269-0>
3. Meyer V. Practical high-performance liquid chromatography. Hoboken, N.J.: Wiley; 2013.
4. McNair H, Miller J, Settle F, Mcnair. Basic Gas Chromatography. Somerset: Wiley; 2011.
5. Szabados L, Savouré A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2010;15(2):89-97.
6. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon M, Feng L, Zhao G, Ryba N et al. An amino-acid taste receptor. *Nature*. 2002;416(6877):199-202.
7. Yoshimura T, Esak N. Amino acid racemases: Functions and mechanisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003;96(2):103-109.
8. Damodaran S, Parkin K, Fennema O. Fennema's Food Chemistry, Fourth Edition. Hoboken: CRC Press; 2007.
9. Sturm N. Amino Acids/Proteins: [Internet]. [Www2.csudh.edu](http://www2.csudh.edu). 2015 [cited 5 February 2018]. Available from: http://www2.csudh.edu/nsturm/CHE450/04_AminoAcidsProteins.htm
10. Pisarewicz K, Mora D, Pflueger F, Fields G, Marí F. Polypeptide Chains Containing γ -Hydroxyvaline. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(17):6207-6215.
11. Wang J, Chen L, Li P, Li X, Zhou H, Wang F et al. Gene Expression Is Altered in Piglet Small Intestine by Weaning and Dietary Glutamine Supplementation. *The Journal of Nutrition*. 2008;138(6):1025-1032.
12. Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zempleni J. Roles for nutrients in epigenetic events. *J Nutr Biochem*. 2005;16:74-7.
13. Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K. Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2007;7(3):467-477.
14. Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T. Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1992;582(1-2):41-48.

15. Kemp J. A., McKernan R. M. "NMDA receptor pathways as drug targets". *Nature Neuroscience*. **5** (11): 1039–1042. 2002. doi:10.1038/nn936
16. NEEDHAM T, Paruta A. Solubility of amino acids in pure solvent systems [Internet]. Fcfar.unesp.br. 1971 [cited 5 February 2018]. Available from: <http://www.fcfar.unesp.br/arquivos/486198.pdf>
17. Windelberg A. Automated Assay for the Determination of Methylmalonic Acid, Total Homocysteine, and Related Amino Acids in Human Serum or Plasma by Means of Methylchloroformate Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2005;51(11):2103-2109.
18. Glew R, Vanderjagt D, Lockett C, Grivetti L, Smith G, Pastuszyn A et al. Amino Acid, Fatty Acid, and Mineral Composition of 24 Indigenous Plants of Burkina Faso. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1997;10(3):205-217.
19. Nozal M, Bernal J, Toribio M, Diego J, Ruiz A. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2004;1047(1):137-146.
20. Neves H, Vasconcelos A. Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic—mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic—mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. 1987;392:249-258.
21. Bidlingmeyer B, Cohen S, Tarvin T. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1984;336(1):93-104.
22. Hušek P. Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *Journal of Chromatography A*. 1991;552:289-299.
23. . Villas-Bôas S, Smart K, Sivakumaran S, Lane G. Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS?. *Metabolites*. 2011;1(1):3-20.
24. . Orata F. *Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis*. INTECH Open Access Publisher; 2012.

25. Kataoka H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*. 1996;733(1-2):19-34.
26. Laura Nakovich Analysis of Biogenic Amines by GC/FID and GC/MS
27. Uglund H, Krogh M, Rasmussen K. Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997;701(1):29-38.
28. Grikiš [Internet]. nesergu.lt. 2016 [cited 14 March 2018]. Available from: <http://nesergu.lt/grikiš/>
29. Cite a Website - Cite This For Me [Internet]. Globalsciencebooks.info. 2018 [cited 13 February 2018]. Available from: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/EJPSB_4\(SI1\)/EJPSB_4\(SI1\)57-63o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/EJPSB_4(SI1)/EJPSB_4(SI1)57-63o.pdf)
30. Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S. Buckwheat—the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*. 2002;35(2-3):207-211.
31. Eggum B, Kreft I, Javornik B. Chemical composition and protein quality of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*. 1981;30(3-4):175-179
32. Pomeranz Y, Robbins G. Amino acid composition of buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1972;20(2):270-274.
33. Crocus - Howling Pixel [Internet]. Howlingpixel.com. 2018. Available from: <https://howlingpixel.com/wiki/Crocus>
34. Sėjamoji kanapė [Internet]. Lt.wikipedia.org. 2018. Available from: https://lt.wikipedia.org/wiki/S%C4%97jamoji_kanap%C4%97#/media/File:Cannabis_sativa_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-026.jpg
35. Callaway J. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 2004;140(1-2):65-72

9. MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO REZULTATŲ MOKSLINĖ SKLAIDA

Tarptautinėje konferencijoje „Mokslas ir praktika“ 2017 pristatytos tezės: Gaivenis M., Marksa M., Marksienė R., Ivanauskas L. Laisvų amino rūgščių nustatymas dujų chromatografijos metodu augalinėje žaliavoje. 2017 gruodžio 15 d., Kaunas (Lietuva). Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas (žr. priedą).

10. PRIEDAI

1. Tarptautinės farmacijos „Mokslas ir praktika“ konferencijos dalyvavimo sertifikatas.

