

ALICJA ŻEGOTA, HENRYK ŻEGOTA

## **CHROMATOGRAFICZNY ROZDZIAŁ IZOMERÓW TYROZYNY. O-TYROZYNA JAKO PRODUKT RADIACYJNEJ HYDROKSYLACJI FENYLOALANINY I WSKAŹNIK NAPROMIENIOWANIA ŻYWNOŚCI**

### Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad zastosowaniem chromatografii cieczowej do rozdziału izomerów o-, m- i p-tyrozyny oraz fenyloalaniny. Ponieważ o-tyrozyna, podobnie jak m-tyrozyna powstaje jako produkt radiolizy fenyloalaniny, a w produktach naturalnych praktycznie nie występuje, jej obecność może być wskaźnikiem napromieniowania żywności, przede wszystkim produktów zawierających białka. Wyznaczono wydajność tworzenia izomerów tyrozyny w napromieniowanych roztworach fenyloalaniny. Stężenie izomerów tyrozyny wzrasta ze wzrostem dawki promieniowania i dla 10 kGy tworzy się około 1,8 % o-tyrozyny, 1,4 % m-tyrozyny i 1,2% p-tyrozyny.

### Wprowadzenie

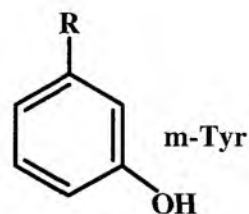
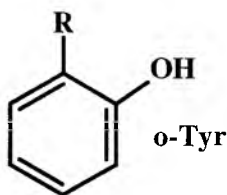
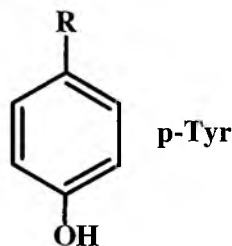
Napromieniowanie produktów spożywczych, podobnie jak ogrzewanie, jest metodą doprowadzenia określonej ilości energii potrzebnej do osiągnięcia założonego celu, np. przedłużenia okresu trwałości i poprawy jakości mikrobiologicznej. Wieloletnie badania nad wykorzystaniem promieniowania jonizującego do utrwalania żywności doprowadziły do akceptacji tej metody przez międzynarodowe organizacje: WHO, FAO i MAEA [7]. Aktualnie pozwolenia na napromieniowanie wydano w przypadku kilkudziesięciu produktów spożywczych w przeszło trzydziestu krajach. W Polsce pozwolenia bezterminowe obejmują napromieniowanie przypraw, ziół, cebuli, czosnku i suszonych warzyw [1]. Ponieważ w różnych krajach obowiązują inne regulacje dotyczące napromieniowania, stąd wystąpiła konieczność opracowania metod kontroli i detekcji, pozwalających stwierdzić, czy dany produkt był poddany obróbce radiacyjnej. Ważne jest to również ze względu na rozwijający się obrót międzynarodowy produktami żywnościowymi. Dopuszczona przez Komisję Kodeksu Żywno-

ściowego FAO/WHO maksymalna dawka promieniowania dla żywności wynosi 10 kGy (10 kJ/kg), a stosowane w praktyce dawki są często znacznie niższe, stąd zmiany chemiczne towarzyszące napromienianiu są trudne do wykrycia [8].

Dotychczas nie opracowano ogólnej metody pozwalającej na stwierdzenie, czy dany produkt był napromieniowany. Dla różnych produktów zaproponowano różne metody, bardziej lub mniej wiarygodne, a dalsze badania w tym kierunku prowadzone są w kilku krajach. Metody te można podzielić na:

- metody fizyczne obejmujące badania rodników metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (epr), pomiary zmian przewodnictwa, lepkości, termoluminescencji itp.,
- metody chemiczne obejmujące badania charakterystycznych zmian składników żywności takich jak tłuszcze, białka, czy kwasy nukleinowe,
- metody biologiczne obejmujące badania zmian mikroflory i jej cech morfologicznych.

Do grupy metod chemicznych należy metoda oparta na oznaczaniu obecności o-tyrozyny [2]. Metoda ta może być przydatna w badaniach produktów zawierających białka, szczególnie produktów mięsnych. o-Tyrozyna podobnie jak m-tyrozyna, w odróżnieniu od p-tyrozyny, bardzo rzadko występuje w produktach spożywczych. Natomiast w produktach napromieniowanych izomery te powstają jako produkty radiolizy fenyloalaniny w wyniku hydroksylacji pierścienia aromatycznego tego aminokwasu.



Do rozdziału i ilościowych oznaczeń izomerów tyrozyny mogą być wykorzystane różne metody analityczne, takie jak np. chromatografia gazowa w połączeniu z spektrometrią masową, która wymaga przeprowadzenia aminokwasów w pochodne np. trójmetylosililowe lub chromatografia cieczowa najczęściej z detekcją fluorescencyjną. Pierwsze doniesienia na temat oznaczania o-tyrozyny i wykorzystania jej do identyfikacji napromieniowanych produktów spożywczych zostały opublikowane przez Karama i Simica [2] oraz Meiera i wsp. [3]. Dalsze badania wykonane w różnych

ośrodkach [4, 5, 9] wykazały obecność *o*-tyrozyny w napromieniowanym mięsie drobiu, jednakże okazało się, że także inne czynniki oprócz dawki mają wpływ na wydajność jej powstawania.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie metody chromatograficznego rozdzielania izomerów tyrozyny jako produktów radiolizy fenyloalaniny, określenie wydajności tworzenia tych izomerów w wyniku radiolizy fenyloalaniny w aspekcie przydatności oznaczeń *o*-tyrozyny jako indykatora napromieniowania produktów spożywczych.

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowiły DL-fenyloalanina, *o*-, *m*- i *p*-tyrozyna firmy Sigma. Roztwory wodne fenyloalaniny o stężeniu  $10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  napromieniowano w źródle  $\text{Co}^{60}$  dawkami od 1 do 30 kGy, moc dawki wynosiła  $1,2 \text{ Gy s}^{-1}$ . Pomiaru dozymetryczne wykonano przy użyciu dozymetru Frickiego.

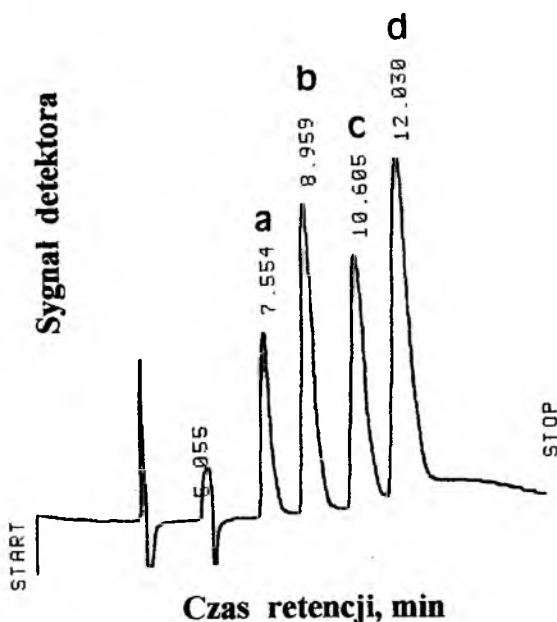
Badania nad doбором warunków chromatograficznego rozdzielania fenyloalaniny i izomerów tyrozyny prowadzono wykorzystując chromatograf cieczowy firmy Knauer wyposażony w kolumnę wypełnioną Spherisobem S ODS1,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4 \text{ mm}$ , detektor spektrofotometryczny ( $\lambda = 270 \text{ nm}$ ), połączony z integratorem firmy Hewlett Packard typ HP 3395. Jako eluent stosowany był wodny roztwór zawierający 2% etanolu i 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , szybkość przepływu  $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Objętość próbki nanoszonej na kolumnę wynosiła  $20 \mu\text{l}$ . Napromieniowane różnymi dawkami roztwory fenyloalaniny nanoszone były bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną.

Widma absorpcyjne roztworów wodnych izomerów tyrozyny o stężeniu  $2 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  rejestrowane były na spektrofotometrze firmy Hewlett Packard typ HP 8452A.

### **Wyniki badań**

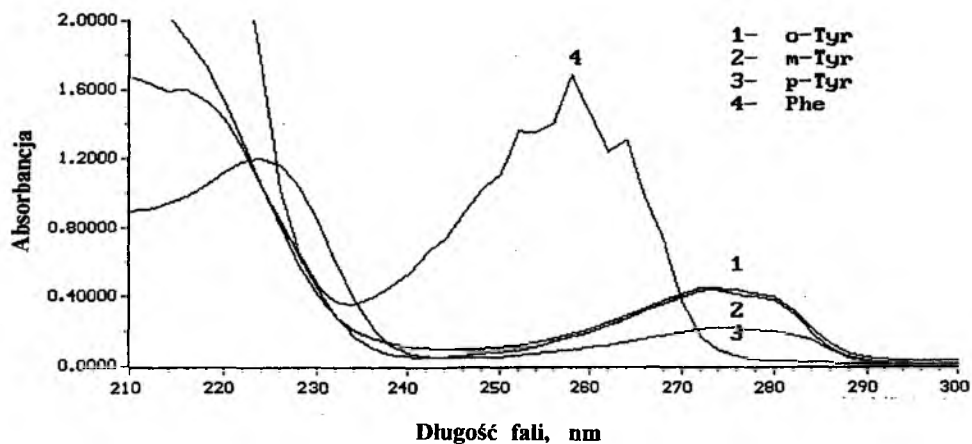
W badaniach wstępnych dotyczących chromatograficznego rozdzielania badanych aminokwasów stosowano różne kolumny analityczne i różne rodzaje eluentów. Najlepszy rozdział izomerów tyrozyny udało się osiągnąć stosując kolumnę wypełnioną Spherisorbem S ODS1, o średnicy wypełnienia  $5 \mu\text{m}$  i wymiarach  $250 \times 4 \text{ mm}$ . Jako eluent stosowano wodny roztwór zawierający 2% etanolu i 1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , przy szybkości przepływu wynoszącej  $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Uzyskany w tych warunkach rozdział badanych aminokwasów przedstawiono na rys. 1. Czasy retencji poszczególnych składników wynosiły odpowiednio dla *p*-Tyr – 7,8 min., *m*-Tyr – 9,3 min., *o*-Tyr – 11,1 min. oraz Phe – 12,6 min. Detekcję pików chromatograficznych prowadzono przy 270 nm, ponieważ w tym zakresie na widmach izomerów tyrozyny występuje maksimum ab-

sorpcji, natomiast absorpcja fenyloalaniny jest stosunkowo niewysoka (rys. 2). Umożliwia to analizę niewielkich ilości o- i m-tyrozyny w obecności znacznego nadmiaru fenyloalaniny i p-tyrozyny. Widma absorpcyjne w zakresie nadfioletu dla fenyloalaniny i izomerów tyrozyny przedstawiono na rys. 2. Wartości absorbancji przy 270 nm roztworów o stężeniu  $10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  wynosiły odpowiednio: o-Tyr – 0,410, m-Tyr – 0,394 i p-Tyr – 0,220. Izomery o- i m-tyrozyny mają bardzo podobne widma absorpcyjne, natomiast p-tyrozyna posiada dodatkowo maksimum absorpcji przy około 225 nm.

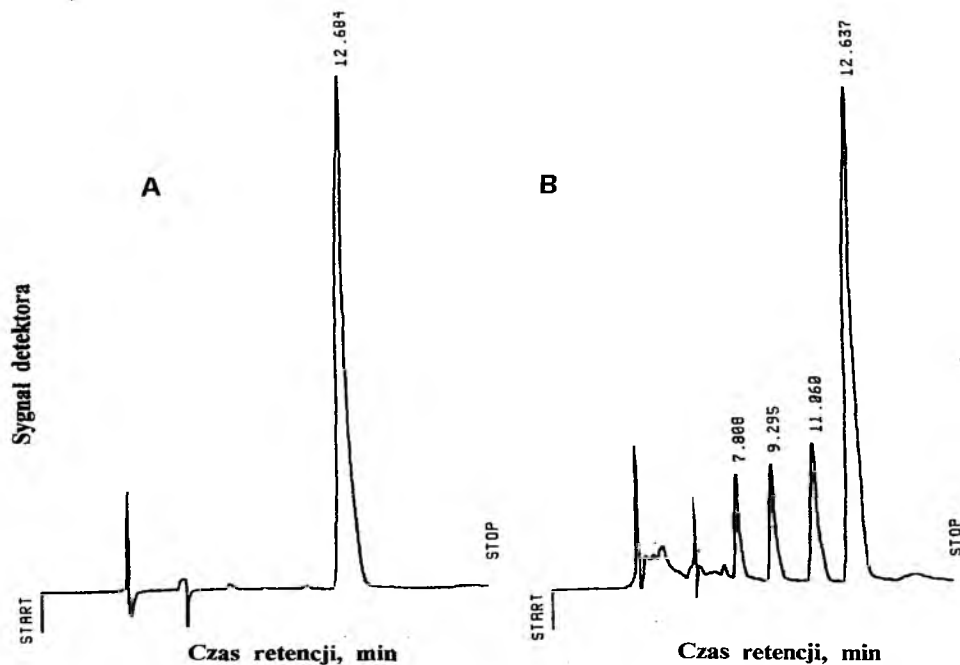


Rys. 1. Chromatogram HPLC wzorcowej mieszaniny p-tyrozyny (a), m-tyrozyny (b), o-tyrozyny (c) i fenyloalaniny (d).

Na rys. 3 przedstawiono chromatogramy fenyloalaniny (chromatogram A) i fenyloalaniny napromieniowanej w roztworze wodnym dawką 2 kGy (chromatogram B). Obecne na chromatogramie B piki o czasach retencji około 7,8 min., 9,3 min. i 11,0 min pochodzą odpowiednio od p-, m- i o-tyrozyny. Izomery te są produktami radiolizy fenyloalaniny.

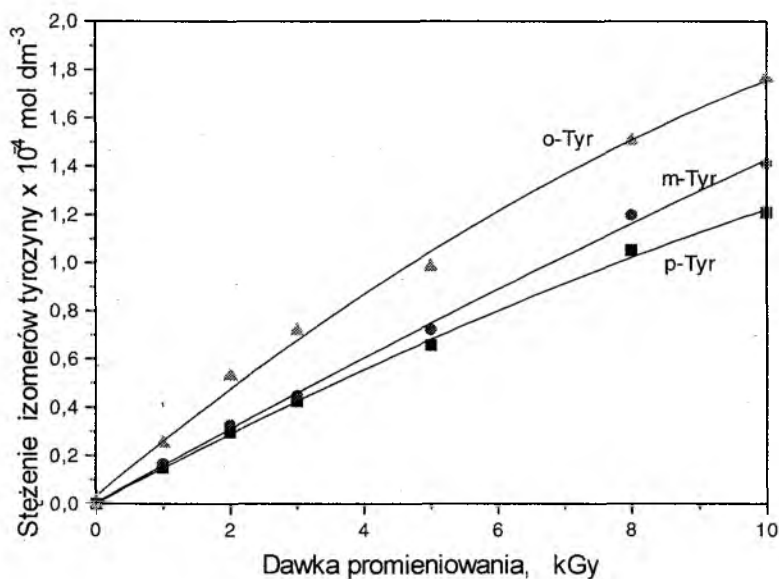


Rys. 2. Widma absorpcyjne o-, m- i p-tyrozyny oraz fenyloalaniny zarejestrowane dla roztworów wodnych o stężeniu  $2 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^3$ .



Rys. 3. Chromatogramy HPLC fenyloalaniny (A) i fenyloalaniny napromieniowanej dawką 2 kGy (B). Czasy retencji wynoszą odpowiednio dla p-tyrozyny – 7,8 min., dla m-tyrozyny – 9,3 min., dla o-tyrozyny – 11 min. i dla fenyloalaniny – 12,6 min.

Ilościowe wyniki oznaczeń izomerów tyrozyny powstających jako produkty radiolizy fenyloalaniny przedstawiono na rys. 4. Wydajność tworzenia izomerów tyrozyny wzrasta ze wzrostem dawki prawie prostoliniowo, pewne odchylenia od linii prostej występują w przypadku powyżej 5 kGy, występują wówczas reakcje wtórne prowadzące do rozkładu produktów pierwotnych w wyniku ich radiolizy. Stężenia produktów radiolizy fenyloalaniny wyznaczono w oparciu o krzywe skalowania wykonane dla poszczególnych izomerów przy użyciu substancji wzorcowych. Przy wyjściowym stężeniu fenyloalaniny wynoszącym  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  sumaryczna wydajność tworzenia izomerów *o*-, *m*- i *p*-tyrozyny w przypadku dawki 10 kGy wynosi około 4,4%.



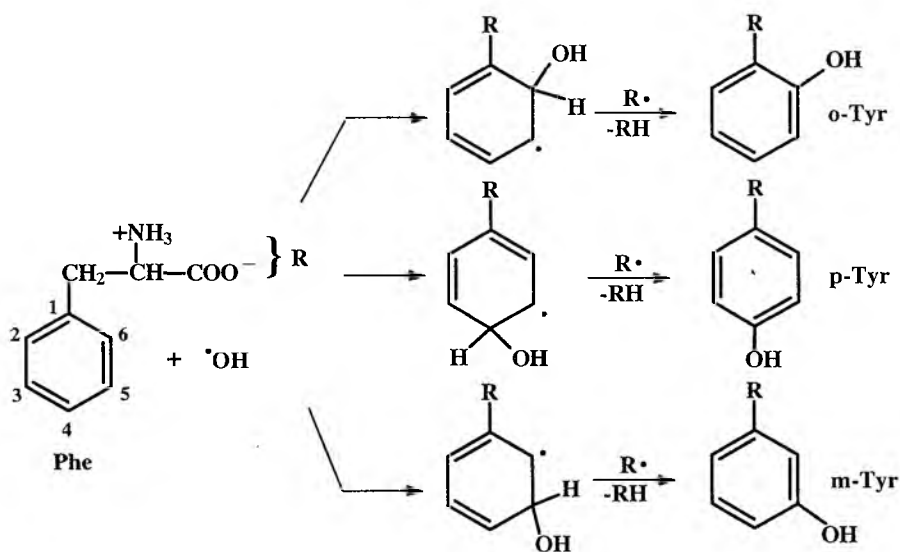
Rys. 4. Zależność stężenia izomerów tyrozyny powstających w czasie radiolizy wodnych roztworów fenyloalaniny ( $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) od dawki promieniowania.

## Dyskusja

Do rozdzielania aminokwasów najczęściej stosuje się chromatografię gazową lub chromatografię cieczową z wykorzystaniem kolumn jonowymiennych lub z odwróconymi fazami. W naszych badaniach do rozdzielania izomerów tyrozyny i fenyloalaniny zastosowaliśmy wysokosprawną chromatografię cieczową. Najlepszy rozdział uzyskaliśmy stosując kolumnę wypełnioną Spherisobem S ODS1,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4 \text{ mm}$ , pracującą w układzie izokratycznym. Fazę ruchomą stanowił wodny roztwór zawierający 2 %

etanolu i 1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Jest to układ zbliżony do układu zaproponowanego przez Meiera i wsp. [6]. Opracowaną metodę wykorzystaliśmy do badania wydajności tworzenia o-, m- i p-tyrozyny w czasie radiolizy wodnych roztworów fenyloalaniny w obecności powietrza.

Tyrozyna, czyli p-hydroksyfenyloalanina jest powszechnie występującym aminokwasem w produktach zawierających białka. Natomiast izomery o- i m-tyrozyny występują w tych produktach bardzo rzadko i to w śladowych ilościach. Izomery te jako produkty radiolizy fenyloalaniny powstają w wyniku hydroksylacji pierścienia aromatycznego tego aminokwasu, a schemat zachodzących reakcji przedstawiony jest na rys. 5.



Rys. 5. Schemat reakcji radiolizy fenyloalaniny w roztworach wodnych inicjowanych przez rodniki  $\cdot\text{OH}$  i prowadzących do utworzenia o-, m- i p-tyrozyny.

Inicjatorem reakcji prowadzących do utworzenia izomerów tyrozyny są rodniki hydroksylowe, będące produktami radiolizy wody. Wydajność tworzenia izomerów tyrozyny w czasie radiolizy fenyloalaniny, zależy nie tylko od dawki promieniowania, ale także od obecności w napromienianym roztworze tlenu lub innych utleniaczy np. jonów  $\text{Fe}^{3+}$  [6].

Wyniki przeprowadzonych przez nas badań wykazały, że w zakresie dawek promieniowania od 1 do 10 kGy o-tyrozyna tworzy się z najwyższą wydajnością, niższą wydajność tworzenia obserwowana była w przypadku m-tyrozyny, a najniższa p-tyrozyny. Stężenie izomerów tyrozyny wzrasta ze wzrostem dawki, jednakże dla da-

wiek wyższych od 5 kGy, występuje pewne odchylenie od prostoliniowej zależności wydajność/dawka. W roztworach fenyloalaniny o stężeniu  $10^{-2}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  napromieniowanych dawką 10 kGy około 4,4 % cząsteczek wyjściowego aminokwasu przekształca się do izomerów tyrozyny, w tym 1,8 % do o-tyrozyny, 1,4 % - do m-tyrozyny i 1,2 % – do p-tyrozyny.

Ponieważ białkowe produkty spożywcze, np. mięso, zawierają znaczne ilości wody, jej produkty radiolizy odgrywają istotną rolę w inicjowaniu reakcji rodnikowych w napromieniowanym produkcie. Stąd możliwość wykrywania specyficznych produktów radiolizy stwarza szansę wykorzystania tego typu oznaczeń do monitorowania napromieniowanych produktów spożywczych. Powstawnie o-tyrozyny w napromieniowanym mięsie drobiu zostało potwierdzone we wcześniejszych badaniach innych autorów [5]. Przydatność tej metody musi być jeszcze zweryfikowana w dalszych badaniach prowadzonych z wykorzystaniem białkowych produktów spożywczych.

## Wnioski

1. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano dobry rozdział izomerów o-, m- i p-tyrozyny oraz fenyloalaniny stosując kolumnę wypełnioną Spherisorbem S ODS1 5  $\mu\text{m}$  o wymiarach 250 x 4 mm. Jako eluent stosowano wodny roztwór zawierający 2% etanolu i 1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
2. Wydajność tworzenia o-tyrozyny w czasie radiolizy fenyloalaniny wzrasta proporcjonalnie ze wzrostem dawki promieniowania. Ponieważ izomer ten praktycznie nie występuje w produktach spożywczych, jego obecność może być potencjalnie indykatorem napromieniowania.

## LITERATURA

- [1] Fiszer W.: Radiacja żywności na świecie. Przem. Spoż., 5, 1996, 34.
- [2] Karam L.R., Simic M.G.: Detecting irradiated food: Use of hydroxyl radical biomarkers, *Analyt. Chem.*, 60, 1988, 1117.
- [3] Meier W., Bürgin R., Fröhlich D.: Nachweis von bestrahltem Frischfleisch mittels o- Tyrosin, *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, 80, 1989, 22.
- [4] Meier W.: Chemical methods for the detection of irradiated food, Report EUR 13331 EN, Potential new methods of detection of irradiated food, Rafii J.J., Beillard, J.J.(eds), Luxembourg, 1991, 194.
- [5] Pedersen C.T., Fulendorff R.: Mass spectrometry, a tool for the detection of irradiated foods. Report EUR 13331 EN, Potential new methods of detection of irradiated food. Rafii, J.J., Beillard J.J. (eds), Luxembourg, 1991, 213.
- [6] Wang D., von Sonntag, C.: Radiation induced oxidation of phenylalanine. Report EUR 13331 EN, Potential new methods of detection of irradiated food. Rafii, J.J., Beillard J.J. (eds), Luxembourg, 1991, 207.



- [7] WHO: Document on Food Irradiation Adopted on 16 Dec. 1988 by the FAO/IAEA/WHO/ITC-UNCTAD/GATT. Int. Conf. Acceptance, Control and Trade in Irradiated Food, Geneva, Switzerland, 12-16 December 1988.
- [8] WHO: Napromieniowanie żywności. Technika utrwalania i poprawy jakości zdrowotnej żywności. Genewa, 1988. Tłumaczenie Fiszer W., PWRL. Poznań, 1991, 42.
- [9] Zooler O., Schön D., Zimmerli B.: Determination of o-tyrosine in irradiated chicken. Report EUR 13331 EN, Potential new methods of detection of irradiated food. Rafii, J.J., Beillard J.J. (eds), Luxembourg, 1991, 217.

*Praca prezentowana na II Sesji Przeglądowej Analityki Żywności, Warszawa, 23.05.1997.*

### **CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF TYROSINE ISOMERS. O-TYROSINE AS A PRODUCT OF RADIATION-INDUCED HYDROXYLATION OF PHENYLALANINE AND AS AN INDICATOR OF FOOD IRRADIATION**

#### **S u m m a r y**

Tyrosine isomers and phenylalanine were separated by liquid chromatography (HPLC). Since o- and m-tyrosine are formed as products of radiation induced conversion of phenylalanine in an aqueous solutions, it was proposed to measure the level of these products as an indicator of irradiation of food products, particularly of those rich in proteins. The concentration of tyrosine isomers was found to increase with the increase of the radiation dose and for 10 kGy the level of o-tyrosine was equal to 1.8%. ❖