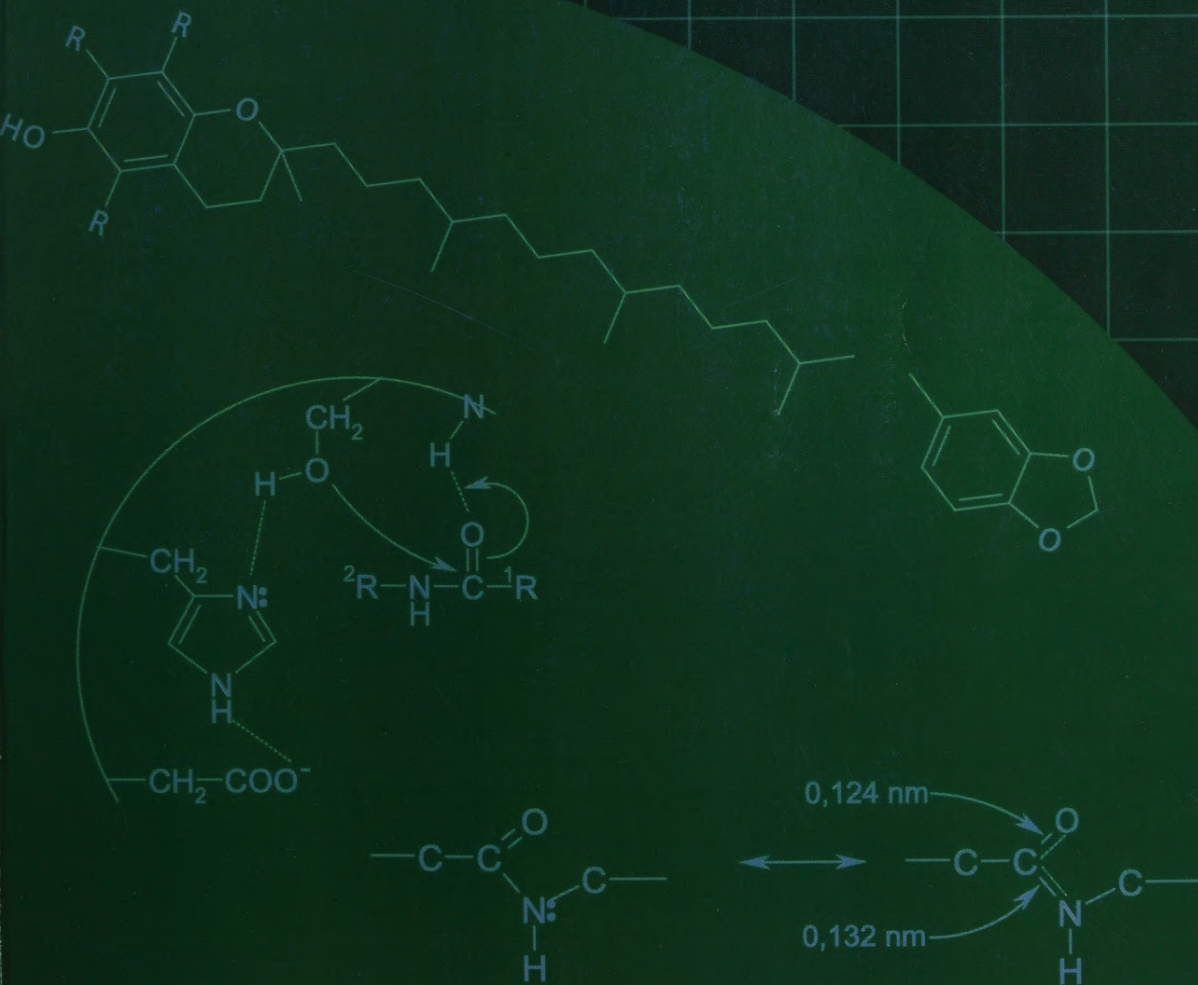


Andris Morozovs, Ida Jākobsone, Pēteris Mekšs

# Pārtikas ķīmija

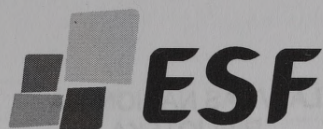


44716

0308104077

2008-6  
- 172

U4  
664



Andris Morozovs, Ida Jākobsone, Pēteris Mekšs

# Pārtikas ķīmija

Starpaugstskolu akadēmiskā maģistra studiju programma  
“UZTURZINĀTNE”

Mācību materiāls

LU Akadēmiskais apgāds

UDK 613.2:54(075.8)

Mo 627

LATVIJAS NACIONĀLĀ  
BIBLIOTĒKA

Morozovs, A., Jākobsone, I., Mekšs, P. *Pārtikas ķīmija*. Rīga : LU Akadēmiskais apgāds, 2008. 208 lpp.

Autori: Latvijas Lauksaimniecības universitātes profesors **Andris Morozovs**, Latvijas Universitātes asociētā profesore **Ida Jākobsone** un Latvijas Universitātes asociētais profesors **Pēteris Mekšs**

Mācību materiāls ir izstrādāts Eiropas Sociālā fonda līdzfinansēta projekta "Dabaszinātņu un tehnoloģiju ietilpīgo moduļu izstrāde Latvijas starpaugstskolu maģistra studiju programmai uzturzinātnē" ietvaros (projekta līguma Nr. 2005/0117/VPD1/ESF/PIAA/04/APK/3.2.3.2./0022/0063, līgums noslēgts starp Profesionālās izglītības attīstības aģentūru un Latvijas Universitāti ar īstenošanas laiku no 2005. gada 1. oktobra līdz 2008. gada 31. jūlijam). Projekta ietvaros tiek izstrādāti 16 mācību materiāli.

Zinātniskie redaktori:

Latvijas Lauksaimniecības universitātes profesors **Viesturs Kreicbergs**  
un Rīgas Tehniskās universitātes asociētā profesore **Ērika Bizdēna**

Literārā redaktore **Ieva Račko**

Maketu un vāka dizainu veidojis **Arnis Čakstiņš**

Pārpublicēšanas gadījumā nepieciešama Latvijas Universitātes atļauja.

Citējot atsauce uz izdevumu obligāta.

© Andris Morozovs, Ida Jākobsone, Pēteris Mekšs, 2008

© Latvijas Universitāte, 2008

ISBN 978-9984-825-82-3

# Saturs

Ievads .....	8
1. Aminoskābes un peptīdi .....	9
1.1. $\alpha$ -aminoskābes .....	9
1.2. Aminoskābju ķīmiskās īpašības .....	11
1.2.1. Aminoskābju skābes un bāzes īpašības .....	12
1.2.2. Karboksilgrupas reakcijas .....	14
1.2.3. Aminogrupas reakcijas .....	15
1.2.4. Aminoskābju oksidēšanās .....	15
1.2.5. Aminoskābju karboksilgrupas un aminogrupas kopējās reakcijas .....	16
1.3. Apkopojums .....	18
2. Proteīni .....	19
2.1. Proteīnu pirmējā struktūra .....	19
2.2. Proteīnu augstākās struktūras veidojošās ķīmiskās saites .....	20
2.2.1. Ūdeņraža saites proteīnu molekulās .....	20
2.2.2. Jonu saites .....	20
2.2.3. Hidrofobās saites starp nepolārām sāngrupām .....	20
2.2.4. Kovalentās disulfīdsaites .....	21
2.2.5. $\alpha$ -spirāle .....	21
2.2.6. $\beta$ -struktūra .....	21
2.2.7. Kolagēna spirāle .....	22
2.3. Fibrilāro un globulāro proteīnu otrējā struktūra .....	23
2.4. Proteīnu trešējā struktūra .....	23
2.5. Proteīnu ceturtdējā struktūra .....	24
2.6. Proteīnu ķīmiskās īpašības .....	25
2.6.1. Hidrolīze .....	25
2.6.2. Proteīnu denaturēšanās .....	25
2.6.3. Proteīnu skābes un bāzes īpašības .....	26
2.7. Apkopojums .....	26
3. Enzīmi .....	27
3.1. Enzīmu uzbūve .....	27
3.1.1. Kofaktori .....	27
3.1.2. Vitamīni kā kofaktori .....	28
3.2. Enzīmu katalītiskā aktivitāte un darbības mehānisms .....	29
3.2.1. Enzīmu katalizētu reakciju kinētikas raksturojums .....	33
3.2.2. Alostēriskie enzīmi .....	34
3.3. Enzīmu darbību ietekmējošie faktori .....	35
3.3.1. Enzīma koncentrācijas ietekme uz reakcijas ātrumu .....	35
3.3.3. Temperatūras ietekme un enzīmu termiskā stabilitāte .....	35
3.3.4. pH ietekme .....	36
3.3.5. Spiediena ietekme .....	37
3.3.6. Ūdens ietekme .....	37
3.4. Enzīmu aktivitātes regulēšana .....	38
3.4.1. Aktivatoru ietekme .....	38
3.4.2. Alostēriskā kontrole .....	39
3.4.3. Inhibitoru ietekme .....	39
3.4.4. Enzīmu aktivitātes regulēšana ar kovalento modifikāciju .....	40
3.4.5. Enzīmu aktivitātes ģenētiska kontrole .....	41
3.5. Enzīmu klasifikācija un nomenklatūra .....	41
3.6. Enzīmu izmantošana pārtikā un pārtikas tehnoloģijā .....	49
3.6.1. Enzīmu avoti .....	49
3.6.2. Tehniskie enzīmu preparāti .....	50
3.6.3. Imobilizētie enzīmi .....	52

3.7. Pārtikas produktu enzimatiskās analīzes metodes .....	53
3.7.1. Substrāta noteikšana.....	53
3.7.2. Enzīma aktivitātes noteikšana.....	55
3.7.3. Imunoloģiskā metode.....	56
3.7.4. Polimerāzes ķēdes reakcija .....	58
4. Nukleīnskābes.....	60
4.1. Nukleīnskābju bāzes.....	60
4.2. Nukleozīdi.....	61
4.3. Nukleotīdi .....	63
4.4. Nukleīnskābju pirmējā struktūra .....	64
4.5. DNS otrējā struktūra.....	64
4.6. RNS veidi .....	66
4.7. Nukleoproteīni .....	68
4.8. Ģenētiskās informācijas realizācija.....	68
4.9. Apkopojums.....	68
5. Ogļhidrāti.....	70
5.1. Monosaharīdi .....	70
5.2. Monosaharīdu konformācija.....	72
5.3. Monosaharīdu fizikālās īpašības.....	73
5.4. Monosaharīdu ķīmiskās īpašības.....	74
5.4.1. Mutarotācija .....	74
5.4.2. Ūdens un cianīdu pievienošana .....	76
5.4.3. Reakcijas ar aminogrupu saturošiem savienojumiem (Majāra reakcijas).....	76
5.4.4. Monosaharīdu oksidēšanās .....	80
5.4.5. Skābes ietekme.....	80
5.4.6. Pārvērtības bāziskā vidē.....	82
5.4.7. Reducēšana.....	84
5.4.8. Glikozīdu veidošanās .....	84
5.4.9. Monosaharīdu acilēšana.....	87
5.5. Monosaharīdu pārstāvji .....	87
5.5.1. Glikoze .....	87
5.5.2. Galaktoze.....	87
5.5.3. Fruktoze.....	88
5.5.4. Riboze un 2-dezoksiriboze.....	88
5.5.5. Monosaharīdu atvasinājumi .....	88
5.6. Oligosaharīdi.....	89
5.6.1. Oligosaharīdu ķīmiskās īpašības.....	90
5.6.2. Maltoze.....	90
5.6.3. Laktoze.....	91
5.6.4. Saharoze.....	91
5.7. Polisaharīdi .....	91
5.7.1. Ciete un glikogēns .....	92
5.7.2. Celuloze.....	94
5.7.3. Hitīns .....	94
5.7.4. Muramīns .....	95
5.7.5. Saistaudu polisaharīdi .....	95
5.7.6. Asinsgrupu noteicošo vielu oligosaharīdi.....	97
6. Lipīdi.....	98
6.1. Lipīdu klasifikācija .....	98
6.2. Taukskābes.....	100
6.2.1. Taukskābju fizikālās īpašības .....	100
6.2.2. Taukskābju ķīmiskās īpašības .....	101
6.2.3. Dabīgie taukskābju esteri.....	101

6.2.4. Taukskābju auto un fotooksidācija .....	103
6.2.5. Antioksidanti .....	105
6.3. Tauki un eļļas.....	107
6.4. Fosfolipīdi.....	109
6.5. Sfingolipīdi .....	110
6.6. Nehidrolizējamie lipīdi .....	111
6.6.1. Steroīdi .....	111
6.6.2. Taukos šķīstošie vitamīni.....	113
6.6.3. Terpēni.....	114
6.6.4. Prostaglandīni.....	115
6.7. Membrānas .....	116
6.7.1. Membrānas sastāvs un uzbūve.....	116
6.7.2. Šūnu membrānu funkcijas .....	118
6.8. Apkopojums.....	118
7. Aromātvielas .....	120
7.1. Vispārēji jēdzieni par aromātvielām.....	120
7.2. Nevēlams aromāts, tā cēloņi.....	121
7.3. Aromātvielu analīze.....	121
7.4. Ķīmiskās struktūras un aromāta saistība.....	122
7.5. Individuālu aromātvielu grupas.....	122
7.5.1. Aromātvielu veidošanās bez enzīmu līdzdalības .....	123
7.5.2. Enzimātiskās reakcijas .....	123
7.6. Aromātvielu mijiedarbība ar citām pārtikas sastāvdaļām .....	124
7.7. Pārtikas aromatizācija.....	125
7.7.1. Pārtikas aromatizācijai izmantojamie preparāti no dabīgām izejvielām.....	125
7.7.2. Sintētiskās aromātvielas.....	125
7.7.3. Aromātvielas no prekursoriem.....	125
7.7.4. Aromāta stabilitāte .....	125
8. Pārtikas un bioloģiski aktīvas piedevas.....	126
8.1. Pārtikas piedevu raksturojums un klasifikācija .....	126
8.2. Pārtikas piedevu nekaitīgums.....	127
9. Dažādu pārtikas vielu atlikumu ietekme uz produktu drošumu .....	130
9.1. Svešo vielu iekļūšana pārtikas produktos no apkārtējās vides .....	130
9.2. Vielu toksiskuma novērtējums .....	130
9.3. Toksiskie elementi .....	131
9.3.1. Svins.....	131
9.3.2. Kadmījs .....	131
9.3.3. Dzīvsudrabs.....	131
9.4. Toksiskās organiskās vielas.....	132
9.4.1. Pesticīdi .....	132
9.4.2. Antibiotikas .....	132
9.4.3. Pretstresa preparāti.....	132
9.4.4. Veterinārie preparāti.....	132
9.4.5. Polihlorogļūdeņraži .....	132
9.5. Veselībai kaitīgas vielas augos.....	132
9.5.1. Zilskābe.....	132
9.5.2. Nitrāti .....	133
9.5.3. Skābeņskābe un glioksālskābe.....	133
9.5.4. Goitrīnu veidojošie savienojumi.....	133
9.5.5. Indīgie savienojumi pupās .....	133
9.5.6. Alkoloīdi.....	133
9.5.7. Ēdamo sēņu toksīni.....	134
9.5.8. Toksīni burkānos .....	134

9.5.9. Furanokumarīni .....	134
9.5.10. Medus toksīni .....	134
9.5.11. Ēterisko eļļu toksiskums .....	134
9.6. Zivju un gliemju toksīni .....	134
9.7. Baktēriju toksīni .....	134
9.8. Biogēnie amīni .....	135
9.9. Mikotoksīni .....	135
9.10. Toksīnu veidošanās pārtikas tehnoloģiskajos procesos .....	135
9.10.1. Policikliskie arēni .....	135
9.10.2. Nitrozamīni .....	136
9.10.3. Etilkarbamāts .....	136
9.10.4. Proteīnu un aminoskābju veidoti mutagēni .....	136
9.11. Pārtikas produktu intolerance .....	136
9.11.1. Alerģija .....	137
9.11.2. Pseudoalerģiskas reakcijas .....	138
9.11.3. Intolerances reakcijas .....	138
9.11.4. Toksiskas reakcijas .....	138
10. Neorganisko analītu noteikšanas metodes .....	140
11. Augstefektīvākā šķidrumu hromatogrāfija – teorētiskie principi .....	150
11.1. Definīcija .....	150
11.2. Šķidrumu hromatogrāfijas metožu iedalījums .....	150
11.3. Hromatogrāfiskais process .....	151
11.3.1. Joslu platuma pieauguma cēloņi .....	152
11.3.2. Hromatogramma un tās būtība .....	155
11.4. Faktori, kas ietekmē izšķiršanu .....	161
11.5. Joslu izšķiršanas uzlabošana .....	162
11.6. Atdalīšanas kontrole .....	163
11.7. Ārpus kolonnas tilpumi .....	164
11.8. Joslu asimetrija .....	165
11.8.1. Asimetrijas cēloņi .....	165
11.8.2. Kolonnas pārslodze .....	166
11.8.3. Ķīmiskā asimetrija – parauga nesaderība ar kustīgās un/vai nekustīgās fāzes dabu .....	167
11.9. Temperatūras ietekme uz atdalīšanu AEŠH apstākļos .....	167
12. Iekārtas augsti efektīvajā šķidrumu hromatogrāfijā .....	169
12.1. Vispārīgs raksturojums .....	169
12.2. Kustīgās fāzes rezervuārs .....	170
12.3. Sūknis .....	170
12.3.1. Vispārējās prasības .....	170
12.3.2. Īsgājiena virzūsūknis .....	171
12.3.3. Apkope un nomaiņa .....	172
12.4. Iekārtas sagatavošana parauga ievadīšanai .....	173
12.4.1. Kustīgās fāzes izvēle .....	173
12.4.2. Kustīgās fāzes pagatavošana .....	174
12.4.3. Gradianta sistēmas .....	174
12.5. Parauga ievadīšanas ierīces .....	176
12.6. Detektori .....	177
12.6.1. Detektoru iedalījums .....	177
12.6.2. UV detektori .....	180
12.6.3. Laušanas koeficienta detektori (refraktometri) .....	182
12.6.4. Fluorescences detektori .....	182
12.6.5. Elektroķīmiskie (amperometriskie) detektori .....	183
12.6.6. Gaismas izkliedes detektori .....	184
12.7. AEŠH kombinācija ar spektrometrijas metodēm .....	185

13. Apgrieztās fāzes hromatogrāfija .....	188
13.1. Kustīgā fāze apgrieztās fāzes hromatogrāfijā.....	189
13.2. Eluentu selektivitāte un stiprums .....	190
13.3. Nekustīgās fāzes .....	191
13.3.1. Izdalīšanas secības vadlīnijas AF hromatogrāfijā.....	193
13.3.2. Metodes izstrāde apgrieztās fāzes hromatogrāfijā.....	194
13.3.3. Izmaiņotība .....	195
14. Analītiskā AEŠH.....	196
14.1. Izdalīšanas laiku $t_R$ paredzēšana.....	197
14.2. Mikropiemaisījumu analīze .....	198
14.3. Kvantitatīvā analīze .....	198
14.3.1. Atgūstamība.....	201
14.3.2. Integrēšanas kļūdas .....	204
14.3.3. Detektēšanā izmantotais viļņa garums.....	205
14.4. Aparatūras testēšana, validācija un sistēmas atbilstības tests .....	205
Literatūra .....	207

## Ievads

**Ķīmija** pēta matērijas dabu, īpašības un ar to notiekošās pārvērtības. **Pārtikas ķīmija** pēta pārtikas produktu sastāvu, uzbūvi un īpašības. Pārtikas ķīmija izmanto ķīmijas principus pārtikas sistēmām, ieskaitot lauksaimniecisko ražošanu, tās produkcijas glabāšanu, transportēšanu, pārstrādi, izplatīšanu, tirdzniecību un patēriņu. Kā atsevišķa zinātņu nozare pārtikas ķīmija izveidojās 20. gadsimta vidū.

Pārtikas ķīmijas misija ir nodrošināt barojošas un patērētājiem drošas pārtikas apriti. Šo misiju tā daļa ar citām pārtikas zinātnēm – uzturzinātni, pārtikas mikrobioloģiju, pārtikas tehnoloģiju, pārtikas inženierzinātni un pārtikas likumdošanu. Pārtikas ķīmijā uzsvars likts uz pārtikas komponentu ķīmiju, ieskaitot makrosastāvdaļas (ūdens, oglehidrāti, lipīdi, proteīni), mikrosastāvdaļas (vitamīni, minerālvielas, uztura bagātinātāji u. c.) un to mijiedarbību.

Uzturu var raksturot kvantitatīvi, ja zināmi visi pārtikas produkta uztura vērtību noteicošie komponenti un to efekti. Turpretim baudu, ko dod ēdiena patērišana, ir grūtāk izmērīt, jo tās veidošanā piedalās arī tādi grūti izmērāmi lielumi, kā vizuālais izskats, smarža, garša un tekstūra, kuru savukārt nosaka ļoti daudzi dažādi savienojumi un to mijiedarbība. No šiem savienojumiem liela daļa nav pat identificēti. Uztura izvēlē būtiska nozīme ir arī ērtībai jeb izdevīgumam lietošanā.

Pārtikas ķīmija pēta ne tikai izejvielas un gala produktu sastāvu, bet arī pārmaiņas, kuras notiek audzēšanas, pārstrādes, uzglabāšanas un kulinārijas laikā. Pārtikas sarežģītais sastāvs rada lielu daudzumu vēlamu un nevēlamu reakciju, kuras nosaka parametru daudzveidība. Lai izprastu to ķīmisko procesu pamatus, kuri notiek pārtikā, jāsāk ar atsevišķu komponentu un to dominējošo reakciju izpēti.

Pārtikas ķīmija nebūtu domājama bez analīzes, kurā pielieto visu mūsdienās pieejamo pētniecības analītisko aparatūru un metodes. Pārtikas ķīmijas pētījumi adresēti arī objektīvu standartu izstrādei, pēc kuriem iespējams noteikt pārtikas uzturvērtību, baudījumu, nekaitīgumu un ērtumu lietošanai.

Šis mācību materiāls nav un arī nav domāts kā visaptveroša mācību grāmata pārtikas ķīmijā, kurā tiek apskatītas visas pārtikas sastāvdaļas un to ķīmiskās pārvērtības pārtikas ražošanas procesos: makrouzturvielas (lipīdi, olbaltumvielas un oglehidrāti), mikrouzturvielas un fizioloģiski aktīvie savienojumi (piem., minerālvielas, vitamīni, enzīmi), pārtikas piedevas un uztura bagātinātāji, kā arī veselībai kaitīgās vielas pārtikā un pārtikas nozares likumdošana.

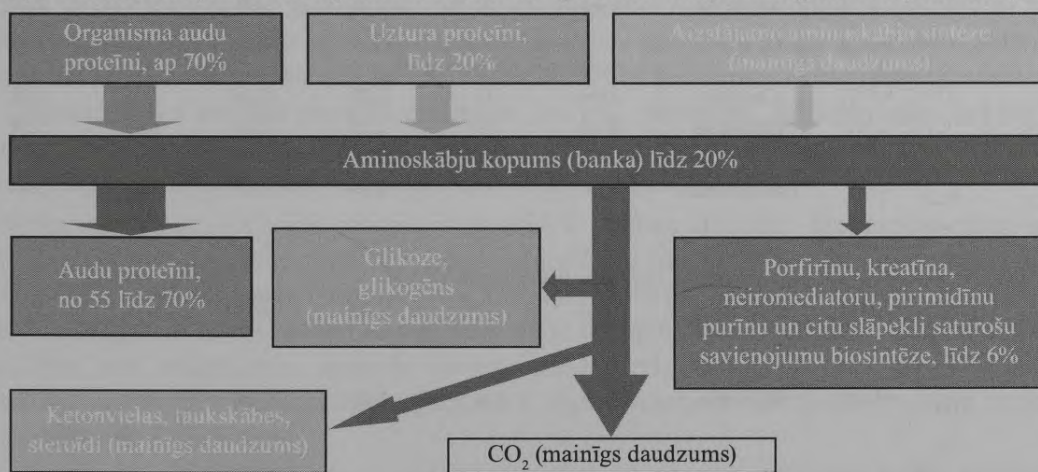
Visaptverošu ieskatu pārtikas ķīmijā ikviens studiju programmas “Uzturzinātne” klausītājs gūs pārtikas ķīmijas mācību grāmatās, kuras izdotas 1998. gadā (V. Baltess “Pārtikas ķīmija”, tulk. *Dr. chem.* I. Jākobsone un *Dr. chem.* M. Jākobsons. Rīga: Latvijas Universitāte, 1998. 478 lpp.; R. Matiseks u. c. “Pārtikas analītiskā ķīmija. Pamati, metodes, lietošana”, tulk. *Dr. chem.* I. Jākobsone un *Dr. chem.* M. Jākobsons. Rīga: Latvijas Universitāte, 1998. 478 lpp.).

Šajā mācību materiālā (I. Jākobsone, A. Morozovs, P. Mekšs “Pārtikas ķīmija”) ietvertā tematika daļēji sasaucas ar minētajās pārtikas ķīmijas grāmatās apskatītajiem jautājumiem. Nosacīti var uzskatīt, ka mācību materiāls sastāv no divām daļām: pirmā daļa (2.–6. nodaļa) dod padziļinātas teorētiskas zināšanas par pārtikas makrouzturvielām (olbaltumvielām, oglehidrātiem un lipīdiem) un to pārvērtības noteicošām pārtikas sastāvdaļām (enzīmiem un nukleīnskābēm); otrā daļa dod teorētisku ieskatu mūsdienās svarīgākajā un visplašāk pārtikas zinātnē lietotajā analīzes metodē – hromatogrāfijas metodē (11.–14. nodaļa). Tiek apskatīti augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas teorētiskie pamati, jo organisko savienojumu analīzē mūsdienās pārsvarā dominē hromatogrāfiskās analīzes metodes. Ne mazāk svarīga ir mācību materiāla 8. nodaļa “Neorganisko analīžu analīzes metodes”, kas sniedz instrumentālo analīžu metožu pārskatu un informē par pārtikas produktu sagatavošanu analīzei. Nodaļas sagatavošanā lielu ieguldījumu deva LU Ķīmijas fakultātes profesors Artūrs Vīksna.

# 1. Aminoskābes un peptīdi

Nozīmīgās pārtikas komponentes – aminoskābes, peptīdi un proteīni – nodrošina izejvielas organisma proteīna sintēzei. Nosaukums “proteīns” cēlies no grieķu *prōtos* – pirmais jeb galvenais. Daudziem proteīniem piemīt katalītiska aktivitāte, citi ir struktūru veidotāji, membrānu funkciju nodrošinātāji, nešķīstošu vai grūti šķīstošu vielu transportētāji, dažādu metālu jonu rezervju nodrošinātāji, regulēšanas procesu nodrošinātāji, organisma aizsargātāji pret nevēlamiem savienojumiem vai svešu dzīvību. Proteīnu molekulmasa visbiežāk ir robežās no dažiem simtiem tūkstošu līdz pat miljonom daltonu, kaut sastopami proteīni arī ar lielāku un mazāku molekulmasu. Proteīnus, kuru molekulmasa nepārsniedz 100 000 un kuri nesatur **prostētiskās grupas** (proteīna daļu, kas nav veidota no aminoskābēm), sauc arī par polipeptīdiem. Aminoskābes, peptīdi un proteīni kopā ar ogļhidrātiem un lipīdiem tieši ietekmē ēdiena aromātu un ir priekšteči aromātvieļām un krāsvieļām, kuras veidojas pārtikas sagatavošanas laikā termiskas vai enzimatiskas iedarbības rezultātā. Proteīni kopā ar ogļhidrātiem un lipīdiem nosaka pārtikas fizikālās īpašības, pateicoties to spējai veidot stabilizētus gelus, putas, emulsijas un diegveida struktūras.

Cilvēkam galvenie proteīnu avoti ir graudi, eļļas augi, dārzeņi, gaļa un piens. Pārtikas rūpniecība proteīnu un aminoskābju iegūšanai izmanto arī speciāli kultivētu mikroorganismu (piem., raugu) un pārtikas izejvielu pārstrādes blakusproduktu (piem., spraukumi, suliņas, asinis) proteīnus. Proteīniem un peptīdiem piemīt antigēnas īpašības – nokļūstot organismā, tās izsauc imūnreakciju, jo ir organismam svešas, tāpēc to uzņemšana pamatā notiek, hidrolizējot proteīnus līdz aminoskābēm un tās pēc tam absorbējot. Būtībā visas olbaltumvielu pārvērtības organismā balstās uz aminoskābju vielmaiņu. Aminoskābju avots organismā ir barības proteīni vai paša organisma proteīni (1.1. att.).

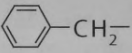
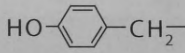
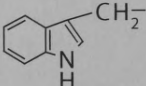
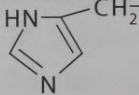
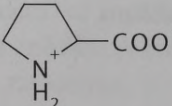


1.1. att. Cilvēka organisma aminoskābju avoti un to izmantošana

## 1.1. α-aminoskābes

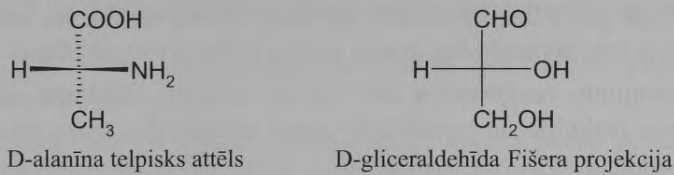
No proteīnu hidrolizātiem var izdalīt līdz 200 aminoskābju, no kurām ap 70 ir dominējošās un sastopamas biežāk, bet tikai 20 aminoskābes organismam ir nepieciešamas, lai sintezētu jebkuru proteīnu. Tās sauc par **proteinogēnajām aminoskābēm** (1.1. tabula). Pārējās veidojas no šīm 20 aminoskābēm bioķīmiskajās pārvērtībās jau proteīna sastāvā, un tās var uzskatīt par to atvasinājumiem. Dažu olbaltumvielu sastāvā ietilpst arī minorās jeb netipiskās aminoskābes, kas veidojas no 20 proteinogēnajām aminoskābēm pēc to iekļaušanas proteīna sastāvā, piemēram, 4-hidroksiprolīns un 5-hidroksilizīns kolagēnā, N-metillizīns miozīnā, γ-karboksilglutamīnskābe – protrombīnā, desmozīns un izodesmozīns (triju lizīna molekulu oksidēšanās un kondensācijas ar vēl vienu lizīnu produkts) elastīnā.

## Proteinogēnās aminoskābes

Sānu grupa R	Nosaukums	Saīsinātais apzīmējums		pK <sub>a</sub> (COOH)	pK <sub>a</sub> (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	pK <sub>a</sub> (R)	pI
		Trīs burtu	Viena burtu				
Alifātiskās aminoskābes							
H-	Glicīns	Gly	G	2,60	9,80	nav	6,06
H <sub>3</sub> C-	Alanīns	Ala	A	2,35	9,80	nav	6,10
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-	Valīns	Val	V	2,29	9,40	nav	5,96
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH <sub>2</sub> -	Leicīns	Leu	L	2,33	9,74	nav	6,02
H <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -CH-   CH <sub>3</sub>	Izoleicīns	Ile	I	2,32	9,76	nav	6,02
Hidroksilgrupu saturošās aminoskābes							
HO-CH <sub>2</sub> -	Serīns	Ser	S	2,19	9,21	nav	5,68
H <sub>3</sub> C-CH-   OH	Treonīns	Thr	T	2,09	9,11	nav	5,60
Karboksilgrupu saturošās aminoskābes							
HOOC-CH <sub>2</sub> -	Asparagīnskābe	Asp	D	1,99	9,90	3,90	2,77
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Glutamīnskābe	Glu	E	2,10	9,47	4,07	3,22
Amīdgrupu saturošās aminoskābes							
H <sub>2</sub> N-CO-CH <sub>2</sub> -	Asparagīns	Asn	N	2,10	8,84	nav	5,41
H <sub>2</sub> N-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Glutamīns	Glu	Q	2,17	9,13	nav	5,65
Aminogrupu saturošā aminoskābe							
H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	Lizīns	Lys	K	2,16	9,18	10,79	9,74
Guanīngrupu saturošā aminoskābe							
H <sub>2</sub> N-C(=NH <sup>+</sup> )-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -   NH <sub>2</sub>	Arginīns	Arg	R	2,48	8,99	12,50	10,76
Sēru saturošās aminoskābes							
HS-CH <sub>2</sub> -	Cisteīns	Cys	C	1,92	10,46	8,35	5,02
H <sub>3</sub> C-S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Metionīns	Met	M	2,13	9,28	nav	5,54
Arēnu sistēmu saturošās aminoskābes							
 -CH <sub>2</sub> -	Fenilalanīns	Phe	F	2,16	9,18	nav	5,48
 -CH <sub>2</sub> -	Tirozīns	Tyr	Y	2,20	9,11	10,13	5,66
Heterocikliskās aminoskābes							
 -CH <sub>2</sub> -	Triptofāns	Trp	W	2,43	9,44	nav	5,89
 -CH <sub>2</sub> -	Histidīns	Hys	H	1,80	9,35	6,04	7,59
	Prolīns	Pro	P	1,95	10,64	nav	6,30

Visa lielā proteīnu daudzveidība veidota gandrīz tikai no  $\alpha$ -aminoskābēm. Pirmā aminoskābe, kas tika izdalīta brīvā veidā, bija asparagīnskābe 1806. gadā. Pēdējo no 20 olbaltumvielas veidojošām aminoskābēm – treonīnu – atklāja 1938. gadā. Aminoskābēm ir doti **triviāli nosaukumi**, kas radušies vai nu no iegūšanas avota vai citām īpašībām. Piemēram, nosaukums glicīns cēlies no grieķu vārda *glykos* – salds, jo tam ir salda garša, serīns – no latīniskā *serius* – zīdains, jo pirmoreiz izdalīts no zīda, tirozīns – no grieķu *tyros* – siers, glutamīns no latīniskā *gluten* – līme, pirmoreiz izdalīts no graudu lipekļa, cistīns – no grieķu *kystis* – pūslis, izdalīts no urīnpūšļa akmeņiem, asparagīnskābe – no latīņu *asparagus* – sparģelis, izdalīta no tā asniem utt.

Izņemot vienkāršāko aminoskābi glicīnu, pārējām 19 proteīnogēnām aminoskābēm ir vismaz viens **asimetriskais (hirālais) centrs** –  $\alpha$ -oglekļa atoms. Pie tā ir 4 atšķirīgas grupas, kas ir cēlonis divu enantiomēru, kuri viens pret otru ir spoguļattēli, eksistencei. Gandrīz visi **bioloģiski aktīvie savienojumi**, kas satur hirālo centru, dabā sastopami tikai **vienā no abām formām, D vai L**. Cilvēka organisma **aminoskābes pieder L rindai**, t. i., to asimetriskā oglekļa atoma grupu izkārtojums atbilst L-glicerāldehīdam (1.2. att.).



1.2. att. Alanīna un glicerāldehīda enantiomēru projekciju formulas

Tikai viena stereozomēra izmantošana proteīnu biosintēzei ir būtiska noteiktas telpiskās struktūras veidošanai un tās sekām – bioloģiskām īpašībām. Divām aminoskābēm – **treonīnam** un **izoleicīnam** – ir arī **otrs asimetriskais oglekļa atoms**. Optisko izomēru konfigurācijas apzīmējumi D un L izmantojami tikai attiecībā uz vienu asimetrisko oglekļa atomu. Ja molekulā ir divi vai vairāki asimetriskie oglekļa atomi, tad labāk lietot apzīmējumus R un S. Pēc šīs sistēmas visām proteīnu L-aminoskābēm ir S-konfigurācija, izņemot L-cisteīnu, kurš atbilst R-konfigurācijai, jo sēra atomam ir lielāks kārtas numurs nekā skābeklim, tāpēc otrā pēc vecuma ir  $-\text{CH}_2\text{SH}$  grupa nevis  $-\text{COOH}$ . **Proteīnu struktūru veidošanā lielāka loma ir konfigurācijai pie  $\alpha$ -oglekļa atoma**, tāpēc visus aminoskābju stereozomērus vispirms iedala pēc šīs pazīmes.

Brīvā veidā organismos sastopamas arī D-aminoskābes, jo visi hirālie savienojumi pakļauti patvaļīgām pārvērtībām, kurās veidojas ķīmiskās īpašībās identisko **D** un **L** izomēru maisījums – racemāts, bet D-aminoskābes ātri sadala enzīmi, un tās nekad neietilpst cilvēka olbaltumvielu sastāvā. Dabā D-aminoskābes saturoši proteīni sastopami ļoti reti, piemēram, Sibīrijas mēra baktērija satur D-glutamīnskābi, un tāpēc tās veidotos proteīnus nešķeļ gremošanas fermenti. Cilvēka organismā L-aminoskābju sintēzi nodrošina stereospecifisku enzīmu katalīze.

Cilvēka organisms evolūcijas procesā ir zaudējis to enzīmu aktivitāti, kuri nepieciešami sazarotu oglekļa atomu ķēdi saturošu un heterociklisko aminoskābju sintēzei, tāpēc šīs aminoskābes jāuzņem ar barību. Tās ir **neaizstājamās aminoskābes**, kuru nosaukumi 1.1. tabulā ir treknrakstā un pasvītroti. Pārējās ir aizstājamās aminoskābes, jo var sintezēties no ogļhidrātiem un aminogrupas avota (citas aminoskābes vai aminogrupu saturoša savienojuma). Treknrakstā, bet bez pasvītrojuma ir to aminoskābju nosaukumi, kuru sintēze organismā ir nepietiekama un kuri jāuzņem daļēji ar pārtiku – daļēji aizstājamās aminoskābes.

Neaizstājamo aminoskābju saturs nosaka proteīna pilnvērtību. Ja trūkst kādas neaizstājamās aminoskābes vai kādas aizstājamās aminoskābes, sintēze ir traucēta un nevar sintezēties to saturošie proteīni, tai skaitā arī enzīmi, kuri piedalās proteīnu hidrolīzē. Tāpēc vēl vairāk ir apgrūtināta trūkstošās aminoskābes uzņemšana, un veidojas liktenīgā spirāle. Pasaulē kopumā ir olbaltumvielu, it sevišķi pilnvērtīgu olbaltumvielu, deficīts.

## 1.2. Aminoskābju ķīmiskās īpašības

Visas uzturā izmantojamās oglekli saturošās komponentes, izņemot dažas minerālvielas, pie-skaitāmas bioorganiskiem savienojumiem. Jēdziens **bioorganiskie savienojumi** apzīmē organiskos savienojumus, kuri veidojas dzīvajos organismos. Dažreiz tos sauc arī par dabasvielām. Šo savienojumu bioloģiskā izcelsme neizslēdz to sintēzi laboratorijās, un tiem izmantojami organiskās ķīmijas likumi, metodes un principi. Savukārt organisko savienojumu uzbūve un īpašības pakļaujas kopējiem ķīmijas likumiem.

Bioorganiskie savienojumi pēc organisko savienojumu klasifikācijas lielākoties pieder pie **polifunkcionāliem savienojumiem**, t. i., savienojumiem ar daudzām reaģētspējīgām grupām. Šāda savienojuma īpašības var uzskatīt par atsevišķo funkcionālo grupu individuālo, to mijiedarbību un grupas saistošo ķīmisko saišu īpašību lineāru kombināciju, kas dod iespēju izskaidrot savienojuma reaģētspēju. Mijiedarbība notiek ne tikai molekulas ietvaros, bet arī starp molekulām, tāpēc jāņem vērā arī sistēmā esošo citu molekulu, piemēram, šķīdinātāja, piemaisījumu, neizreaģējušo vielu, reakcijas blakusproduktu un produktu īpašības. Kaut gan būtu jāņem vērā ļoti liels faktoru daudzums, tomēr tikai nedaudzi no tiem konkrētajos apstākļos būs dominējošie, kamēr pārējo ietekmi var pielīdzināt fona ietekmei.

Bioorganisko savienojumu **reaģētspēju** ļoti būtiski ietekmē elektronu sadalījuma raksturs un blīvums molekulās pirms reakcijas un polarizācija ārējo enerģētisko lauku ietekmē. Reakcijas gaitā visi procesi dzīvajos organismos notiek polārā vidē – ūdens šķīdumā, tāpēc tie ir saistīti ar jonu vai polarizētu kovalento saiti veidojošo atomu ārējās kārtas elektronu mijiedarbību.

$\alpha$ -aminoskābes pieder heteropolifunkcionālajiem savienojumiem, katrai no tām ir pa vienai skābai karboksilgrupai un bāziskai aminogrupai. Pēc kopējās aminogrupu un karboksilgrupu attiecības ( $\text{NH}_2/\text{COOH}$ ) aminoskābes iedala neitrālās ( $\text{NH}_2/\text{COOH} = 1$ ), piem., glicīns, serīns, skābās ( $\text{NH}_2/\text{COOH} = 0,5$ ), piem., asparagīnskābe vai glutamīnskābe, bāziskās ( $\text{NH}_2/\text{COOH} = 2$ ), piem., arginīns vai lizīns.

Aminoskābēm kopēja iezīme ir karboksilgrupa un pirmējā aminogrupa pie  $\alpha$ -oglekļa atoma, un tās atšķiras tikai ar sānķēdes R sastāvu un uzbūvi (1.2. tab.), izņemot prolīnu, kura aminogrupa veido hetrociklisko sistēmu un tāpēc ir otrējā aminogrupa. Tā kā prolīna heterocikliskā sistēma ir piesātināta, tad tā ķīmiskās īpašības būtiski neatšķiras no pārējo aminoskābju īpašībām.

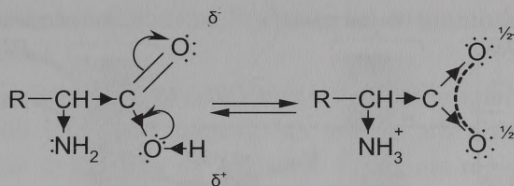
1.2. tabula

#### Aminoskābju klasifikācija pēc sāngrupu rakstura

Nepolāru, hidrofobu grupu saturošās aminoskābes		
Alanīns Izoleicīns Leicīns	Fenilalanīns Metionīns Prolīns	Triptofāns Valīns
Polāru, hidrofilu, bet nejonizētu sāngrupu saturošās aminoskābes		
Asparagīns Cisteīns Glicīns	Glutamīns Serīns	Treonīns Tirozīns
Negatīvi lādētu, hidrofilu sāngrupu saturošās aminoskābes		
Asparagīnskābe		Glutamīnskābe
Pozitīvi lādētu, hidrofilu sāngrupu saturošās aminoskābes		
Arginīns	Histidīns	Lizīns

### 1.2.1. Aminoskābju skābes un bāzes īpašības

Kā visi savienojumi, kuri satur karboksilgrupu, aminoskābes uzrāda tai raksturīgās īpašības, ko raksturo  $\text{pK}_{\text{a1}}$  [ $\text{pK}_{\text{a}}(\text{COOH})$ ] 1,8–2,6 robežās. Ūdens šķīdumā aminoskābes ir jonizētas, tāpat jonizētā veidā tās sastopamas kristāliskā stāvoklī un pastāv **bipolāra jona** formā, kas veidojas, skābajai karboksilgrupai deprotonējoties un bāziskajai aminogrupai protonējoties. Par šādas formas esamību liecina arī aminoskābju augstās kušanas temperatūras. Novērtējot aizvietotāju ietekmi, jāņem vērā indukcijas un mezomēro efektu summārā ietekme. Ja tie ir pretēji vērsti, tad mezomērajam efektam biežāk ir spēcīgāka ietekme nekā indukcijas efektam, jo reakcijas galvenokārt notiek ar vieglāk polarizējamo  $\pi$ -elektronu līdzdalību (dinamiskais efekts), ko ietekmē mezomērais efekts.

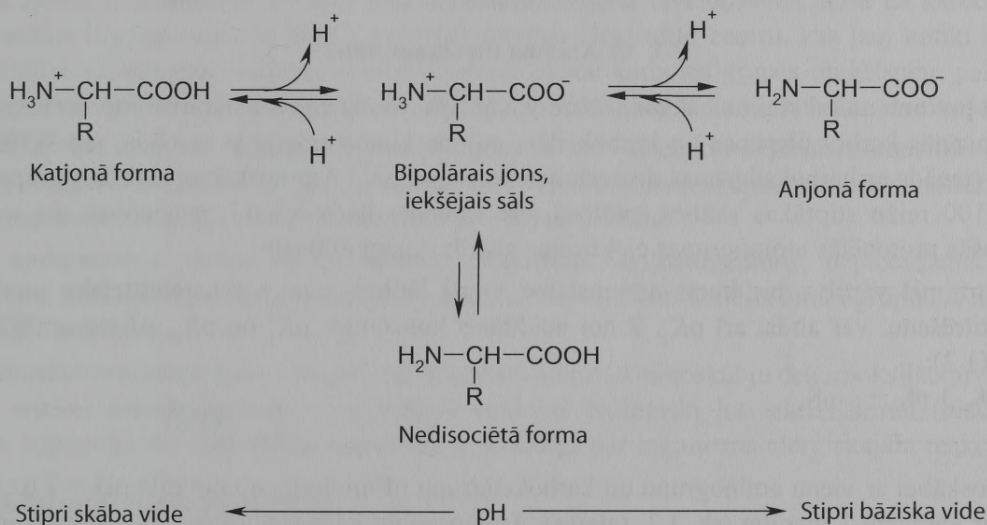


1.3. att. Aminokābju jonizācija ar bipolāra jona veidošanos

Galvenie faktori, kas nosaka karboksilgrupas skābes īpašības, ir saites O–H polaritāte un disociācijā izveidotā anjona stabilitāte.

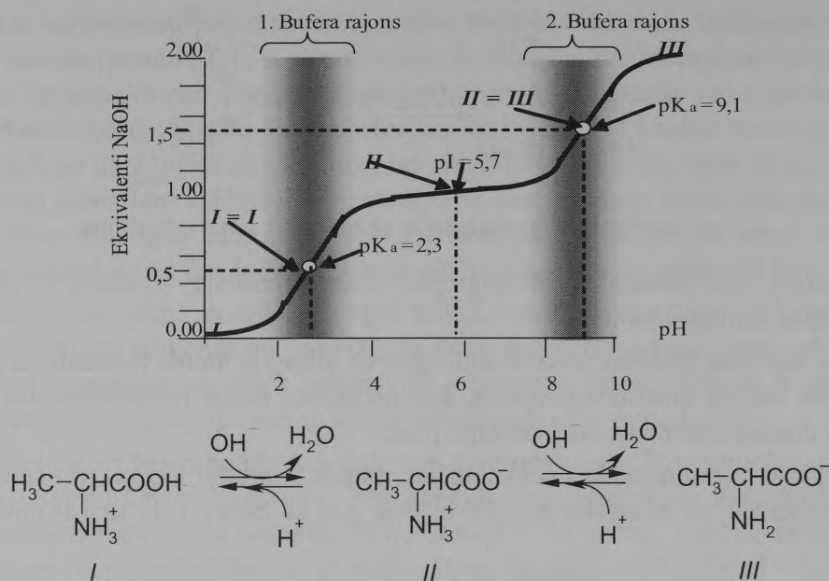
Aminogrupai bāziskās īpašības nosaka aminogrupas slāpekļa atoma nesadalītais elektronu pāris un slāpekļa atoma nelielā elektronegativitāte, kas nodrošina saites izveidošanos ar protona tukšo orbitāli, veidojot donora akceptora saiti amonija jonā.

Pēc jonizācijas abas aminokābes funkcionālās grupas ir pretēji lādētas, un summāri molekula ir neitrāla. Aminokābes var izturēties gan kā skābes, gan kā bāzes, t. i., tām ir amfotēras īpašības (1.4. att.).



1.4. att. Aminokābju skābes un bāzes līdzsvars

Skābā vidē aminokābes katjons ir divvērtīga skābe ar divām skābes grupām: nedisociētu karboksilgrupu un protonētu aminogrupu, kuras raksturo  $pK_{a1}$  un  $pK_{a2}$ . Šādas skābes titrēšana notiek divās stadijās, titrēšanas līknes katrs posms analogs vienvērtīgas skābes titrēšanai (sk. 1.5. att.).



1.5. att. Alanīna titrēšanas līkne

Pirmā protonu atdod stiprākā skābe – karboksilgrupa, jo tās anjonu stabilizē mezomērais efekts. Kad nejonizētās karboksilgrupas un karboksilāta anjona koncentrācija ir vienāda, tad šķīduma pH skaitliski vienāds ar karboksilgrupas disociācijas konstanti  $pK_1$ . Aminorskābes karboksilgrupa uzrāda aptuveni 100 reižu stiprākas skābes īpašības par attiecīgo karbonskābi, pateicoties pie  $\alpha$ -oglekļa atoma esošās protonētās aminogrupas elektronus atvelkošajam efektam.

Šķīduma pH vērtību, pie kuras aminorskābe zaudē lādiņu, sauc par **izoelektrisko punktu pI**. Turpinot titrēšanu, var atrast arī  $pK_2$ . Zinot aciditātes konstantes  $pK_1$  un  $pK_2$ , pI var aprēķināt pēc formulas (1.2):

$$pI = \frac{pK_{a_1} + pK_{a_2} + \dots + pK_{a_n}}{n} \quad (1.2)$$

Aminorskābei ar vienu aminogrupu un karboksilgrupu pI novirzīts no neitrālā pH = 7 uz zemāku vērtību par aptuveni 1 vienību (sk. 1.1. tabulu). Aminorskābju karboksilgrupas  $pK_{a_1}$  vērtība ir starp 1 un 3, un amonija grupas  $pK_{a_2}$  – no 9 līdz 10. Aminorskābes sānķēdes sastāvs un uzbūve, tajā esošas citas skābes vai bāzes grupas izmaina pI. Visas aminorskābes ir katjonā formā stipri skābā vidē (pH 1–2) un anjonā formā – stipri bāziskā vidē (pH 13–14).

Aminorskābju ūdens šķīdumiem ir buferšķīdumu īpašības. Katrai aminorskābei ir vismaz divas aciditātes konstantes un tāpēc arī vismaz divi buferējošie rajoni (sk. 1.5. att.). Aminorskābes sānķēde var saturēt protonu donoru vai akceptoru grupu, veidojot jaunu bufera rajonu. Vielās buferējošās īpašības jāņem vērā, aplūkojot pārtikas komponentu uzsūkšanos gremošanas procesos. Pie pH = pI aminorskābei ir vismazākā buferkapacitāte. Lielākajai daļai aminorskābju, izņemot histidīnu, pI ir tuvs pH 7, tāpēc šīs aminorskābes nepiedalās pH regulēšanā asins fizioloģiskajā pH = 7,2–7,4 intervālā. Ar to izskaidrojams, kāpēc hemoglobīns satur daudz histidīna, jo tam jākompensē skābju un bāzu līdzsvara izmaiņas, absorbējot un atdodot skābekli.

Aminorskābju skābju un bāzu īpašību atšķirības ir pamatā aminorskābju sadalīšanai elektroforēzē elektriskā laukā vai uz jonapmaiņas sveķiem. Piemēram, pie pH 1 histidīna, lizīna un arginīna lādiņš ir +2, kamēr pārējām aminorskābēm tikai +1, tāpēc pirmās elektriskajā laukā pārvietosies divas reizes ātrāk. Uznesot aminorskābju maisījuma pilienu uz elektroforēzes papīra vai gela, kas piesūcināts ar buferšķīdumu, atkarībā no aminorskābes lādiņa tās pārvietosies uz anodu vai katodu, un dažas aminorskābes paliks uz vietas vai tikai nedaudz izkustēsies no starta pozīcijas. Aminorskābju vietu pēc

sadalīšanas konstatē, apsmidzinot ar ninhidrīna šķīdumu, kas ar aminoskābi paaugstinātā temperatūrā dod violetas krāsas savienojumu.

Jonu apmaiņas sveķi mijiedarbojas ar aminoskābju jonizētām grupām, kuru daudzums aminoskābē atkarīgs no vides pH. Stiprāk jonizētās aminoskābes stiprāk adsorbēsies uz jonīta, kamēr mazāk jonizētās aminoskābes vieglāk izskalosies no kolonnas. Detektors reģistrē aminoskābju parādīšanos no kolonas iztekošajā šķīdinātājā, kas ļauj tās noteikt gan kvalitatīvi, gan kvantitatīvi. Līdzīgi darbojas arī citi aminoskābju šķīduma hromatogrāfijas veidi.

### 1.2.2. Karboksilgrupas reakcijas

**Karbonilgrupas oglekļa atoma pozitīvais daļlādiņš** nosaka tā tieksmi pievienot **nukleofilus reaģentus**. Reaģētspēja atkarīga no pozitīvā daļlādiņa lieluma. Pie karbonilgrupas esošie **elektronakceptorie aizvietotāji palielina**, bet **elektrondonorie aizvietotāji samazina** tās reaģētspēju. Karbonilgrupas reaģētspēju papildus **samazina telpiskie traucējumi**. Nukleofilā pievienošanās elektrofilajam C atomam noslēdzas ar atšķelšanās reakciju, un tas summāri reakciju pārvērš par nukleofilās aizvietošanās reakciju pie  $sp^2$ -hibridizēta atoma. Skābes klātbūtne veicina karbonilgrupas skābekļa atoma protonēšanos un tam mezomerā karbkatjona izveidošanos, kurā uz karbonilgrupas oglekļa atoma ir pilns pozitīvs lādiņš, veidojot spēcīgu elektrofilo centru, kas ļauj notikt reakcijām pat ar relatīvi vājiem nukleofiliem. Protonētā aminoskābē karboksilgrupas reaģētspēju palielina arī amonija grupas (pie  $\alpha$ -oglekļa atoma) pozitīvi lādētā slāpekļa atoma elektronu atvelkošais efekts.

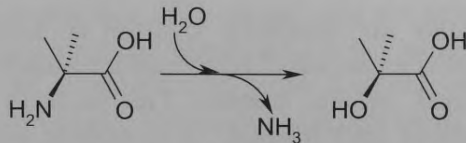
Bāziskā vidē karboksilānjonu skābekļa atoma +I un +M efektu dēļ krasi samazinās pozitīvais daļlādiņš uz karboksilgrupas oglekļa atoma, un tāpēc nukleofilās reakcijas gandrīz nenotiek. Bāziskā vidē arī samazinās slāpekļa grupas  $\alpha$ -C elektronu atvelkošais efekts.

Lai aminoskābes varētu veidot esterus, anhidrīdus, acilhalogenīdus, nepieciešams "bloķēt" aminogrupu, reakciju realizējot stipras skābes klātienē vai vispirms acilējot aminogrupu, lai neveidotos karboksilāta anjons.

Aminoskābes karsējot bāzu klātienē, tās dekarboksilējas. Aminoskābju dekarboksilāciju organismā katalizē enzīmi dekarboksilāzes, kā rezultātā veidojas bioloģiski ļoti aktīvi amīni (histamīns no histidīna, triptamīns no triptofāna). Histamīns ir atbildīgs par organisma alerģiskajām reakcijām.

### 1.2.3. Aminogrupas reakcijas

$\alpha$ -oglekļa atomam aminoskābē ir palielināts pozitīvais daļlādiņš gan aminogrupas elektronu atvelkošā, gan blakus esošā  $sp^2$  hibridizētā oglekļa atoma negatīvā indukcijas efekta dēļ, tāpēc aminogrupas nukleofila aizvietošanās reakcija notiek vieglāk pēc  $S_N1$  vai  $S_N2$  mehānismiem, piem., aminoskābju hidrolītiska deaminēšanās.



1.6. att. Aminogrupas nukleofilā aizvietošanās pie  $\alpha$ -oglekļa atoma aminoskābē

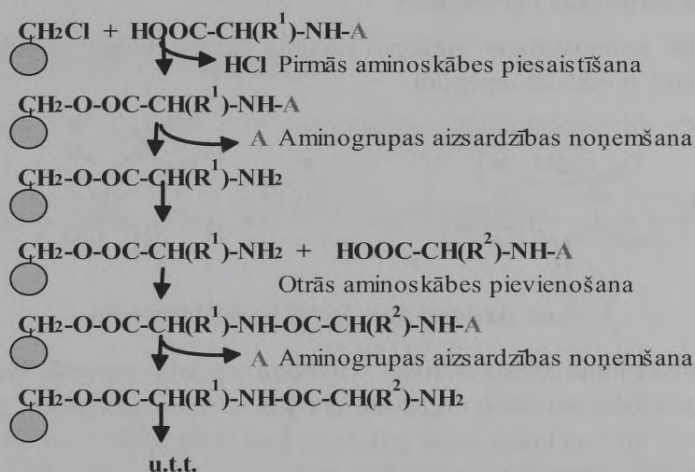
Aminoskābes, izņemot prolīnu, satur pirmējo aminogrupu pie  $\alpha$ -oglekļa atoma, kuras sajūgtās skābes aciditātes konstante  $pK_{a2}(NH_3^+)$  ir robežās 8–11, un tām ir pirmējiem amīniem raksturīgās īpašības. Tās veido sāļus ar minerālskābēm, acilējas ar acilhalogenīdiem, anhidrīdiem un aktivētiem esteriem, veido imīnus (Šifa bāzes) reakcijās ar aldehīdiem un ketoniem vai šīs grupas saturošiem bioorganiskiem savienojumiem. Pēdējā reakcija ir būtiska, reaģējot ar reducējošiem cukuriem. Aminogrupa slāpekļpaskābes iedarbībā deaminējas, veidojot hidroksikarbonskābes vai  $\alpha$  un  $\beta$  nepiesātinātās karbonskābes, izņemot prolīnu, kas veido kancerogēnos nitrozamīnus, uz ko pamatojas nitrītu nevēlamā ietekme.



Savukārt šim dipeptīdam var pievienoties nākošā aminoskābe, veidojot **tripeptīdu** utt. Līdz desmit aminoskābju kondensācijas produktus sauc par **oligopeptīdiem**. Ja ar peptīdsaitēm saistītas vairākas aminoskābes, tad veidojas **polipeptīds**. Polipeptīds, kura molekulmasa ir **lielāka par 10 000 Da, ir proteīns jeb olbaltumviela**.

1.8. att. parādītās reakcijas varbūtība organismā ir ļoti maza, jo aminoskābes ir bipolāra jona veidā. Lai šo reakciju realizētu sintētiski, aminoskābes karboksilgrupa ir jāaktivē, pārvēršot to aktīvā karbonskābes anhidrīdā vai esterī. Ja dipeptīds vai polipeptīds veidojas no dažādām aminoskābēm, tad, lai nodrošinātu noteiktas aminoskābju secības peptīdā, jāpadara reaģēt nespējīga tās aminoskābes aminogrupa, kura neveidos peptīdsaiti.

Polipeptīda sintēze ar klasiskām ķīmiskām metodēm prasa ļoti lielu darbaspēka un laika patēriņu, jo bez sintēzes jāveic arī daudzas attīrīšanas darbības, kas rada lielus zudumus. Piemēram, insulīna sintēzei bija nepieciešams veikt 223 ķīmiskās reakcijas, un pēc triju gada darba ieguva galaproduktu ar tikai 0,02% iznākumu. Tagad sintēzei izmanto cietās fāzes sintēzes metodi (1.9. att.).



1.9. att. Polipeptīda sintēze uz polimērā nesēja

Šajā sintēzē polipeptīds “aug” no C gala. peptīdsaites izveidošanos veicina, izmantojot karboksilgrupu aktivējošus aģentus un ūdens atņēmjējas vielas, piemēram, dicikloheksilkarbodiimīdu. Attīrīšana no katras stadijas blakus produktiem un neizreagējušām izejvielām pēc katras stadijas notiek tieši uz nesēja. Šī metode ļauj procesu automatizēt.

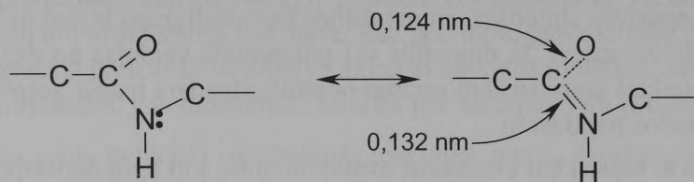
Dzīvā daba proteīna ķēdi sintezē ribosomās no N gala, un sintēzes ātrums strauji augošās šūnās var sasniegt dažus desmitus peptīda saišu sekundē.

Aminoskābes, kas ietilpst polipeptīda ķēdē, parasti sauc par attiecīgo aminoskābju atlikumiem. Aminoskābi, kas polipeptīdā pie  $\alpha$ -oglekļa atoma satur brīvu jonizētu vai nejonizētu aminogrupu, sauc par N gala aminoskābi, bet aminoskābi, kurai pie  $\alpha$ -oglekļa atoma ir jonizēta vai nejonizēta karboksilgrupa – par C gala aminoskābi. Cikliskiem oligopeptīdiem nav N un C gala aminoskābes. Oligopeptīdus nosauc pēc to sastāvā ietilpstošiem aminoskābju atlikumiem, pievienojot tām galotnes vietā piedēkli -il-, izņemot C gala aminoskābi, kuras nosaukumu nemaina. Nosaukumā aminoskābju uzskaitījuma secība ir no N uz C galu, piemēram, alanil-metionil-glutamil-prolil-lizil-triptofāns. Polipeptīdu aminoskābju secības attēlošanai izmanto aminoskābju saīsinātos apzīmējumus tādā pašā uzskaitījuma secībā: ar trim burtiem Ala-Met-Glu-Pro-Lys-Trp vai ar vienu burtu AMQPKW.

### 1.2.5.2. Peptīdsaite

Peptīdsaite starp pirmās aminoskābes karbonilgrupu un otrās aminoskābes aminogrupu formāli ir vienkārša saite, tomēr amīda grupas slāpekļa nesadalītais elektronu pāris mijiedarbojas ar karbonilgrupas  $\pi$ -elektroniem, tāpēc šī saite iegūst daļējas divkārtas saites raksturu (sk. 1.10. att.). Tādējādi visas  $-\text{CO}-\text{NH}-$  grupas saites atrodas vienā plāknē plakanā konjugētā sistēmā, kurā ir

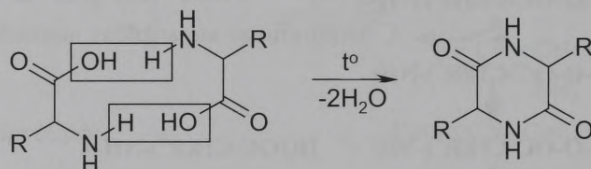
apgrūtināta rotācija ap saiti  $C_{sp^2}-N$ , un iespējama tikai brīva rotācija ap metīna grupas veidotajām vienkāršajām saitēm. Līdz ar to polipeptīds atgādina ķēdi, kurā iespējama kustība tikai starp posmiem, bet paši posmi ir stingri. Rotācija peptīda ķēdē iespējama tikai  $CO-C_\alpha$  un  $NH-C_\alpha$  saitēs. Ja pie  $\alpha$ -oglekļa atoma ir telpiski apjomīgas sāņķēdes kā triptofānam, vai arī tas ieslēgts ciklā kā prolīnā, tad rotācija ir apgrūtināta vai vispār nav iespējama. Vislokanākais ir glicīna veidotais posms.



1.10. att. peptīdsaite

### 1.2.5.3. Aminoskābju termiskās pārvērtības

Karsējot no divām aminoskābēm veidojas iekšējie heterocikliskie amīdi – diketopiperazīni (sk. 1.11. att.), kas būtībā ir cikliski dipeptīdi.



1.11. att. Aminoskābju termiska dehidratācija

Šai reakcijai ir būtiska loma ēdiena aromāta veidošanā cepšanas procesā. Termiskās reakcijās var veidoties arī citi heterocikliskie savienojumi, no kuriem daži ir stipri kancerogēni, piem., heterocikliskie amīni. Šādi savienojumi var veidoties gaļas grilēšanā, kad aminoskābes un olbaltumvielas saturošs šķīdums nopil uz sakarsētas virsmas vai grilēšanas oglēm.

## 1.3. Apkopojums

- Katra no 20 aminoskābēm satur ar  $\alpha$ -oglekļa atomu saistītu aminogrupu un šai aminoskābei specifisku sāņgrupu.
- Olbaltumvielās ir tikai L-aminoskābes.
- Pēc sāņķēdes rakstura aminoskābes var iedalīt: a) nepolāras, hidrofobas grupas saturošās aminoskābes: alanīns, izoleicīns, leicīns, fenilalanīns, metionīns, prolīns, triptofāns, valīns; b) polāru, hidrofilu sāņgrupu saturošās aminoskābes: asparagīns, cisteīns, glicīns, glutamīns, serīns, treonīns, tirozīns; c) negatīvi lādētu, hidrofilu sāņgrupu saturošās aminoskābes: asparagīnskābe, glutamīnskābe; d) pozitīvi lādētu, hidrofilu sāņgrupu saturošās aminoskābes: arginīns, histidīns, lizīns.
- Pie maza pH aminoskābe ir divvērtīga skābe, paaugstinot pH līdz  $pI$ , no karboksilgrupas atšķēlas protons un veidojas bipolārs jons. Tālāk paaugstinot pH, protons atšķēlas no protonētās aminogrupas.
- Aminokābes ar jonogēnām sāņgrupām var veidot arī citus jonus atkarībā no vides pH.
- Aminokābes kovalenti saistās savā starpā ar peptīdsaiti.
- Peptīda skābes un bāzes īpašības nosaka gala un sāņgrupas.
- Dažiem polipeptīdiem un oligopeptīdiem ir liela nozīme organisma funkciju regulācijā.

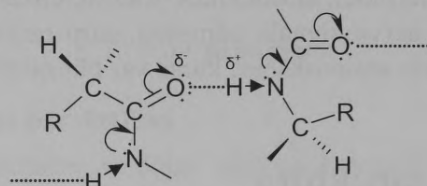


## 2.2. Proteīnu augstākās struktūras veidojošās ķīmiskās saites

Proteīna polipeptīdu ķēde satur funkcionālās grupas, kas spēj savstarpēji reaģēt, veidojot jaunas kovalentās saites, vai mijiedarboties ar pretējas zīmes lādētām grupām bez kovalento saišu veidošanas dipola-dipola mijiedarbībā. Īslaicīgi dipoli var inducēties arī nepolāros grupējumos.

### 2.2.1. Ūdeņraža saites proteīnu molekulās

Otrējās struktūras veidošanā noteicošā loma ir ūdeņraža saitēm starp vienas polipeptīda ķēdes vai tās posma amīda karbonilgrupas skābekļa atoma nesadalīto elektronu pāri un otras polipeptīda ķēdes vai tās pašas ķēdes posma, citas peptīdsaites amīda grupas ūdeņraža atomu.



#### 2.2. att. Ūdeņraža saites veidošanās starp divām proteīna ķēdēm vai vienas ķēdes diviem posmiem

Ūdeņraža saites var veidoties arī starp sānķēžu sastāvā esošām funkcionālām grupām. Tās veido saistību starp molekulā tālu novietotiem proteīnu posmiem, veidojot cilpas. Šīs grupas uz proteīnu virsmas var veidot ūdeņraža saites ar ūdens molekulām vai citām proteīnu molekulām to kompleksos.

Visi faktori, kas palielina saites heteroatoms-ūdeņradis polaritāti, stiprina ūdeņraža saiti, un otrādi. Saites stiprums ir atkarīgs gan no ārējiem faktoriem: vides pH, sāļu klātienes, gan no iekšējiem faktoriem: elektronu donoru un akceptoru grupu ietekmes. Ūdeņraža saites enerģija ir vidēji 10 reizes mazāka nekā C-C kovalentajai saitei, tā noārdās paaugstinātas temperatūras, kā arī skābju un bāzu ietekmē. Ūdeņraža saites vājina vai noārda arī savienojumi, kuri paši veido stipras ūdeņraža saites, piemēram, urīnviela, kā arī polāri organiskie šķīdinātāji.

### 2.2.2. Jonu saites

Starp pretēji jonizētām aminoskābju sāngrupām var realizēties Kulona mijiedarbība, kuru var veidot pozitīvi lādēti lizīna vai arginīna katjoni ar negatīvi lādētiem glutamīnskābes vai asparagīnskābes atlikumiem.

### 2.2.3. Hidrofobās saites starp nepolārām sāngrupām

Nepolārās ogļūdeņražu grupas mijiedarbojas cita ar citu ar dispersijas spēkiem. Tie rodas elektronu sadalījuma īslaicīgas nevienmērības rezultātā, radot spontānus dipolus, kas izraisa dipolu "pārlēkšanu" uz citām saitēm, tāpēc šādas mijiedarbības dēvē arī par dispersijas saitēm. Nepolārās aminoskābju grupas izspiež ūdens molekulas no savas vides, veidojot no ūdens brīvu iecirkni, kā rezultātā grupas nonāk tuvu cita citai. To savstarpējā mijiedarbība var būt spēcīga, jo mikromērogā rodas nepolāra vide, tāpēc šāda veida saistību sauc par hidrofobām saitēm. Lai gan katras hidrofobās saites enerģija ir maza, to lielajam skaitam ir ievērojama loma olbaltumvielas molekulas sapakošanas veidošanā. Ūdens vidē aminoskābju hidrofobās grupas vērstas uz molekulas telpiskās struktūras iekšieni un veido tās kodolu. Šīs saites nodrošina proteīnu saistību ar nepolārām vielām, piemēram, lipoproteīnos. Temperatūras iedarbībā mijiedarbība pavājinās, jo pastiprinās atomu svārstības, bet tās ir nejutīgas pret skābēm un sārmu.

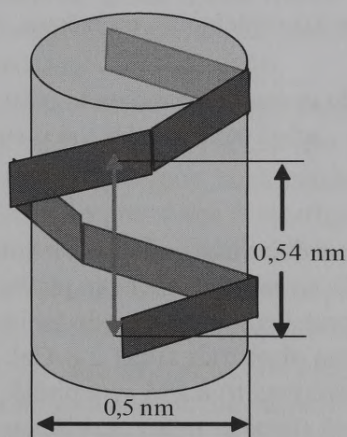
## 2.2.4. Kovalentās disulfīdsaites

Bez iepriekš minētajām nekovalentajām mijiedarbībām proteīnu telpiskās struktūras veidošanā būtiska loma ir disulfīdsaietei, kas saista kopā divus cisteīna atlikumus pat no attāliem peptīda ķēdes iecirkņiem (sk. 2.7. att.). Disulfīda saites ir kovalentās saites, bet tās ir jutīgas pret reducētāju iedarbību.

## 2.2.5. $\alpha$ -spirāle

L. Polings un P. Kori 1950. gadā aprēķināja, ka polipeptīda ķēdei viena no stabilākajām konformācijām ir labā vijuma spirāle, kas uztīta uz cilindra ar diametru 0,5 nm. Spirāles vijuma solis ir 0,54 nm, vienā vijumā izvietojas 3,7 aminoskābju atlikumi, leņķis starp blakus peptīda grupām ir  $108^\circ$  (sk. 2.3. att.). Šīs struktūras stabilizāciju galvenokārt nodrošina ūdeņraža saites starp katras pirmās aminoskābes atlikuma karbonilgrupas (C=O) skābekļa atomu un katras piektās aminoskābes N-H grupas ūdeņraža atomu (C=O $\cdots$ H-N). Šo ūdeņraža saišu virziens ir nedaudz novirzīts no cilindra asij paralēlā stāvokļa. Lielais ūdeņraža saišu skaits nodrošina samērā stabilu struktūru. Prolīna molekulā metīna grupa ir ciklā, kas nepieļauj brīvu rotāciju, tāpēc šajā vietā spirāles asī veidojas līkums.

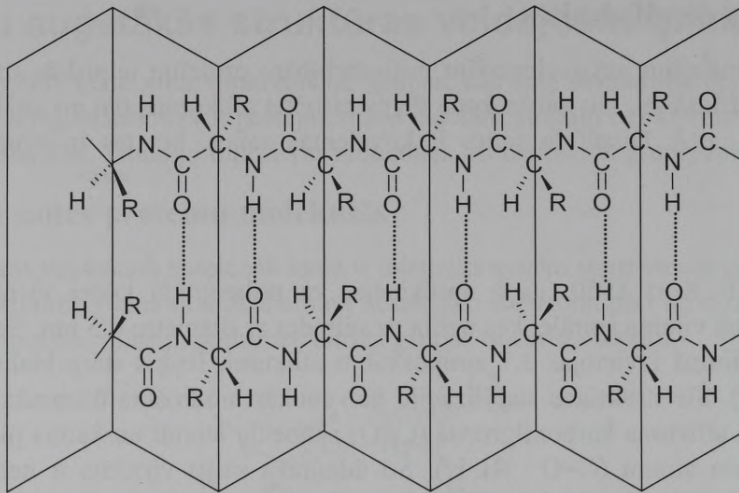
Vienas proteīna ķēdes spirālē polārās aminoskābju grupas vērstas uz ārpusi, savukārt nepolārās grupas cenšas izvietoties tās iekšienē. Hidrofobā vidē grupu orientācija ir pretēja, piemēram, membrānās iebūvēto proteīnu  $\alpha$ -spirāles posmiem. Spiralizētā struktūra raksturīga globulāriem (kamolveida) proteīniem.



2.3. att. Polipeptīda labējā spirāle

## 2.2.6. $\beta$ -struktūra

Polipeptīdu ķēdes var izkārtoties paralēli cita citai izlocītas lapas formā, ko sauc par  $\beta$ -struktūru. Atsevišķas polipeptīda ķēdes saista daudzas ūdeņraža saites, bet telpiski lielās sāngrupas novietotas virs vai zem plaknes (sk. 2.4. att.).



2.4. att. Polipeptīdu ķēžu  $\beta$ -struktūra

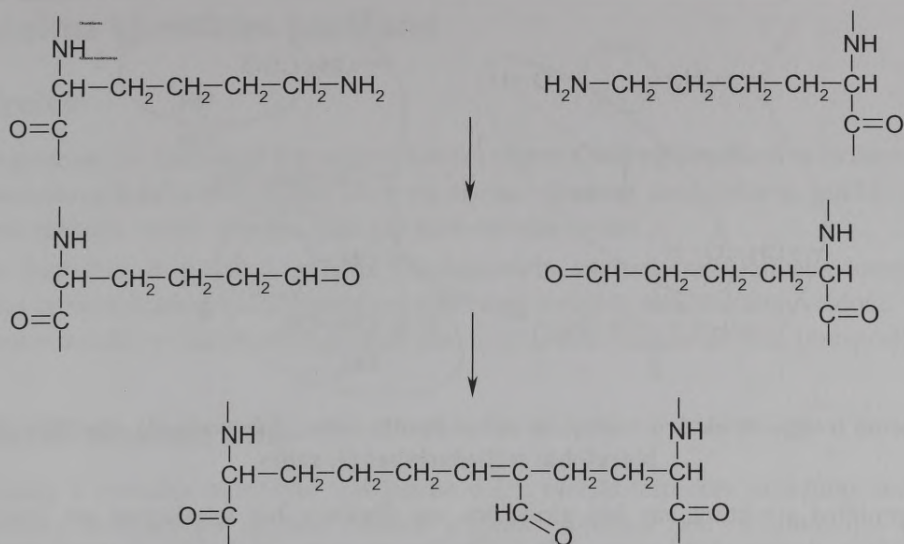
Ķēžu virziens var būt paralēls vai antiparalēls (N un C polipeptīdu gali sakrīt vai nesakrīt). Paralēlais vērsums veidojas, sakārtojoties vairākām ķēdēm vai vienas un tās pašas ķēdes tālu novietotiem posmiem, antiparalēlo virzienu veido tuvu novietoti posmi. 2.4. attēlā parādīts divu ķēžu pretējs vērsums.

$\beta$ -struktūrai nebūt nav jābūt plakanai, augstākajās struktūrās tā var būt savērpta. Šī struktūra vairāk raksturīga fibrilāriem (diegveida) proteīniem, piemēram, matu un ragvielu  $\beta$ -keratīnam, zīda  $\beta$ -fibroīnam.

Polipeptīda ķēde proteīnā neveido monotoni vienu un to pašu struktūru, spiralizētam posmam var sekot nespiralizēts iecirknis, un tam – atkal jauna spirāle vai  $\beta$ -struktūra.

### 2.2.7. Kolagēna spirāle

Viens no izplatītākajiem proteīniem dzīvnieka organismā ir kolagēns (līdz 30%). Kolagēna šķiedras veidotas no tropokolagēna, kurā 1/3 no aminoskābēm ir glicīns un 1/5 – prolīns un tā hidroksilatvasinājums – hidroksiprolīns. Šis proteīns satur arī daudz 5-hidroksilizīna, ar kura hidroksilgrupām ar  $\beta$ -glikozīdisko saiti saistīts kolagēna disaharīds Glc-1,2- $\alpha$ -Gal. Trīs polipeptīda ķēdes spirāles, kas katra satur ap 1000 aminoskābju, savērptas trīskāršā virrspirālē. Aminoskābju sāngrupas vērstas uz ārpusi. Atsevišķas spirāles saistās savā starpā ar lizīna oksidācijas līdz aldehīdam un tā kondensācijas ar cita lizīna  $\epsilon$ -aminogrupu krotonā kondensācijas tipa produktiem (sk. 2.5. att.). Kolagēnā prolīns un lizīns ir hidroksilēti. Pie šīm hidroksilgrupām saistās ogļhidrātu komponentes. Hidroksilēšanas enzīmiem nepieciešams vitamīns C. Tā trūkums izsauc saistaudu veidošanās traucējumus, kas rada asinsvadu sienu, kaulaudu un zobu bojājumus, pazīstamus kā cingu jeb skorbutu.



2.5. att. Tropokolagēna saistība ar lizīna oksidācijas un kondensācijas produktu

## 2.3. Fibrilāro un globulāro proteīnu otrējā struktūra

Proteīnus klasificē dažādi atkarībā no klasifikācijas mērķa. Viens no veidiem ir tos klasificēt pēc molekulas telpiskās formas – fibrilāros (diegveida) un globulāros proteīnos. Molekulas formai ir būtiska nozīme tās funkciju nodrošināšanai šūnās un audos.

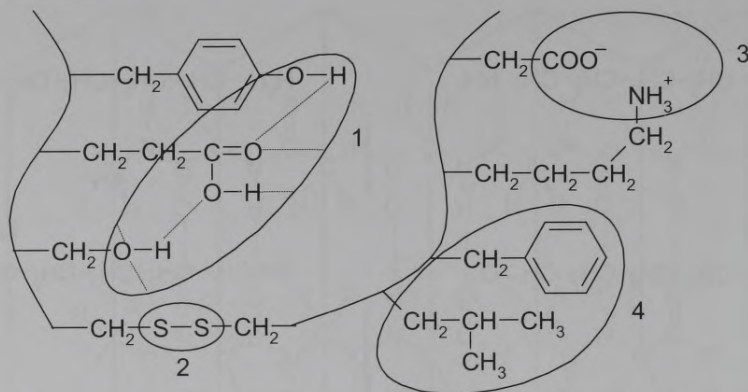
Otrējā struktūra ir ļoti būtiska fibrilāros proteīnos – nešķīstošos proteīnos, kas veido garas šķiedras vai plāksnes. Piemēram, vilna, mati, nagi veidoti no fibrilāriem proteīniem – keratīniem, kas sastāv no  $\alpha$ -spirālēm. Keratīnā divas  $\alpha$ -spirāles ir savērtas kopā mazās šķiedrās, kuras savukārt savērtas lielākos kūļos. Cietība, lokanība un izturība pret stiepi ir atkarīga no disulfīda saišu skaita, kas saista atsevišķos kūļus kopā. Piemēram, nagos disulfīda saites nodrošina kūļu fiksāciju.

Dabīgais zīds un zirnekļa tīkls ir veidots no fibroīna, kuru pilnībā veido  $\beta$ -loksnes ar ļoti mazām sāngrupām (glicīna un alanīna), lai nodrošinātu blīvu sapakojumu.

Globulārie proteīni šķīst ūdenī vai sāļu šķīdumos. To ķēdes ir sapakotas kompaktas globulas formā. Globulu struktūra ir atkarīga no proteīna bioķīmiskajām funkcijām, un tā nav tik regulāra kā fibrilārajos proteīnos. Parasti globulārajos proteīnos ir gan  $\alpha$ -spirāles, gan  $\beta$ -loksnes. Uz globulas ārpusi orientēti hidrofilie aminoskābju atlikumi, kas nodrošina proteīna šķīdību ūdenī, turpretī hidrofobās grupas vērstas uz iekšpusi un veido globulas kodolu.

## 2.4. Proteīnu trešējā struktūra

Aplūkoto  $\alpha$  un  $\beta$  struktūru noteikts savstarpējais telpiskais novietojums ir trešējā struktūra, kura nodrošina proteīnam specifisko telpisko formu. Šīs struktūras veidošanā piedalās aminoskābju sāngrupu veidotās nekovalentās saites, dažas no tām parādītas 2.6. att. Atšķirībā no otrējās struktūras, kuras formu galvenokārt noteica ( $>\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}<$ ) ūdeņraža saites, trešējās struktūras formu nosaka mijiedarbība starp aminoskābju sāngrupām. Tomēr katra proteīna trešējo struktūru būtībā nosaka aminoskābju secība – pirmējā struktūra.



2.6. att. Proteīnu trešējo struktūru veidojošās nekovalentās saites. Ūdeņraža (1), disulfīda (2), jonu (3), hidrofobās mijiedarbības (4) saites

Trešējā proteīna struktūra var būt globulāra vai fibrilāra, bet iespējamas arī jauktās formas. Jauktas struktūras piemērs, kurā viena daļa ir fibrilāra un otra – globulāra, ir muskuļaudu miozīns.

Trešējo struktūru var veidot ne tikai polipeptīda ķēde, bet arī polipeptīda ķēde, kura saistīta ar neproteīnu dabas savienojumiem (sk. 2.1. tab.).

2.1. tabula

#### Komplekso proteīnu piemēri

Proteīna klase	Prostētiskā grupa	Piemērs
Glikoproteīni	Ogļhidrāti	Šūnas membrānas glikoproteīni, siekalu glikoproteīni
Hemoproteīni	Hems, hemīns	Hemoglobīns, mioglobīns, citohromi
Lipoproteīni	Lipīdi	Liela un maza blīvuma lipoproteīni
Metaloproteīni	Metāla jons	Citohromoksidāze, kas satur varu
Nukleoproteīni	Nukleīnskābes (DNS, RNS)	Hromosomas, ribosomas
Fosfoproteīni	Fosfāta grupa	Piena kazeīns

## 2.5. Proteīnu ceturtējā struktūra

Ceturtējā – kopēja trīsdimensionāla struktūra veidojas, asociējoties vairākām polipeptīdu ķēdēm. Individuālos proteīnus satur kopā tās pašas nekovalentās mijiedarbības, kas veido trešējo struktūru. Dažreiz to veidošanā piedalās arī kovalentās saites starp brīvām aminogrupām un karboksilgrupām, kuras nepiedalās peptīda ķēdes veidošanā. Tipiski piemēri ir hemoglobīns un kolagēns. Veidojoties saistībai starp subdaļiņām, daļēji mainās to individuālās īpašības – parādās kooperatīvais efekts.

Hemoglobīnu veido divi individuālu proteīnu pāri: divas  $\alpha$  ķēdes ar 141 aminoskābi katrā un divas  $\beta$  ķēdes ar 146 aminoskābēm katrā, kuras kopā notur hidrofobā mijiedarbība. Katra ķēde satur hemu, kas saista skābekli, līdz ar to kopā viena hemoglobīna molekula var saistīt četras molekulas skābekļa.

Tropokolagēna subdaļiņas veidošanās arī ir ceturtējās struktūras piemērs, kur to veido tropokolagēna subdaļiņas, kurām pašām jau ir sava ceturtējā struktūra. Tāpēc kolagēna molekulas ceturtējo struktūru var uzskatīt par ceturtējo virsstruktūru vai arī par piektējo struktūru. Dzīvā organismā varam saskatīt vēl augstākus strukturālos līmeņus.

Kaulos uz tropokolagēna molekulām veidojas kalcija hidroksiapatīta  $[Ca_5(PO_4)_3OH]$  kristāli, nodrošinot molekulu orientāciju.

## 2.6. Proteīnu ķīmiskās īpašības

### 2.6.1. Hidrolīze

Jebkuru proteīnu var hidrolizēt līdz aminoskābēm reakcijā, kura ir pretēja tā veidošanai. Hidrolīzes norisei nepieciešams katalizators: skābe, bāze vai enzīms. Enzīmu izmantošanas priekšrocība ir tā, ka šajā gadījumā reakcija notiek neitrālā vidē vai tuvu neitrālai videi.

Proteīnu hidrolīze ir galvenā reakcija olbaltumvielu sagremošanai cilvēka kuņģī un zarnās veselas rindas enzīmu ietekmē, kas samērā selektīvi šķeļ noteiktu aminoskābju veidotās peptīdsaites. Sagremošanas rezultātā veidotās aminoskābes pēc tam uzsūcas asinīs un tiek transportētas uz audu šūnām.

### 2.6.2. Proteīnu denaturēšanās

Denaturācija ir proteīna ceturtējās, trešējās un daļēji otrējās telpiskās struktūras neatgriezeniska vai atgriezeniska noārdīšanās dažādu faktoru ietekmē. Dažreiz pēc denaturācijas proteīns var renaturēties, bet tas notiek reti, jo denaturācija bieži saistīta ar koagulāciju – proteīna molekulu salīpšanu. Denaturāciju izsauc visi faktori, kuri var ietekmēt nekovalentās saites, un tādējādi izraisīt proteīna fizikālo, ķīmisko īpašību un bioloģiskās aktivitātes izmaiņu. Bieži denaturēšanās saistīta arī ar vienlaicīgu proteīna šķīdinātāji samazināšanos. Denaturēšanos izraisa sildīšana, mehāniska maisīšana, virsmas aktīvas vielas, organiskie šķīdinātāji, vielas, kas veido stipras ūdeņraža saites, piemēram, urīnviela, ievērojama vides pH izmaiņa, neorganiskie sāļi, augstas enerģijas starojums.

**Sildīšana** – vājās nekovalentās saites var pārtrūkt siltumkustības ietekmē temperatūrā, kas augstāka par 50 °C.

**Mehāniska maisīšana** – tipisks piemērs ir olas baltuma sakulšana; gaisa burbuļi izsauc proteīnu molekulu saistīšanos ar gaisa burbuļu ietvērumiem.

**Virsmas aktīvas vielas** – virsmas aktīvas vielas, samazinot ūdens un hidrofobas vielas robežvirsmas spraiguma samazināšanos, izjauc hidrofobās saites. Uz to pamatojas arī ziepju dezinficējošās īpašības.

**Organiskie šķīdinātāji un organiskie savienojumi** – polāri šķīdinātāji, piemēram, acetons, metanols, konkurē ar aminoskābju polārām sāngrupām ūdeņraža saišu veidošanā. Tāpēc medicīnā etanolu izmanto ādas dezinfekcijai pirms injekcijas. Arī urīnviela, kas veido stipras ūdeņraža saites, konkurē ar aminoskābēm ūdeņraža saites veidošanā. Urīnvielu satur arī košļājamā gumija.

**pH izmaiņa** –  $H^+$  (patiesībā  $H_3O^+$ ) vai  $OH^-$  jonu pārkums izmaina olbaltumvielas lādiņu, kas ietekmē arī ūdeņraža saišu veidošanās iespēju.

**Stiprie elektrolīti** ietekmē jonu saites un ar jonu spēka izmaiņu arī proteīna grupu jonizācijas pakāpi. Jonu elektriskie lauki izraisa arī saišu papildu polarizāciju.

**Augstas enerģijas starojums** var sagraut pat kovalentās saites, ne tikai vājās nekovalentās saites, kā arī ierosināt ķīmiskās reakcijas starp proteīna komponentiem ar lielu aktivācijas enerģiju.

**Denaturācija** var būt **atgriezeniska** un **neatgriezeniska**. Ja denaturācijā notikušas kovalento saišu izmaiņas, tad tā ir neatgriezeniska. Ja denaturācijā izmainās tikai nekovalentās saites, tad ir iespējama struktūras atjaunošana, tomēr denaturācijā izveidojas jaunas nekovalentās saites, kuras nav raksturīgas attiecīgajam proteīnam, bet ir termodinamiski un kinētiski izdevīgākās konkrētajos apstākļos. Bez tam darbojas entropijas faktors, jo denaturācijā palielinās proteīna entropija (veidojas visvarbūtīgākā struktūra), un visi procesi dabā vērsti uz entropijas palielināšanos. Proteīna biosintēze ir entropiski pretējs process. Bioloģisko aktivitāti nodrošina tikai viena proteīna telpiskā konstrukcija, bet tam pastāv iespējas veidot ļoti daudzas varbūtīgas struktūras, tāpēc denaturēta proteīna patvaļīga struktūras atjaunošanās ir process ar statistiski mazu varbūtību. Renaturēšanos veicinošs faktors ir proteīna pirmējā struktūra.

Bieži literatūrā denaturāciju lieto kā proteīnu inaktivācijas sinonīmu. Taču tas ne vienmēr ir viens un tas pats. **Denaturācija** ir molekulas konformācijas izmaiņas, kas izraisa atgriezenisku vai neatgriezenisku bioloģiskās funkcijas zaudēšanu. **Inaktivācija** ir plašāks process, kurā bez denaturācijas notiek makromolekulu mijiedarbība vai funkcionālo grupu modifikācija, kas arī (vai tikai tā) izraisa proteīna inaktivāciju. Tāpēc jārunā par inaktivāciju, ja speciāli noskaidrots, ka nav notikušas izmaiņas pirmējā struktūrā vai tās agregatizācija ar citām vielām, un tikai tad var teikt, ka notikusi denaturācija. **Neatgriezeniska denaturācija** – tādas olbaltumvielas struktūras izmaiņas, kuras ilgā (stundas vai dienas) laikā pēc denaturējošās ietekmes noņemšanas neatgriežas iepriekšējā funkcionālās aktivitātes stāvoklī. **Termodinamiska neatgriezeniska denaturācija** – proteīns no dabīgā stāvokļa ar **lokālo** brīvās enerģijas minimumu pāriet denaturētā stāvoklī ar **globālo** brīvās enerģijas minimumu. **Kinētiska, neatgriezeniska denaturācija** – proteīns no dabīgā stāvokļa ar **globālo** brīvās enerģijas minimumu pāriet denaturētā stāvoklī ar **lokālo** brīvās enerģijas minimumu. Abi šie stāvokļi atdalīti ar augstu renaturācijas barjeru  $\Delta G^\ddagger$ , kas kavē proteīna ātru renaturāciju, lai gan  $\Delta G_{\text{denat}} > 0$ . Proteīns var renaturēties, bet tas notiek tik lēni, ka novērojuma laikā to nevar konstatēt.

### 2.6.3. Proteīnu skābes un bāzes īpašības

Proteīni satur gan vairākas karboksilgrupas, gan aminogrupas, tāpēc proteīnus var uzskatīt par polimēriem ar vairākām pretēji lādētām grupām – poliamfolītu. Līdzīgi aminoskābju gadījumam stipri skābā vidē būs protonētas gan aminogrupas, gan karboksilgrupas. Palielinot pH, notiek protona atšķelšana no karboksilgrupas, tai veidojot karboksilāta anjonu. Katram proteīnam, tāpat kā aminoskābēm, ir pH vērtība, pie kuras tam nebūs lādiņa (pozitīvi un negatīvi lādēto grupu vienāds daudzums). Tas ir proteīna izoelektriskais punkts pI. Pie  $\text{pH} > \text{pI}$  notiek protona atšķelšanās no aminoskābes amonija jona. Pie augstas pH vērtības proteīnā ir tikai negatīvi lādētas grupas. Proteīns visvieglāk denaturējas tad, kad tam nav lādiņa ( $\text{pH} = \text{pI}$ ), jo nepastāv vienādi lādētu daļiņu atgrūšanās un pretējas zīmes lādiņu saistīšanās. Proteīna pI var noteikt elektroforēzē, izmantojot **izoelektrisko fokusēšanu**: ja starp elektrodiem izveido pH gradientu, tad proteīni elektroforegrammā pārtrauc pārvietoties tajā vietā, kur  $\text{pH} = \text{pI}$ .

## 2.7. Apkopojums

**Pirmējā struktūra** – aminoskābju sastāvs un to secība polipeptīda ķēdē. Aminoskābju saistību nodrošina kovalentās peptīdsaites, kas noārdās tikai hidrolīzē skābju, bāzu vai enzīmu klātienē.

**Otrējā struktūra** – polipeptīda ķēdes telpiskais izkārtojums  $\alpha$  spirāles vai  $\beta$  struktūras veidā, kuru stabilizē ūdeņraža saites un nepolāro aminoskābju hidrofobā mijiedarbība.

**Trešējā struktūra** – otrējās struktūras elementu  $\alpha$  un  $\beta$  struktūru noteikts savstarpējais telpiskais novietojums, kas nodrošina proteīnam specifisko telpisko formu. To stabilizē nekovalentās iedarbības un disulfīda saites.

**Ceturtnējā struktūra** – divu vai vairāku proteīnu kompleksa telpiskā struktūra, ko stabilizē aminoskābju atlikumu nekovalentā mijiedarbība.

## 3. Enzīmi

**Enzīmi** (fermenti) ir dzīvos organismos notiekošo reakciju katalizatori. Mūsdienās zināmi gandrīz 2000 enzīmu. Daudzas enzīmu katalizētas pārvērtības notiek pārtikas produktos un izraisa uztura bojāšanos, vai arī tiem ir pozitīvs efekts. Nozīmīgas šīs parādības izpausmes ir augļu un dārzeņu nogatavošanās, gaļas un piena produktu novecošanās, mīklas rūgšana, alkoholisko dzērienu iegūšana rūgšanas procesos u. c.

Enzīmu deaktivēšanos vai aktivitātes un sadalījuma izmaiņu šūnu daļās pārtikas uzglabāšanas un termiskas apstrādes laikā izmanto par selektīvu indikatoru pārtikas produktu tehnoloģiju kontrolē, piemēram, piena, alus un medus pasterizācijas novērtēšanai, svaigas gaļas vai zivju atšķiršanai no dziļi un ilgstoši sasaldētās.

Pārtikas ķīmiķi enzīmu īpašības izmanto pārtikas tehnoloģijā un jaunu enzimātisko pārtikas analīzes metožu izstrādāšanā.

### 3.1. Enzīmu uzbūve

**Enzīmi** lielākoties ir globulāri **proteīni** ar dažādu molekulas vai to savienojumi ar citām neproteīnām vielām. Izņēmums ir ribozīdi, mazas katalītiskas RNS molekulas, kuras katalizē dažas nukleīnskābju pārvērtības. Enzīmu molekulu telpiskā uzbūve pakļaujas iepriekš apskatītajiem proteīnu augstāko struktūru veidošanās principiem. Lielākie enzīmi parasti sastāv no divām un vairākām proteīnu ķēdēm, un tiem ir ceturtējā struktūra. Tas ir cēlonis izoenzīmu – dažāda sastāva enzīmu, kuri katalizē vienu un to pašu reakciju, – esamībai. Tie atšķiras ar savu stabilitāti un katalītisko aktivitāti. Enzīma daļu, kas veido saistību ar substrātu un katalizē reakcijas norisi, sauc par aktīvo centru. No vairākām subvienībām veidotam enzīmam var būt vairāki aktīvie centri pat ar dažādu darbību.

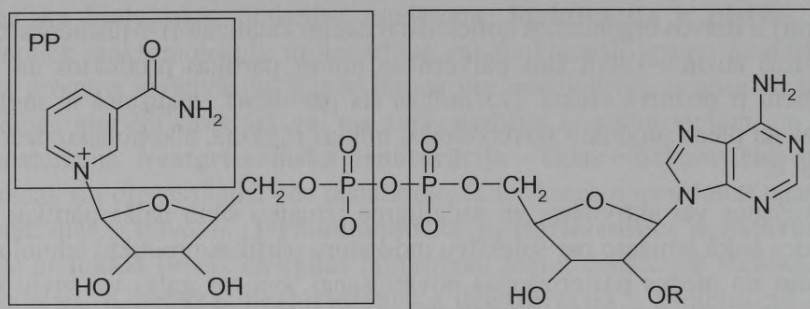
#### 3.1.1. Kofaktori

Atšķirībā no enzīmiem-proteīniem, kurus veido tikai aminoskābes, pastāv ļoti daudz enzīmu, kuru darbības mehānismā piedalās “neolbaltumvielu” komponentes, bez kurām tie nevar funkcionēt. Šīs komponentes sauc par **kofaktoriem** vai **koenzīmiem**. Proteīnam pievienojot vēl citas grupas, palielinās iespējamās mijiedarbības iespējas ar substrātu, ko vairs neierobežo tikai aminoskābju atlikumu veids un skaits. Tāda enzīma polipeptīda daļu sauc par **apoenzīmu**, un tā nodrošina substrāta orientāciju. Visbiežāk kofaktors novietots enzīma trešējās struktūras dobumā un saistīts ar apoenzīmu ar nekovalentām saitēm, tomēr dažreiz realizējas kovalentā saistība vai metāla jonu gadījumā – koordinatīvā saistība. Ja kofaktors saistīts ar nekovalentām saitēm, tad tas viegli var atdalīties, tomēr, tā kā koenzīma saistības ar apoenzīmu saišu enerģija ir ekvivalenta proteīna struktūru veidojošo nekovalento mijiedarbību saišu enerģijai, tad, atdalot koenzīmu, denaturējas arī apoenzīms. Kovalenti saistīta kofaktora atdalīšanās nav iespējama. Viena un tā paša kofaktora saistība dažādos enzīmos var būt atšķirīga.

Daudziem enzīmiem kā kofaktori nepieciešami dažādu metālu joni, kas izskaidro organisma nepieciešamību pēc mikroelementiem: dzelzs, cinka, vara, mangāna, molibdēna, kobalta, niķeļa, vanādijs un selēna joniem. Šie joni veido koordinatīvās saites, saistot substrātu aktīvajā centrā vai piedaloties reakcijas norisē. Piemēram, karboksipeptidāze-A satur  $Zn^{2+}$ , kurš saistās aktīvajā centrā (His-69, Glu-72 un His-196) un pie kura piesaistās substrāts.  $Mg^{2+}$  jons aktivē enzīmus, kuri katalizē fosfātu esteru un fosfātu anhidrīdu saišu hidrolīzi un veidošanos. Redokssistēmās nozīmīga ir  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  jonu sistēma ar plašu redokspotenciālu skalu atkarībā no porfīnu vai proteīnu ligandu dabas. Oksidāžu sastāvā satopama arī  $Cu^{2+}/Cu^{+}$  sistēma.

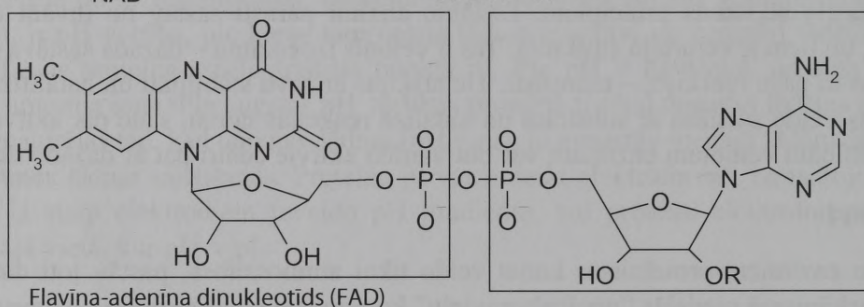
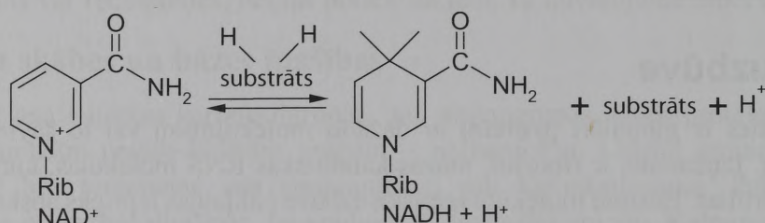
Koenzīmu  $NAD^{+}$  (nikotīnamīdadenozīndinukleotīdu) vai  $NADP^{+}$  (nikotīnamīdadenozīndinukleotīda fosfātu) saturošas dehidrogenāzes atšķēļ no substrāta un pievieno divus elektronus un vienu protonu, otrs protons paliek vidē (samazinās pH). FAD saturošas dehidrogenāzes atšķēļ

no substrāta un pievieno gan abus elektronus, gan protonus. Reducētas dehidrogenāzes savukārt ir reducētājas (sk. 3.1. att).

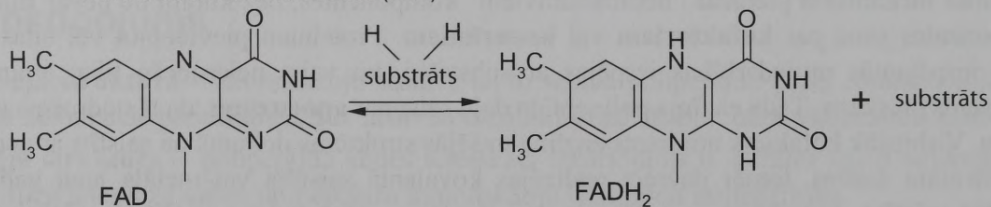


R = H Nikotīnamīda-adenīna dinukleotīds (NAD<sup>+</sup>)

P = PO<sub>3</sub>H<sup>-1</sup> Nikotīnamīda-adenīna dinukleotīda fosfāts (NADF<sup>+</sup>)



Flavīna-adenīna dinukleotīds (FAD)



3.1. att. Dehidrogenāžu koenzīmu NAD<sup>+</sup>, NADF<sup>+</sup> un FAD struktūra un darbība

Koenzīmam ir būtiska loma arī substrāta – enzīma kompleksa veidošanā tā aktīvajā centrā. Koenzīmi – metāla joni ar koordinatīvām saitēm – kā ligandus var saistīt gan substrātu, gan apoenzīmu veidojošo aminoskābju atlikumus.

### 3.1.2. Vitamīni kā kofaktori

Jau ilgi pirms tika izprasta vitamīnu loma, novērojot, ka organismam nepieciešamas dažas organiskās vielas ļoti mazos daudzumos, bet to trūkums izsauc smagas saslimšanas: cingu, pelagru, kaulu deformāciju vai trauslumu, dermatītu, vispārēju novājināšanu u. c.

Par koenzīmiem galvenokārt kalpo ūdenī šķīstošie vitamīni. Koenzīma loma no taukos esošiem vitamīniem droši pierādīta tikai augu un dzīvnieku valsts produktu sastāvā izplatītajam Q vitamīnam.

Nosaukums “vitamīns” cēlies vēsturiski, jo pirmais izdalītais vitamīns – tiamīns (vitamīns B<sub>1</sub>) bija amīns, tāpēc radās salikums no “vita” – dzīve un “amīns”. Taču nebūt ne visi vitamīni pieskaitāmi

amīniem, piemēram, askorbīnskābe (vitamīns C) nesatur amīna grupu un pat ne slāpekli. Vitamīnus pēc to šķīdības ūdenī vai nepolāros šķīdinātajos iedala ūdenī šķīstošos un taukos šķīstošos vitamīnos. Vitamīnu apzīmēšanai izmanto to ķīmiskos nosaukumus un apzīmējumu ar burtiem, kuriem dažreiz pievieno ciparu vai triviālo nosaukumu.

3.1. tabula

### Ūdenī šķīstošie vitamīni

Vitamīns	Loma	Avoti	Deva, mg	Hipovitaminoze	Hipervitaminoze
Tiamīns (B <sub>1</sub> )	Dekarboksilāžu koenzīms	Piens, gaļa, maize, pākšaugi	1,5	Muskuļu vājums, kardiovaskulāra saslimšana, sirds slimība, beri-beri	Zems asinsspiediens
Riboflīvs (B <sub>2</sub> )	Koenzīmos FAD un FMN	Piens, gaļa	1,7	Ādas un gļotādas bojājumi	Niezošana, dzinkstoņa ausīs
Niacīns, nikotīnskābes amīds (B <sub>3</sub> )	Koenzīmos NAD <sup>+</sup> un NADF <sup>+</sup>	Gaļa, maize, kartupeļi	2,0	Nervu sistēmas, kuņģa-zarnu trakta, ādas, gļotādu bojājumi, pelagras izraisīšana	Niezoša, dedzinoša sajūta, asinsvadu paplašinājumi, nāve no pārmērīgi lielām dozām
Piridoksīns (B <sub>6</sub> )	Aminotransferāzes koenzīmā	Gaļa, pākšaugi	2,0	Aizkavēta augšana, anēmija, konvulsijas, epilēzija izmaiņas	Centrālās nervu sistēmas izmaiņas, pat neatgriezeniskas
Folskābe	Viena un divu oglekļa atomu fragmentu transferāžu koenzīmos	Dārzeņi, zemenes, graudi, maize	0,4	Aizkavēta augšana, anēmija, kuņģa un zarnu trakta bojājumi	Reti sastopama, izņemot pārmērīgas dozām
Kobalamīns (B <sub>12</sub> )	Metilgrupu transferāžu koenzīmos	Piens, gaļa	0,006	Postoša anēmija	Eritrocītu pārlieku liels daudzums
Biotīns (H)	Karboksilāžu koenzīmos	Olas, gaļa, dārzeņi	0,3	Nogurums, sāpes muskuļos, slikta dūša, dermatīti	Nav raksturīga
Pantotēnskābe (B <sub>5</sub> )	Koenzīma A un palmitāta sintāzē	Piens, gaļa	10	Aizkavēta augšana, centrālās nervu sistēmas darbības traucējumi	Nav raksturīga
Askorbīnskābe (C)	Hidrīdjonu pārnēsēja koenzīmos, antioksidants	Citrusaugļi, upenes, brokoļi, dažādi zaļumi	60	Epilēzija un gļotādu bojājumi, cingas izraisīšana	Zarnu akmeņi

## 3.2. Enzīmu katalītiskā aktivitāte un darbības mehānisms

Enzīmu raksturīga iezīme ir to lielā efektivitāte, piemēram, katalāze paātrina ūdeņraža peroksīdu sadalīšanos  $3 \times 10^{11}$  reizes, bet labākais šīs reakcijas neorganiskais katalizators – platīns – tikai 20 000 reižu. Saharozes hidrolīze (invertēšanās) ar invertāzi notiek  $10^{10}$  reižu ātrāk nekā ar skābi. Eļļas kvalitātes pazemināšanā būtiskā oleīnskābes oksidēšanās  $10^7$  reizes paātrinās lipogēnes klātienē, kamēr vara joni to paātrina tikai 102 reizes, salīdzinot ar tīru eļļu. Kazeīna hidrolīze tripsīna klātienē paātrinās  $2,1 \times 10^6$  reižu, salīdzinot ar skābes katalīzi. Šādas aktivitātes nodrošināšanai *in vitro* nepieciešamā enzīma koncentrācija ir tikai no  $10^{-8}$  līdz  $10^{-6}$  mol/L.

Enzīmu lielā aktivitāte izskaidrojama:

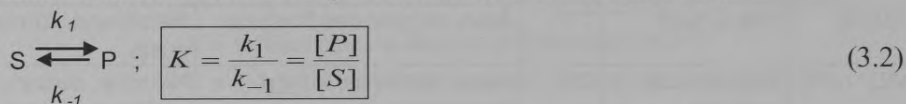
- pirmkārt, ar koncentrācijas faktoru – enzīms adsorbē vielu uz sava aktīvā centra virsmas, palielinot tā koncentrāciju tūkstošiem reižu, t. i., enzīms satuvina reaģējošās molekulas;
- otrkārt, enzīmi uzrāda orientējošu efektu: substrāta molekulas orientējas reakcijai labvēlīgā sakārtojumā. Tas krasi palielina reakcijas centru sadursmes iespējamību un izraisa koeficienta A palielinājumu reakcijas ātruma konstantes izteiksmē, kas analogs ar koncentrācijas palielināšanos ķīmiskā reakcijā (3.1):

$$v = -k \cdot C_s = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (3.1)$$

- treškārt, enzīms samazina reakcijas aktivācijas enerģiju, piemēram, katalāze samazina ūdeņraža peroksīda sadalīšanās aktivācijas enerģiju ( $E_a$ ) no 75 uz 26,8 kJ  $\times$  mol<sup>-1</sup>, un lipooksigenāze – no 150... 270 uz 16,7 kJ  $\times$  mol<sup>-1</sup>;
- ceturtkārt, un visbūtiskākais, enzīmiem piemīt polifunkcionāls efekts, kurš pieļauj vienlaicīgu vai secīgu vairāku enzīma funkcionālo grupu iedarbību uz pārveidojamo saiti substrātā.

Reaģentu tuvināšanas (koncentrēšanas), orientācijas un polifunkcionālās darbības efekti ir tie faktori, kas nosaka enzīmu ļoti lielo katalītisko aktivitāti salīdzinājumā ar neorganiskajiem katalizatoriem.

Enzīms palielina tiešās ( $k_1$ ) un atgriezeniskās ( $k_{-1}$ ) reakcijas ātruma konstantes, bet tas nespēj izmainīt to attiecību, kas reakcijās nosaka līdzsvara konstanti  $K$ .



kur  $[P]$  un  $[S]$  – produkta un substrāta līdzsvara koncentrācija.

Katrs enzīms katalizē savu reakciju. Pazīstama tikai neliela enzīmu daļa, kura katalizē noteiktu reakciju grupu, kas saistīta ar biopolimēru veidošanos vai sašķelšanu.

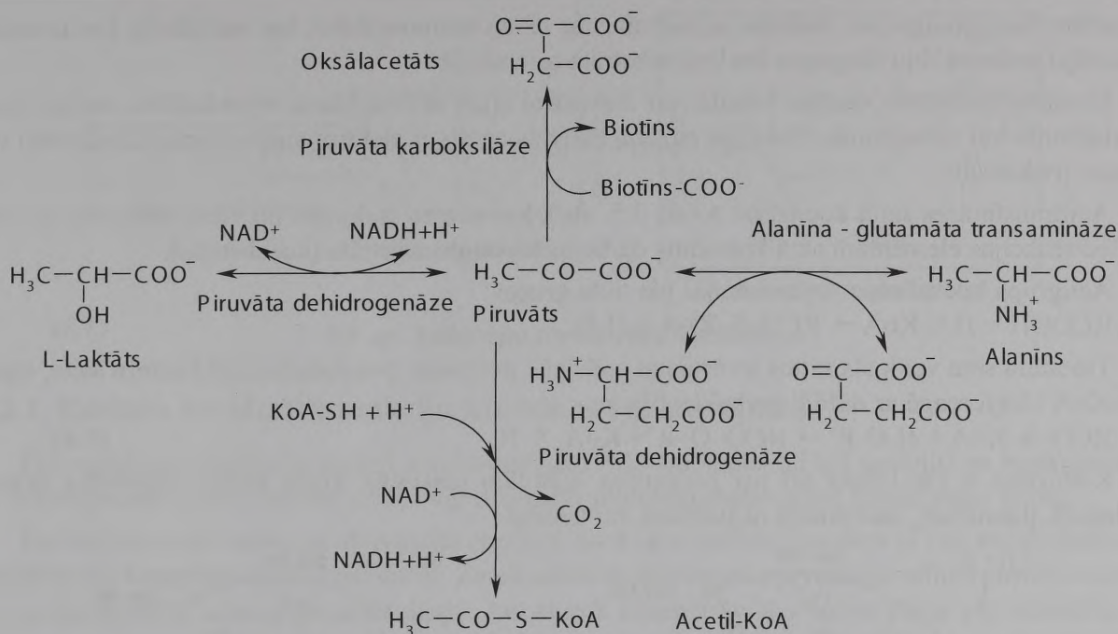
Dabā vielu pārvērtības veido sarežģītas reakciju ķēdes, kurās vienas reakcijas produkts ir otras substrāts, tāpēc reakcijām jābūt specifiskām, lai nebūtu traucējumu no blakus notiekošiem procesiem.

**Aktīvais centrs** ir enzīma daļa, parasti dobums tā trešējā struktūrā, kas tieši piedalās mijiedarbībā ar substrātu. Tas sastāv no vairāku aminoskābju atlikumiem, turklāt tās var piederēt savstarpēji attālinātiem polipeptīdu ķēdes posmiem. Dažreiz aktīvā centra iekšienē izdala vēl katalītisko centru, ja substrāta molekula ir liela un tās saistīšanās piedalās lielāks grupu skaits. Tādā gadījumā ar katalītisko centru saprot to daļu, kas tieši piedalās reakcijā. Saka, ka substrāts atbilst enzīmam kā atslēga slēdzenī. Būtībā process ir sarežģītāks, jo, saistoties ar substrātu, veidojas jaunas nekovalentas saites, kas neizbēgami izraisa enzīma struktūru veidojošo saišu izmaiņas, tāpēc saistīšanās momentā tiek deformētas gan substrāta, gan enzīma saites. Enzīma telpiskā struktūra kopā ar saistīto substrātu atšķiras no tās pirms saistīšanās. Par to liecina arī enzīma lielāka termiskā stabilitāte substrāta klātienē.

**Enzīma specifiskums** ir tā spēja katalizēt tikai specifiska substrāta pārvērtības vai arī specifiskas reakcijas vai reakciju grupas. Piemēram, katalāze var veicināt tikai ūdeņraža peroksīda sadalīšanos par ūdeni un skābekli, trombīns var hidrolizēt tikai arginīna veidoto peptīdsaiti fibrinogēnā asins sarecēšanas laikā, tripsīns – tikai bāzisko aminoskābju lizīna un arginīna karboksilgrupas veidoto peptīdu saišu hidrolīzi. Karboksipeptidāze spēj hidrolizēt jau vairāku aminoskābju veidotās peptīdsaites polipeptīda C galā. Papaīns, kuru izdala no augiem, var hidrolizēt gandrīz jebkuru peptīdsaiti.

Enzīmos, kuri piedalās biopolimēru noārdīšanās vai veidošanās procesā, parasti novēro grupas specifiskumu: tie katalizē noteiktas funkcionālās grupas (glikozīdās, peptīdu vai fosfora diestera saites) hidrolīzi vai veidošanos. Enzīmiem, kuri katalizē mazmolekulāru vielu (monosaharīdu, aminoskābju, hidroksiskābju un oksoskābju, nukleīnskābju bāzu pārvērtības) raksturīgs substrāta specifiskums, jo tie katalizē tikai attiecīgā savienojuma pārvērtības, bet neuzrāda aktivitāti pret citu substrātu. Būtībā specifisks ir ne tikai substrāts, bet arī reakcijas, tāpēc arī enzīmus klasificē pēc to katalizētās reakcijas.

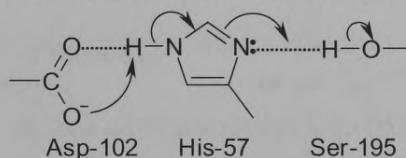
Viens un tas pats substrāts kopā ar dažādiem kosubstrātiem var būt kopējs vairākiem enzīmiem, kuri katalizē dažādas pārvērtības (sk. 3.2. att.). Attēlā parādīts piruvāta metabolisms: reducēšanās par laktātu, oksidēšanās, dekarboksilēšanās un saistīšanās ar koenzīmu-A, veidojot acetil-KoA, un pāraminēšanās ar glutamātu par alanīnu.



### 3.2. att. Piruvāta pārvērtības enzīmu katalizētās reakcijās

Katalizators (enzīms), tāpat kā visi reaģenti, piedalās reakcijā, tikai atšķirībā no tiem tas procesa beigū fāzē reģenerējas neizmainītā formā.

Apskatīsim himotripsīna darbību, kurš piedalās olbaltumvielu peptīdsaišu hidrolīzē zarnās. Tā aktīvo centru veido telpiski tuvinātas triju aminoskābju sāngrupas: histidīna (His-57), asparagīnskābes (Asp-102) un serīna (Ser-195) (skaitlis pie aminoskābes saīsinātā apzīmējuma norāda tās vietu polipeptīda ķēdē), kuras katalīzes sākumā veido lādiņa pārnese kompleksu (sk. 3.3. att.).



### 3.3. att. Kompleksa veidošanās himotripsīna aktīvajā centrā

Jonizētā asparagīnskābe veido ūdeņraža saiti ar histidīna imidazola N-H grupu, un rezultātā protons pāriet pie asparagīnskābes. Tas palielina imidazola cikla negatīvo lādiņu, kas savukārt izraisa protona atraušanos no serīna hidroksilgrupas un negatīvā lādiņa palielināšanos uz tās skābekļa atomu. Izveidojies serīna anjons darbojas kā nukleofila reaģents, veidojot pievienošanās produktu ar peptīda karbonylgrupas oglekli, un izveidojot jaunu  $\sigma$  saiti. Enzīma-substrāta kompleksa stabilizācijā bez minētajiem aminoskābju atlikumiem piedalās vēl glicīns (Gly-193), veidojot papildu ūdeņraža saiti ar peptīdsaites skābekļa atomu.

Tālāk notiek peptīda C-N saites pārraušana un E-O-acilprodukta un oligopeptīda ar brīvu amino-grupu N galā veidošana (ar E apzīmēts enzīms). Seko nukleofila ūdens pievienošana E-O-acilprodukta karbonylgrupai ar sekojošu enzīma reģenerāciju un otra oligopeptīda atbrīvošanu (sk. 3.4. att.).

Enzīma un substrāta mijiedarbība ir ļoti organizēta dinamiska sistēma, kas saskaņota laikā un telpā. Starpmolekulāra mijiedarbība, pārejas kompleksa stabilizācija un iekšmolekulāra pārgrupēšanas reakcija ļauj samazināt enerģijas zudumus, kas neizbēgami rastos nekatalītiskā procesā. Enzīma aktīvais centrs ne tikai nodrošina reakcijas stereospecifiskumu. Nozīmīga loma ir to veidojošo aminoskābju atlikumu hidrofilītai un hidrofobītai.

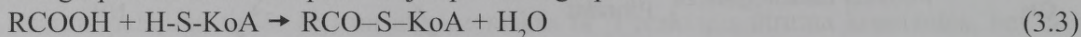
Pepsīnam, tripsīnam un himotripsīnam aktīvo centru veido Asp-His-Ser triāde, bet pepsīns hidrolīzē leicīna un valīna, tripsīns – arginīna un lizīna un himotripsīns – fenilalanīna, tirozīna un

triptofāna karboksilgrupas veidotās peptīdsaites ar citām aminoskābēm, kas norāda uz šim centram apkārtējo aminoskābju sāngrupu ietekmi substrāta orientācijā.

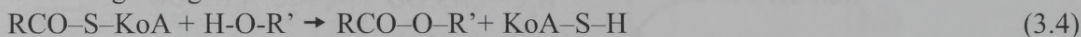
Daudzos gadījumos enzīma katalīzi var izskaidrot arī ar skābes-bāzes mijiedarbības mehānismu. Oksidēšanās vai reducēšanās reakcijās enzīma aktīvais centrs ir elektronu akceptors (oksidēšana) vai donors (reducētājs).

Aciltransferāzes satur koenzīmu A (sk. 3.5. att.), kas pārnes acilgrupu no viena substrāta uz citu. Būtībā reakcijas elementārā aktā koenzīms darbojas kā otrais substrāts (kosubstrāts).

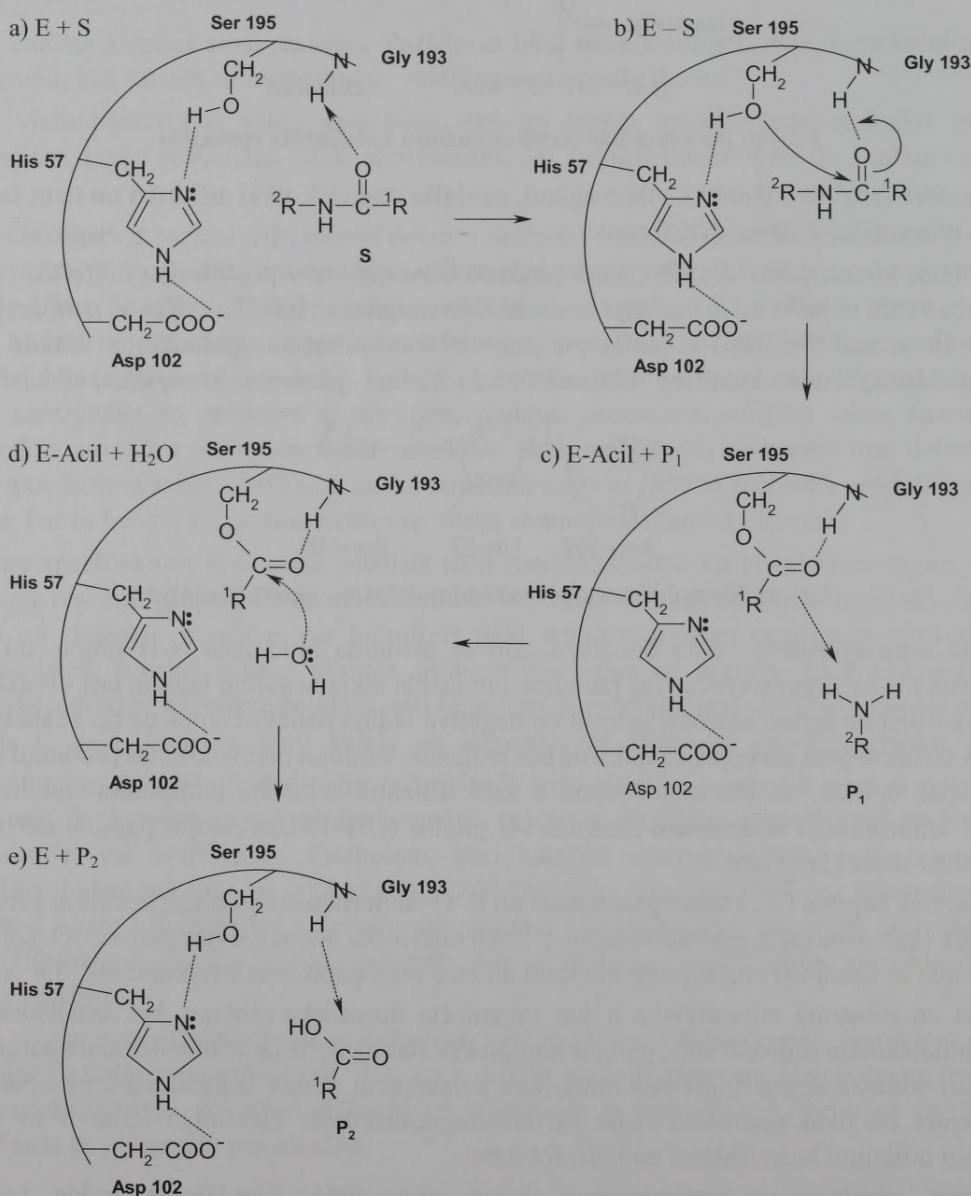
Acilgrupa koenzīmam A pievienojas pie tiola grupas:



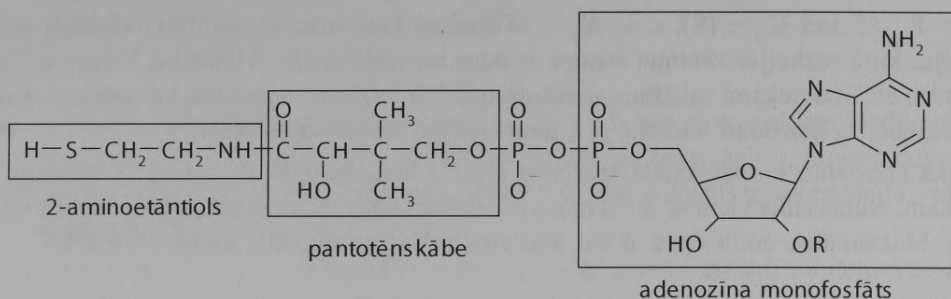
Tioestera sēra veidotās saites ievērojami spēcīgāk pakļaujas polarizācijai nekā esteru saite, tāpēc acil-KoA viegli reaģē ar dažādiem nukleofiliem:



Koenzīms A var kalpot arī par acilgrupas saistītāju reakcijās, kurās notiek pārvērtība skābes molekulā, piemēram, taukskābju oksidēšanā vai sintēzē.



3.4. att. Peptīdsaites mehānisms hidrolīzes himotripsīna aktīvajā centrā



3.5. att. Acilgrupu transferāžu koenzīms A

### 3.2.1. Enzīmu katalizētu reakciju kinētikas raksturojums

Pēc molekulas izmēriem enzīmi tuvi koloidālām daļiņām, tāpēc tie īsti neatbilst ne homogēniem, ne heterogēniem katalizatoriem un tos var pieskaitīt ultramikroheterogēnu katalizatoru klasei.

Enzīmi pazemina reakcijas aktivācijas enerģiju, kurā liela nozīme ir enzīma (E) un metabolizējamā substrāta (S) kompleksa (ES) veidošanai. Zemā substrāta koncentrācijā reakcija atbilst pirmajai kārtai, t. i., proporcionāla substrāta koncentrācijai, bet augstā koncentrācijā – nulles kārtai pēc substrāta.

1913. gadā Mihaeliss un Mentēns teorētiski pamatoja šādu enzīma katalizētas reakcijas norisi:



Reakcijas  $S \rightarrow P$  produkta veidošanās sākuma ātrums  $V_o$  ir proporcionāls starpprodukta ES koncentrācijai:

$$V_o = \frac{d[P]}{dt} = k_3 \cdot [ES] \quad (3.6)$$

Reakcijas ātrumu nosaka visu triju reakcijas ātrumu attiecība:

$$V_1 = k_1 \cdot [E] \cdot [S]; V_2 = k_2 [ES]; V_3 = k_3 [ES] \quad (3.7)$$

Pēc neilga laika no reakcijas sākuma enzīma koncentrāciju būs:

$$[E] = [E]_o - [ES] \quad (3.8)$$

Atgriezeniskā procesā enzīma kompleksa veidošanās un sadalīšanās ātrumi būs vienādi:

$$V_1 = V_2 + V_3 \quad (3.9)$$

$$V_1 - (V_2 + V_3) = 0; k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_2 \cdot [ES] - k_3 \cdot [ES] = k_1 \cdot \{[E]_o - [ES]\} \cdot [S] - k_2 \cdot [ES] - k_3 \cdot [ES] = 0 \quad (3.10)$$

No (3.10) aprēķina eksperimentāli nenosakāmo [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E]_o \cdot [S]}{k_1 \cdot [S] + k_2 + k_3} \quad (3.11)$$

Enzimātiskās reakcijas sākuma ātrums pēc (3.5):

$$V_o = \frac{k_3 \cdot k_1 \cdot [E]_o \cdot [S]}{k_1 \cdot [S] + k_2 + k_3} = \frac{k_3 \cdot [E]_o \cdot [S]}{K_m + [S]}, \text{ kur } K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3.12)$$

Reakcija notiks ar maksimālo ātrumu, ja viss enzīms būs saistījies ar substrātu kompleksa ES veidā, tad:

$$[E]_o = [ES], \text{ tad } V_{\max} = k_3 \cdot [ES] = k_3 \cdot [E]_o \quad (3.13)$$

Un (3.12) var pārveidot:

$$V_o = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3.14)$$

Ja  $V_o = V_{\max}/2$ , tad  $K_m = [S]$ , t. i.,  $K_m$  – Mihaelisa konstante ir skaitliski vienāda ar substrāta koncentrāciju, kurā reakcijas sākuma ātrums ir puse no maksimālā. Mihaelisa konstante saskaņā ar (3.12) raksturo enzīma tieksmi saistīties ar substrātu jeb ir enzīma – substrāta kompleksa nestabilitātes konstante. Mihaelisa konstanti ietekmē pH, temperatūra, un substrāta daba.

Kinētiskā konstante  $k_3$  maksimālā reakcijas ātruma vienādojumā  $V_{\max} = k_3[E]_o$  raksturo substrāta molekulu skaitu, kuras laika vienībā (s vai min.) pārvēršas reakcijas produktā, un to sauc par enzīmātisko ciklu skaitu. Maksimālais ciklu skaits ir tad, kad viss enzīms ir iesaistīts starpproduktā ES.

3.2. tabula

Enzīma katalītisko ciklu skaits

Enzīms	Reakcija	Katalītisko ciklu skaits, s <sup>-1</sup>
Papaīns	Peptīdsaites hidrolīze	10
Ribonukleāze	Fosforskābes esteru saišu hidrolīze RNS	100
Kināzes	Fosforskābes pārnese starp substrātiem	1000
Acetilholīna esterāze	Nervu signāla pārnesēja acetilholīna sadalīšana	10000
Karboanhidrāze	CO <sub>2</sub> pārvēršana par H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , un pretēji	10 <sup>6</sup>
Katalāze	Ūdeņraža peroksīda sadalīšana par ūdeni un skābekli	10 <sup>7</sup>

Mihaelisa-Mentena vienādojums ir viens no fundamentālajiem enzīmātiskās kinētikas vienādojumiem. Tas apraksta gandrīz visas enzīmātiskās reakcijas, bet novirzes no tā, kā likums, saistīts ar vienkāršās shēmas sarežģīšanos. Kinētisko shēmu, kuras atbilst Mihaelisa vienādojumam, ir neierobežoti daudz. Bez reakcijas mehānisma detalizētas izpratnes eksperimentāli iegūto  $K_m$  un  $k_3$  vērtību interpretācija var būt nepareiza, jo dažādās kinētiskās shēmās  $K_m$  un  $k_3$  var raksturot pavisam atšķirīgus procesus.

Enzīmi, kā likums, katalizē reakcijas, kurās piedalās divi substrāti. Viena substrāta reakcijas atbilstoši Mihaelisa shēmai lielākoties ir īpašs gadījums, kad divu substrātu reakcija notiek viena komponenta ļoti liela pārākuma režīmā. Piemēram, hidrolīzes reakcijas notiek nemainīgas ūdens koncentrācijas pārākumā, tāpēc reakcija atbilst pirmās kārtas reakcijas ātruma vienādojumam un tās ātrums atkarīgs tikai no viena substrāta.

Enzīmātisko reakciju kinētikas pētījumi un to rezultātu analīze ir ārpus šī kursa ietvariem.

Enzīma-substrāta sistēmu raksturo  $K_m$ ,  $V_{\max}$  un  $k_3$ . Lielākā daļa enzīmu katalizē 10–1000 molekulu pārvērtību sekundē, bet katalāze, kura sadala audieme bīstamo ļoti spēcīgo oksidētāju – ūdeņraža peroksīdu, darbojas ar ātrumu, kas tuvs maksimāli iespējamam ātrumam, kuru nosaka molekulu sadursmju biežums.

### 3.2.2. Alostēriskie enzīmi

Enzīmi, kas sastāv no vairākām subdaļiņām (protomēriem), atbilst iepriekš aplūkotajai Mihaelisa kinētikai, ja visas subdaļiņas ir savstarpēji neatkarīgas. Ja protomēri mijiedarbojas, tad šo enzīmu kinētiku neapraksta hiperbola, bet tai ir sigmoidāls raksturs. Tas attiecas uz gadījumu, kad enzīmu aktivē substrāts. Šiem enzīmiem bez aktīvā centra, kas saista un pārveido substrātu, ir centrs, kas atgriezeniski saista alostērisko regulatoru (substrātu, kosubstrātu vai mazas molekulmasas savienojumu). Kā likums, alostēriskie enzīmi metabolisma ceļos atrodas to sākumā vai sazarojumos. Par piemēru var minēt glikolīzes atslēgas enzīmu – tetramēro fosfofruktokināzi, kas katalizē fruktozes 6-fosfāta pārvērtību fruktozes 1,6-difosfātā. Šo enzīmu aktivē substrāts ATF klātbūtnē. Pirmās substrāta molekulas saistīšanās ar enzīmu protomēru veicina tā saistīšanos ar pārējām subdaļiņām.

Mihaelisa kinētikai atbilstoša enzīma atšķiršanai no alostēriskā enzīma izmantojama substrāta sākuma koncentrācija, kurā reakcijas sākuma ātrums ir 0,9 no maksimālā ( $V$ ), attiecībā pret koncentrāciju, kurā  $V_o = 0,1 V (R_s)$ .

$$R_s = \frac{[S_0]_{0,9r}}{[S_0]_{0,1r}} \quad (3.15)$$

Visiem enzīmiem, kas atbilst Mihaelisa kinētikai,  $R_s = 81$ , bet alostēriskiem enzīmiem tas ir vai nu lielāks, vai mazāks.  $R_s < 81$  norāda uz pozitīvu kooperāciju (aktivāciju), alostēriskais regulators palielina substrāta enzīma kompleksa veidošanos. Ja  $R_s > 81$ , tad ir negatīva kooperācija – alostēriskais enzīms samazina substrāta saistīšanos ar enzīmu.

Alostērisko enzīmu darbības mehānisma izskaidrošanai ieteikti dažādi modeļi. Vienkāršotākais no tiem ir Monoda u. c. ieteiktais gadījumam, ja regulators uzrāda pozitīvu kooperāciju. Saskaņā ar šo modeli, enzīma protomēri eksistē divās atgriezeniskās konformācijās: *R*-formā, kura ļoti labi saista substrātu, un *T*-formā, kura slikti saista substrātu. Pieņemsim, ka enzīmam ir četri protomēri (4.16), un sākumā tas ir *T*-formā.

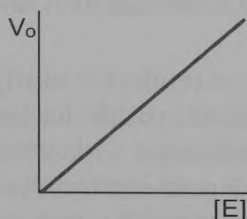


Substrāta piesaistīšana pie pirmā protomēra to pārvērš *R*-formā, kas inducē pārējo protomēru pāreju *R*-formā, kura pēc tam aktīvi saista substrātu. Šis modelis nepieļauj jaukto konformāciju *RT* esamību. Tā kā viena substrāta molekula aktivē četrus protomērus, notiek strauja enzīma aktivitātes palielināšanās pēc nelielas substrāta koncentrācijas pievienošanas.

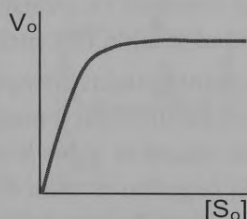
### 3.3. Enzīmu darbību ietekmējošie faktori

#### 3.3.1. Enzīma koncentrācijas ietekme uz reakcijas ātrumu

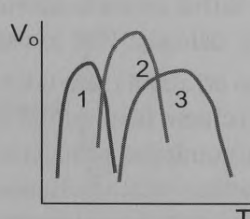
Organismā enzīma koncentrācija mainās atkarībā no metaboliskajām vajadzībām. Palielinoties enzīma koncentrācijai, optimālos apstākļos to katalizētās reakcijas ātrums pieaug proporcionāli, ja vien substrāts ir pietiekamā daudzumā (nav limitējošs) (sk. 3.6. att.).



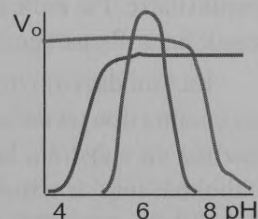
3.6. att. Enzīma koncentrācijas ietekme uz reakcijas sākuma ātrumu



3.7. att. Substrāta koncentrācijas ietekme uz reakcijas sākuma ātrumu



3.8. att. Temperatūras ietekme uz reakcijas sākuma ātrumu



3.9. att. pH ietekme uz reakcijas sākuma ātrumu

#### 3.3.2. Substrāta koncentrācijas ietekme

Ja substrāta koncentrācija ir zema  $[S] \ll K_m$ , tam ir pieejami daudz brīvu enzīmu aktīvo centru un katra jauna substrāta molekula var reaģēt, tāpēc reakcijas ātrums pieaug proporcionāli substrāta koncentrācijai  $V_o = k[S]$ . Ja  $[S] > K_m$ , pievienotā substrāta molekulai iespēja atrast brīvu aktīvo centru samazinās. Ja  $[S] \gg K_m$ , visi aktīvie centri ir piesātināti ar substrātu, un reakcijas ātrumu nosaka substrāta pārvērtības ātrums enzīma aktīvajā centrā. Nākamā substrāta molekula tam var pievienoties tikai tad, kad produkts to ir atbrīvojis. Reakcija notiek ar maksimālo ātrumu (sk. 3.7. att.).

#### 3.3.3. Temperatūras ietekme un enzīmu termiskā stabilitāte

Enzīma katalizētās reakcijas ātrums palielinās, paaugstinot temperatūru, jo palielinās to molekulu skaits, kuru enerģija ir lielāka par enerģijas barjeru. Vidēji tas ir aptuveni 2 reizes uz katriem

10 grādiem. Tikai enzīmu gadījumā reakcijas ātruma palielinājums sāk samazināties virs 30 °C, un virs 35 °C reakcijas ātrums nevis palielinās, bet sāk samazināties, un pie 40–50 °C reakcijas ātrums krasi krītas līdz 0, jo notiek enzīmu denaturācija – aktīvā enzīma koncentrācijas strauja samazināšanās (sk. 3.8. att.).

Pārtikas produktu tehnoloģijā un glabāšanā liela nozīme ir termiskajiem procesiem, jo ar tiem var ierobežot ķīmiskas, enzimatiskas un mikrobiālas izmaiņas. Nevēlamās izmaiņas var palēnināt ar glabāšanu sasaldētā stāvoklī vai inhibēt, denaturējot enzīmus un mikroorganismus ar termisku apstrādi (sk. 3.3. tab.).

3.3. tabula

#### Pārtikas saglabāšana ar enzīmu inaktivēšanu termiskā apstrādē

Pārtikas produkts	Enzīms	Kvalitātes izmaiņa
Āboli, kartupeļi un to produkti	Monofenolu oksidāze	Enzimātiska brūnēšana
Zaļie zirņi	Lipooksigenāze, peroksidāze	Garšas defekti, balināšana
Zivju produkti	Proteināze, tiamināze	Tekstūras izmaiņas (sašķidrināšanās) B <sub>1</sub> vitamīna zudumi
Tomātu biezenis	Poligalaktouronāze	Tekstūras izmaiņas (sašķidrināšanās)
Aprikozes un citi kaulēnāgi	β-glikozidāze	Krāsas izmaiņas
Auzu pārslas	Lipāze, lipooksigenāze	Garšas defekts (rūgta garša)
Brokoļi, ziedkāposti un citi krustzieži	Cistationīna β-liāze (cistīna liāze)	Slikta garša

Temperatūra un laiks ir galvenie faktori, ar kuriem var ietekmēt termisko apstrādi. Jāizvēlas tādi apstākļi, lai inhibētu nevēlamos procesus, maksimāli samazinot nevēlamas izmaiņas, piemēram, vitamīnu zudumus.

Enzīmu termiskā stabilitāte ir mainīga. Daži enzīmi zaudē savu aktivitāti jau samērā zemā temperatūrā, kamēr citi īsu brīdi var izturēt diezgan augstu temperatūru. Dažos gadījumos enzīmu stabilitāte zemākā temperatūrā ir pat mazāka nekā vidējā temperatūrā. Piena lipāze un bāziskā fosfatāze ir termiski nestabila, turpretī skābā fosfatāze ir samērā stabila, tāpēc bāzisko fosfatāzi izmanto, lai atšķirtu nepasterizētu pienu no pasterizēta. Kartupeļu bumbuļos pēdējā no visiem enzīmiem denaturējas peroksidāze. Pat nelielas aktīvā centra konformācijas izmaiņas var izraisīt pilnīgu katalītiskās aktivitātes zaudēšanu. Parasti enzīms dabīgajā vidē ir stabilāks par izdalītu tīru enzīmu.

Enzīmi dažādi izturas arī zemā (zem ūdens sasaldēšanas punkta) temperatūrā, un rezultāts ir atkarīgs no enzīma tipa un dažiem citiem faktoriem, kuru ietekme bieži pat ir pretēja. Aktivitāti pozitīvi ietekmē enzīma un substrāta koncentrācijas paaugstināšanās sakarā ar ledus kristālu veidošanos. Viskozitātes palielināšanās ar temperatūras pazemināšanos atstāj negatīvu ietekmi difūzijas ātruma samazināšanās dēļ. Pilnīgi sasaldētā produktā, kura temperatūra ir zemāka par stiklošanās temperatūru, reakcijas ātrums ir nulle. Sasaldēšana neatgriezeniski bojā tikai nedaudzus enzīmus.

#### 3.3.4. pH ietekme

Enzīma katalītisko aktivitāti nosaka to aktīvā centra pieejamība, spēja saistīt substrātu un realizēt attiecīgo mehānismu, kas savukārt atkarīga no aminoskābju atlikumu jonizācijas, kura ietekmē proteīna telpisko struktūru un to stabilizējošās saites. Novirze no konkrētas pH vērtības izsauc jonizēto grupu protonēšanu ( $-\text{COO}^-$ ) vai deprotonēšanu ( $\text{NH}_4^+$ ).

## Dažādu enzīmu optimālie pH

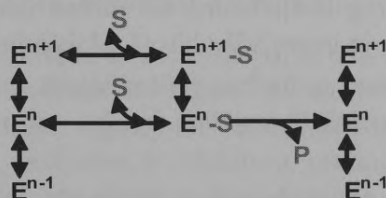
Enzīms	Avots	Substrāts	pH optimums
Pepsīns	Kuņģis	Proteīnu aromātisko vai nepolāro aminoskābju karboksilgrupu veidotās peptīdu saites	2
Himotripsīns	Aizkuņģa dziedzeris	Proteīnu aromātisko aminoskābju karboksilgrupu veidotās peptīdu saites	7,8
Papaīns	Papajas augļi	Proteīns	7–9 (10)
Lipāze	Mikroorganismi	Olīveļļa	5–8
Maltāze	Mikroorganismi	Maltoze	6,6
β-amilāze	Iesals	Ciete	5,2
Invertāze	Tomāti	Saharoze	4,5
Pektīna liāze	Mikroorganismi	Pektīnskābe	9,0–9,2
Lipooksigenāze I	Sojas pupas	Linolēnskābe	9,0
Lipooksigenāze II	Sojas pupas	Linolēnskābe	6,5

Atkarībā no jonu ietekmes telpiskās struktūras veidošanā pH izmaiņas ietekme būs straujāka vai mazāk strauja, tomēr lielākajai daļai enzīmu, ar retiem izņēmumiem, eksistē vairāk vai mazāk izteikts pH optimums (sk. 3.8. att.).

Optimālā pH vērtību ietekmē lietotā buferšķīduma tips un tā jonu spēks, kura cēlonis var būt divējāds:

- enzīma prototropās grupas nosaka katalītisko aktivitāti un tā proteīna struktūras izmaiņas, kas izraisa neatgriezenisku denaturēšanos;
- nosaka enzīma prototropās grupas katalītisko aktivitāti ar elektrostātisko lādiņu lielumu aktīvajā centrā.

Papildu ietekme uz reakcijas ātrumu var būt arī substrāta jonizācijas pakāpei atkarībā no pH. pH ietekmi uz enzīmiem, kuriem izmainās tā lādiņš, var apkopot shēmā (sk. 3.10. att.). Zemās temperatūrās pH izmaiņām var būt gan pozitīva, gan neitrāla, gan negatīva ietekme.



3.10. att. Enzīma jonizācijas izmaiņas iespējamā ietekme uz reakcijas norisi

### 3.3.5. Spiediena ietekme

Liels spiediens var inhibēt enzīmus un mikroorganismu augšanu. Mikroorganismu attīstību inhibē jau 300–600 MPa, kamēr baktēriju sporas var izturēt pat vairāk par 1200 MPa. Liels spiediens >1200 MPa izmaina enzīmu trešējo struktūru un pārāuj otrējo struktūru stabilizējošās saites, bet neietekmē pirmējo struktūru. Enzīmi neatgriezeniski denaturējas spiedienā virs 300 MPa, kamēr zemākā spiedienā ir tikai atgriezeniskas izmaiņas. Temperatūras paaugstināšana samazina denaturēšanai nepieciešamo spiedienu. Pirmajā momentā varētu šķist, ka uz pārtiku un tās gatavošanu tas neattiecas, bet jāņem vērā, ka augsts spiediens pārtikas produktā var rasties lokālā mērogā, piem., uz naža asmens smailes smalcinātājiekārtās u. c.

### 3.3.6. Ūdens ietekme

Lai enzīms uzrādītu katalītisku aktivitāti, tam jābūt hidratētam. Vispirms hidratējas enzīma molekulas ārējās jonizētās grupas, kurām seko nejonizētās grupas. Enzīms sāk uzrādīt katalītisko

aktivitāti, ja ūdens masas daļa ir lielāka par 0,2 g/g proteīna. Turpmāka hidratācija nodrošina enzīma molekulas monomolekulāra hidratācijas slāņa veidošanos uz virsmas pie 0,4 g/g proteīna. Enzīma aktivitāte pieaug līdz 0,9 g/g proteīna, kad substrāts var netraucēti difundēt pie aktīvā centra.

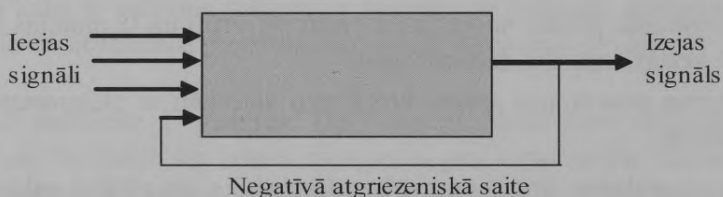
Pārtikas produktu konservēšanā obligāti ir pilnīgi jāinhibē enzīmu aktivitāte, ja glabāšanas temperatūra ir virs stiklošanās temperatūras.

### 3.4. Enzīmu aktivitātes regulēšana

Dzīvā organismā ar temperatūras, substrāta koncentrācijas vai pH maiņu nav iespējams regulēt enzīmu aktivitāti, jo to ierobežo organismu cenšanās saglabāt vairāk vai mazāk nemainīgu iekšējo vidi. Minētie faktori nav izmantojami arī tāpēc, ka tie aptuveni vienādi ietekmē visu enzīmu aktivitāti un var izraisīt nevēlamu blakus reakciju norisi.

Nodrošināt tūkstošiem reakciju saskaņotu un kontrolētu norisi nevar neviena centralizēta regulācijas sistēma, tāpēc regulācija realizējas vairākos līmeņos, no kuriem tikai augstākie regulējas centralizēti, bet šūnā normālus procesus nodrošina pašregulācijas mehānismi.

Sistēma būs pašregulējoša, ja tā izejas signālu izmantos kā atgriezenisko saiti ieejā, t. i., ja palielināsies izejas signāls – enzīmātiskās reakcijas produktu koncentrācija, tad tas ar atgriezenisko saiti izraisīs enzīma aktivitātes samazināšanos, un produkta koncentrācija pielīdzināsies tā patēriņam citos saistītos procesos.



3.11. att. Sistēmas regulācija ar negatīvo atgriezenisko saiti

Reakcijas norises intensitātes regulāciju nodrošina enzīma inhibēšana ar reakcijas produktu: jo lielāka būs produkta koncentrācija, jo intensīvāks būs tā inhibējošais efekts.

Ja dzīvā šūna vai organisms nonāk ar barības vielām bagātā vidē, tad substrāts ne tikai pārvēršas produktā, bet arī papildus veicina efektīvāku enzīma darbību – ar pozitīvu ietekmi palielina reakcijas ātrumu.

Lielākā daļa dzīvos organismos notiekošo reakciju veido pārvērtību ķēdes, kurās nav nepieciešams regulēt visu enzīmu aktivitāti, bet tikai ietekmēt mezglu enzīmu aktivitāti.



Pārvērtības (3.17) produkta D koncentrācijas regulācijai nav nepieciešams regulēt visu enzīmu aktivitāti. Pietiek regulēt tikai pirmā enzīma aktivitāti, tad arī secīgās reakcijas norises ātrumu noteiks iepriekšējās reakcijas produkta koncentrācija. Lai šī shēma darbotos, nepieciešams, lai produkts D ar negatīvo atgriezenisko saiti inhibētu pirmo enzīmu. Pirmā enzīma regulēšana ar reakcijas ķēdes gala produktu ļauj izvairīties no pārvērtības starpproduktu uzkrāšanās.

#### 3.4.1. Aktivatoru ietekme

Sārnu un sārmzemju metālu, halogēnu un dažādi citi joni, kā arī organiskās vielas, pievienojoties enzīmam, veicina tā aktīvā centra struktūras izmaiņas reakcijai pozitīvā veidā vai palīdz saistīt substrātu, vai izmaina vides dielektrisko konstanti. Rezultātā palielinās enzīma katalizētās reakcijas ātrums bez pārējo faktoru izmaiņas. Šādas vielas sauc par aktivatoriem.

### 3.4.2. Alostēriskā kontrole

Regulācija ar atgriezenisko saiti parasti realizējas ar alostērisko kontroli (no grieķu *allos* – ‘cits’ un *steros* – ‘vieta’). Alostēriskā kontrolē jeb regulācijā alostērisko regulatoru molekulas piesaistīšanās enzīmam vienā vietā ietekmē citu molekulu saistīšanos citos iecirkņos. Lielāko daļu alostērisko enzīmu veido vairākas protomēru ķēdes, un tiem ir divējādi iecirkņi: vieni substrātu, bet otri regulatora saistīšanai. Regulatora saistīšanās (parasti ar nekovalentajām saitēm) ar enzīmu izraisa tā formas maiņu, izmainot enzīma spēju saistīt substrātu un katalizēt reakciju. Alostēriskās kontroles priekšrocība ir tā, ka regulatoram nav jābūt līdzīgam substrātam, jo tas saistās citā vietā.

Alostēriskā regulēšana var būt pozitīva vai negatīva. Ja piesaistās pozitīvs regulators, tad enzīms izveido aktīvā iecirkņa struktūru, kura labāk saista substrātu un katalizē reakciju. Negatīva regulatora saistīšana pazemina aktīvā iecirkņa efektivitāti. Tā kā alostēriskos enzīmus veido vairāki polipeptīdi, kas bieži ir arī atšķirīgi, tad tie dažādi reaģē uz regulatoru iedarbību. Turklāt enzīma protomēri savstarpēji mijiedarbojas, un substrāta pievienošanās pie viena centra ar konformācijas izmaiņām sekmē tā pievienošanos pie citiem centriem. Šādu ietekmi sauc par **kooperatīvo efektu**. Piemēram, aspartāta karbamoilāze sastāv no sešām subdaļiņām ar sešiem aktīvajiem centriem un sešiem regulatora centriem, pie kuriem var pievienoties alostēriskie efektori CTF un ATF. Metaboliskā ceļa gala produkts (CTF) ar atgriezenisko saiti inhibē enzīmu, bet ATF darbojas kā aktivators.

### 3.4.3. Inhibitoru ietekme

Inhibitori ir molekulas, kas samazina enzīma katalītisko aktivitāti. Daudzi inhibitori ir organisma normāli izstrādāti metabolīti vai zāles un toksīni. Inhibēšana var būt atgriezeniska un neatgriezeniska.

Atgriezeniskās inhibēšanas gadījumā enzīms atjauno savu aktivitāti, līdzko aizvākts inhibitors, inhibitors saistās ar nekovalentām saitēm. Neatgriezeniskās inhibēšanas gadījumā inhibitors cieši saistās ar enzīmu, parasti ar kovalentajām saitēm, un enzīms vairs nevar atjaunot aktivitāti.

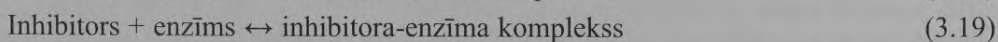
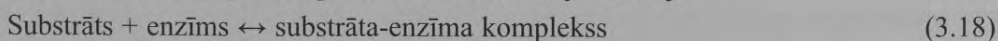
Atgriezeniskos inhibitorus iedala **nekonkurējošos**, **konkurējošos** un **bezkonkurences** inhibitoros.

#### 3.4.3.1. Atgriezenisko nekonkurējošo inhibitoru darbība

Nekonkurējošais inhibitors nekonkurē ar substrātu par aktīvo iecirkni, jo tam ir atšķirīgs sastāvs, uzbūve un īpašības un tas ar enzīmu saistās dažādās vietās. Būtībā nekonkurējošais inhibitors ir negatīvs augstāk minētais alostēriskais regulators. Nekonkurējošais inhibitors samazina maksimālo reakcijas ātrumu, jo enzīmi, kas saistījušies ar inhibitoru, reakcijā nepiedalās, bet  $K_m$  nemainās, jo nemainās brīvo enzīmu īpašības.

#### 3.4.3.2. Konkurējošie inhibitori

Ja inhibitoram ir līdzīga forma, lielums un funkcionālās grupas, tad tas var veidot tādas pašas nekovalentās saites ar aktīvo iecirkni kā substrāts, tikai nav iespējama produkta veidošana, jo inhibitors tomēr nevar pilnībā piedalīties katalītiskajā reakcijā.



Ja substrāta koncentrācija ir liela, tad aktīvos iecirkņus aizņem substrāts un tādējādi izkonkurē inhibitoru. Visu izšķir inhibitora un substrāta koncentrācija un to ar enzīmu veidoto kompleksu stabilitāte (3.18) un (3.19). Ar ļoti lielu substrāta koncentrācijas pārkumu pār inhibitoru iespējams tā ietekmi samazināt līdz nebūtiskai, tādējādi maksimālais reakcijas ātrums nemainās, bet palielinās  $K_m$  vērtība, jo tā raksturo enzīma-substrāta kompleksa sadalīšanās un veidošanās ātrumu attiecību  $K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ .

Konkurējoša inhibitora klātienē pieaug konstantes vērtība ātrumam, kādā enzīma-substrāta kompleks sadalās atpakaļ substrātā un enzīmā, jo daļa brīvā enzīma saistās enzīma-inhibitora kompleksā un palielinās  $K_m$ . Piemēram, heksozokināzes katalizētās reakcijas produkts glikozes 6-fosfāts ir

konkurējošais inhibitors glikozei. Kad vidē uzkrājas produkts, tas samazina heksozokināzes aktivitāti, bet neaizkavē ar barību uzņemtās papildu glikozes pārvērtību glikozes 6-fosfātā, kas var būt pozitīvs alostērisks regulators tālākām pārvērtībām. Tādā veidā regulējas glikozes patēriņš pie konstanta tās līmeņa, bet nav ierobežota iespēja intensificēt procesu liekas glikozes gadījumā.

Konkurējošu inhibēšanu var izmantot ārstnieciskiem mērķiem: saindējoties ar metanolu, bīstama ir tā oksidēšanās organismā ar alkohola dehidrogenāzi, veidojot proteīnu denaturējošo aģentu – formaldehīdu. Pacientam, kas saindējies ar metanolu, ievada lielas devas etanola, kas izkonkurē metanolu, un metanols var izdalīties no organisma neoksidētā veidā. Konkurējošos inhibitorus izmanto arī enzīmātiskā analīzē (sk. tālāk).

### 3.4.3.3. Bezkonkurences inhibitori

Bezkonkurences inhibitori ir īpatnēja atgriezenisko inhibitoru grupa, kas nav spējīga patstāvīgi saistīties ar enzīma aktīvo iecirkni, pirms tur nav piesaistījies substrāts un izveidojies enzīma-substrāta komplekss, jo saistīšanās laikā izmainās gan aktīvā iecirkņa, gan substrāta saites un uzbūve, tāpēc pie šī izmainītā kompleksa var piesaistīties bezkonkurences inhibitors un kavēt tālākas katalītiskās pārvērtības. Tas daļēji apvieno abu iepriekš aplūkoto inhibitoru īpašības: saistās aktīvajā iecirknī, bet nekonkurē ar substrātu, tāpēc tas samazina  $V_{max}$  un palielina  $K_m$ .

### 3.4.3.4. Neatgriezeniskā inhibēšana

Ja inhibitors ar enzīmu saistās ar saitēm, kuras grūti pārraut gan aktīvajā iecirknī, gan ārpus tām, tad tas izraisa krasas enzīma struktūras izmaiņas, un aktīvais iecirknis nespēj saistīt substrātu. Daudzi neatgriezeniski inhibitori ir indes, jo tie pilnībā pārtrauc enzīma darbību. Pie tiem pieder smagie metāli, piemēram,  $Hg^{2+}$  vai  $Pb^{2+}$ , kas veido nedisociējošus savienojumus ar cisteīna sēra atomu (-SH), tāpēc to kontrole pārtikā ir ļoti būtiska.

Fosfororganiskie savienojumi: herbicīdi, ķīmiskās kaujas vielas (piem., zarīns) neatgriezeniski inhibē acetilholīna esterāzi – enzīmu, kas sadala nervu signāla pārnēsēju acetilholīnu par etiķskābi un holīnu (bioloģiski neaktīviem savienojumiem). Normāli acetilholīna esterāze sadala acetilholīnu tūlīt pēc tā izdalīšanās no motorā nerva sinapsēm, atbrīvojot vietu nākošajam signālam. Ja šo enzīmu inhibē zarīns, tad nervu signāla efekts netiek pārtraukts, un iestājas elpošanas muskulatūras šķiedru paralīze, jo muskulis nespēj atslābt, tāpēc seko nāve no nosmakšanas.

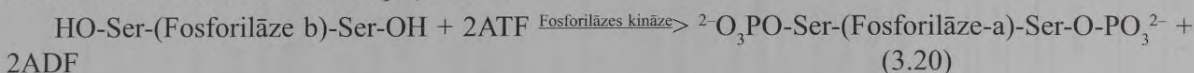
## 3.4.4. Enzīmu aktivitātes regulēšana ar kovalento modifikāciju

Eksistē divi enzīmu kovalentās modifikācijas veidi: neatgriezeniska proteolīze un atgriezeniskā modifikācija.

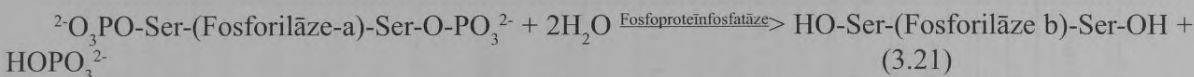
Dažus enzīmu organisms sintezē neaktīvā formā, kas atšķiras no tā aktīvās formas ar sastāvu un formu. Šos enzīmus var uzskatīt par tādiem, kam kovalenti pievienots dabīgs inhibitors – polipeptīds, un tos sauc par zīmogēniem vai proenzīmiem (profermentiem). To aktivēšanai nepieciešams atšķelt daļu molekulas. Piemēram, asins sarecēšana aktivējas, atšķeļot daļu polipeptīda no enzīma ar citu enzīmu, līdzīgi tas notiek ar gremošanas proenzīmiem: pepsinogēnu, tripsinogēnu un himotripsinogēnu. Olbaltumvielas sašķeļošiem enzīmiem jāizdalās neaktīvā veidā, lai tie nesagrautu tos izdalošos dziedzerus, izvadkanālu un zarnas, kad tajās nav barības. Inhibējošais peptīds parasti ir molekulas galā, un to selektīvi hidrolizē speciāls enzīms vai arī cits faktors, piemēram, pepsinogēnu kuņģa sulas zīmogēnu aktivē sālsskābe, atšķeļot oligopeptīdu un pārvēršot pepsinogēnu pepsinā. Tālāk jau pats pepsīns strauji aktivē nākamās pepsinogēna molekulas – autokatalītiskā reakcijā (reakcijas produkts ir arī reakcijas katalizators).

Proenzīmu tripsinogēnu, atšķeļot oligopeptīdu, aktivē enterokināze – veidojas tripsīns, kas pats tālāk autokatalītiski aktivē tripsinogēnu. Tripsīns vienlaicīgi pārvērš himotripsinogēnu himotripsinā un prokarboksipeptidāzi karboksipeptidāzē, darbodamies kā olbaltumvielu sagremošanas enzīmu slēdzis. Šāda autokatalītiska aktivēšana var arī vērsties pret pašu organismu, kad kļūdas dēļ aktivējas dažas proenzīma molekulas un var notikt kuņģa vai tukšo zarnu sienīņu nopietns bojājums, kas var būt cēlonis atkārtotai proenzīma kļūdainai aktivēšanai un radīt pat fatālas sekas.

Atgriezeniska fosfāta grupu pievienošana vai atšķelšana ir organisma bieži izmantots enzīmu aktivēšanas vai deaktivizēšanas paņēmiens.



kur fosforilāze-b un fosforilāze-a – fosforilāzes neaktīvā un aktīvā forma, *Ser* – serīna atlikums.



*Kināzes* katalizē fosforskābes pārnesei (fosforilēšanu) no ATF uz proteīnu un *fosfatāzes* – fosforskābes atšķelšanu (defosforilēšanu) no fosforilētā proteīna.

Ar vienu un to pašu enzīmu defosforilēšanu var vienu enzīmu pasivēt un citu aktivēt. Piemēram, defosforilēšana pārtrauc glikogēna noārdīšanu, bet aktivē glikogēna sintāzi, kurai aktīva ir defosforilētā forma, bet neaktīva fosforilētā forma. Tā tiek izslēgta divu pretēju procesu vienlaicīga norise un enerģijas velta izšķiešana. Bez fosforilēšanas eksistē vēl vairāki citu atgriezenisku enzīmu modificēšanas veidi – gan ar grupu pievienošānu vai atšķelšanu, gan ar disulfīda saišu veidošanu un nojaukšanu.

### 3.4.5. Enzīmu aktivitātes ģenētiska kontrole

Iepriekš apskatītie enzīmātisko reakciju aktivitātes regulēšanas veidi tieši saistīti ar enzīmu aktivitātes izmaiņām. Šie procesi ir ātri, notiek dažās sekundēs vai minūtēs.

Reakcijas ātrumu var arī izmainīt, mainot enzīma koncentrāciju. Enzīmus raksturo “dzīves puslaiks” – laiks, kurā puse enzīma ir zaudējusi aktivitāti neatgriezenisku izmaiņu dēļ tā uzbūvē. Tāpēc enzīmu koncentrācija nemitīgi jāpapildina. To veic proteīnu biosintēzes mehānisms, kurš, tāpat kā visi bioķīmiskie procesi organismā, tiek stingri kontrolēts. Organisma dzīves laikā mainās tā vajadzība pēc dažiem enzīmiem, šo enzīmu sintēzi kontrolē ģēni.

Arī ārējā vide var izraisīt citādas prasības pēc enzīmiem, tad organisms, atbildot uz saņemtajiem signāliem, endokrīnajos dziedzeros sintezē hormonus, kuri ar attiecīgiem mehānismiem iedarbojas uz ģēniem, izraisot pastiprinātu esošo vai jaunu enzīmu sintēzi.

## 3.5. Enzīmu klasifikācija un nomenklatūra

Enzīmus pēc to katalizētās reakcijas iedala sešās galvenajās klasēs.

3.5. tabula

Enzīmu iedalījums sešās klasēs pēc to katalizētās reakcijas

Klase	Nosaukums	Reakcijas tips	Reakcijas shēma	Piemērs
1	Oksireduktāzes	Elektronu pārnese (oksidēšanās–reducēšanās reakcijas)	$\mathbf{A + B \rightarrow A + B}$	Alkohola dehidrogenāze
2	Transferāzes	Funkcionālo grupu pārnese starp molekulām	$\mathbf{A-B + C \rightarrow A + B-C}$	Heksokināze
3	Hidrolāzes	Hidrolīzes reakcijas	$\mathbf{A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH}$	Saharāze
4	Liāzes	C-C, C-O, C-N un citu saišu sašķelšana, bieži veidojot divkārho saitī	$\mathbf{X-A-B-Y \rightarrow A=B + X-Y}$	Piruvāta dekarboksilāze
5	Izomerāzes	Grupu pārnese molekulas iekšienē	$\mathbf{X-A-B-Y \rightarrow Y-A-B-X}$	Glikozes 1-fosfāta izomerāze
6	Ligāzes	Ar ATF hidrolīzi sajūgta jaunu saišu veidošana	$\mathbf{A + B \rightarrow A-B}$ $\mathbf{TF + H_2O \rightarrow ADF + P_i}$	Piruvāta karboksilāze

Enzīmu nosaukšanai joprojām izmanto vēsturiski radušos nosaukumus, piemēram, tripsīns, himotripsīns, pepsīns, katalāze.

Sistemātiskie nosaukumi sastāv no divām daļām: substrāta nosaukuma (ja ir divi substrāti, tad to nosaukumus atdala ar kolu (:)), pēc tam nosauc klasi vai apakšklasi un beigās pievieno izskaņu -āze, piemēram, laktāta dehidrogenāze.

Dažu pārtikā nozīmīgu enzīmu sistemātiskā klasifikācija un pielietojums (Belitz et al., 2004)

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
1	Oksireduktāzes					
1.1	<b>Donors CH-OH grupa</b>					
1.1.1	Akceptors NAD <sup>+</sup> vai NADP <sup>+</sup>					
		Alkohola dehidrogenāze	1.1.1.1	Etanola saturs noteikšana	Etanols NAD <sup>+</sup> → etanāls + NADH + H <sup>+</sup>	
		Butāndiols dehidrogenāze	1.1.1.4	Sviesta garšas novēršanai alū, pārveidot diacetīlu bezgaršas butān-2,3-diols	Diacetils + NADH + H <sup>+</sup> → butān-2,3-diols + NAD <sup>+</sup>	<i>Aerobacter aerogenes</i>
		L-laktāta dehidrogenāze	1.1.1.27	L-pienskābes enantiomēra noteikšana	L-laktāts + NAD <sup>+</sup> ← → Piruvāts + NADH + H <sup>+</sup>	Citoplazma
		3-hidroksiaciil-KoA dehidrogenāze	1.1.1.35	Saldētas gaļas identificēšanai, jo sasalušā gaļā no bojātiem mitohondrijiem izdalās 3-hidroksiaciil-KoA dehidrogenāze	3-oksoaciil-KoA + NADH + H <sup>+</sup> → (3S)-3-hidroksiaciil-KoA + NADP <sup>+</sup>	Mitohondriju matricss
		Malāta dehidrogenāze	1.1.1.37	L-malāta noteikšana	L-malāts + NAD <sup>+</sup> ← → oksālacetāts + NADH + H <sup>+</sup>	Mitohondriju matricss
		Galaktozes 1-dehidrogenāze	1.1.1.48	Lielāka aktivitāte uz galaktozīdiem, nevis galaktozi, izmanto galaktozes noteikšanai		
		Glikozes 6-fosfāta 1-dehidrogenāze	1.1.1.49	Glikozes un glikozi saturošu ogļhidrātu noteikšanai	Glikozes 6-fosfāts + NADP <sup>+</sup> → glikonskābes laktons + NADPH + H <sup>+</sup>	
1.13	Akceptors skābeklis	Glikozes oksidāze	1.1.3.4	Kopā ar katalāzi Majāra reakcijas novēršanai vai skābekļa saistīšanai hermētiski slēgtos produktos	Glikoze + O <sub>2</sub> → glikonskābe + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ← → 2 H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>	<i>Penicillium notatum</i>
		Ksantīna oksidāze	1.1.3.22	Hipoksantīna un ksantīna oksidācija par urīnskābi		Plaši izplatīta dzīvniekos, sevišķi pienā
1.2	<b>Donors aldehīdgrupa</b>					
1.2.1	Akceptors NAD <sup>+</sup> vai NADP <sup>+</sup>	Aldehīda dehidrogenāze	1.2.1.3	Enzimātiskā nepiesātināto taukskābju oksidācijā izveidojušos aldehīda (heksanāla) oksidēšana	R-CHO + H <sub>2</sub> O + NAD <sup>+</sup> → R-COOH + NADH + H <sup>+</sup>	Lielopu aknu mitohondriju enzīms
1.8	<b>Donors S-savienojums</b>					
1.8.5	Akceptors hinons vai tam radniecīgs savienojums	Glutaciona dehidrogenāze (askorbāts)	1.8.5.1	Miltu uzlabošana – glutaciona oksidēšana	L-treo-dihidroaskorbāts + reducēts glutatons → L-treo-askorbāts + oksidēts glutaciona dimērs	

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
1.10	<b>Donors difenols vai endiols</b>			Miltu uzlabošana - askorbāta oksidēšana	$2 L\text{-treo-askorbāts} + O_2 \rightarrow 2 L\text{-treo- dihidroaskorbāts} + 2H_2O$	
1.10.3	Akceptors skābeklis	Askorbāta oksidāze	1.10.3.3	Ūdenraža peroksīda, kas veidojas partikas apstrādē ar gliukoze oksidāzi, vai izmantots sterilizācijai, sadalīšana	$2H_2O_2 \leftarrow \rightarrow 2H_2O + O_2$	
1.11	Akceptors ūdenraža peroksīds	Katalāze	1.11.1.6	Substrātu ar kustīgu ūdeņradi (fenoli, amīni, un citi organiskie savienojumi) oksidēšana, par otro substrātu izmantojot $H_2O_2$	Peroksīdāze + $H_2O_2 \rightarrow$ komplekss I; komplekss II + I + $SH_2 \rightarrow$ komplekss II + SH; komplekss II + SH $\rightarrow$ peroksīdāze + S	Mārruķu saknes
1.13	<b>Iedarbība uz atsevišķu donoru</b>					
1.13.11	Molekulāra skābekļa iekļaušana	Lipooksigenāze	1.13.11.12	Miltu balināšanai un mīklas struktūras uzlabošanai	Polinepiesātināto taukskābju oksidācija par hidroperoksīdiem	Dažādos augos, eritrocītos, leikocītos
1.14.	<b>Iedarbība uz donoru pāri</b>					
1.14.18	Viena skābekļa atoma iekļaušana	Monofenolu monoooksigenāze (polifenolu oksigenāze)	1.14.18.1	Katalizē mono-, di- un polifenolu oksidāciju par atbilstošiem hinoniem, kas izraisa. kartupeļu, ābolu, sēņu, persiku un citu augu audu enzīmātisku brūnēšanu. Pozitīva loma tējas rūpniecībā		Lielos daudzumos sastopama sēnēs, kartupeļos, ābolos, banānos, tējas, tabakas lapās
<b>2</b>	<b>Transferāzes</b>					
2.3	<b>Acilgrupas pārnese</b>					
2.3.2	Aminoaciltransferāzes	Proteīna glutamīna- $\gamma$ -glutamilttransferāze (transglutamīnāze)	2.3.2.13	Gelu veidošana gaļas, zivju, piena un kviešu produktos	Proteīna-acilglutamīns + proteīna-lizīns $\rightarrow$ proteīna-acilglutamīns + proteīna-acilizīns	<i>Streptovercillum mobaraense</i>
2.7	<b>Fosfāta pārnese</b>					
2.7.1	Akceptors OH grupa	Heksokināze	2.7.1.1	Ogļhidrātu vielmaiņa, gliukoze un citu monosaharīdu analīze	Heksoze (gliukoze) + ATF $\rightarrow$ heksozes 6-fosfāts	
		Glicerīna kināze	2.7.1.30	Glicerīna biooksidēšanās, glicerīna analīze	Glicerīns + ATF $\rightarrow$ glicerīna-3-fosfāts + ADF	
		Piruvāta kināze	2.7.1.40	Fosfoenolpiruvāta analīze	Fosfoenolpiruvāts + ADF $\rightarrow$ piruvāts + ATF	

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
2.7.3	Akceptors slāpekli saturoša grupa	Kreatīna kināze	2.7.3.2	Kreatīna un kreatinīna analīze	$\text{Kreatīns} + \text{ATF} \leftarrow \rightarrow \text{kreatīna fosfāts} + \text{ADF}$	
3.	Hidrolāzes					
3.1	<b>Estera saites sašķeļšana</b>					
3.1.1	<b>Karboksilesteru hidrolāzes</b>					
		Karboksilesterāze	3.1.1.1	Piena nevēlamas smakas veidošanās sakarā ar īsas ķēdes $\text{C}_4\text{--C}_{12}$ taukskābju atšķelšanu. Augļu un dārzeņu lipolīze un oksidēšanās	$\text{RCOOR} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{R'OH}$	Piens, augi
		Triacilglicerīnu lipāze	3.1.1.3	Lielākai lipāžu daļai darbības optimums ir pH 8–9, kaut ir arī lipāzes, kuras aktīvas skābā vidē. Ja nav pietiekama kontrole, tad lipāzes var hidrolizēt lipīdus, un veicina nevēlamas sasmakušas garšas rašanos piena, gaļas, zivju un citos lipīdus bagātīgi saturošos produktos. Vienlaicīgi tās ir vēlamas, lai iegūtu noteiktam produktam raksturīgo garšu, piemēram, sieros, piena šokolādē	Hidrolīzes ātrums samazinās triacilglicerīns $\rightarrow$ 1,2-diacilglicerīns $\rightarrow$ 2-monoacilglicerīns $\rightarrow$ glicerīns Kalcijs joni palielina lipāzes aktivitāti un tās termisko stabilitāti. Kalcijs nesaturošā vidē lipāze nevar adsorbēties uz ūdens – tauku fāzi robežvirsmas. Mikrobiālās lipāzes bieži ir ļoti termiski stablas un dažas aktīvi hidrolizē taukus pat sasaldētā stāvoklī	Piens, eļļas, augu sēklas, graudaugi, augļi, dārzeņi, zīdītāju aizkuņģa dziedzēns, mikroorganismi
		Fosfolipāze $\text{A}_2$	3.1.1.4	Izmanto analīzēm. Ļoti stabila, aktīvājas ar kalcijs joniem, molekulasmasa tikai 14000	Fosfolipīdos hidrolizē taukskābes estera saiti sn-2- pozīcijā	Čūsku un bišu inde
		Acetilholīna esterāze	3.1.1.7	Serīnu saturoša esterāze	$\text{Acetilholīns} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{holīns} + \text{etiķskābe}$	Muskuļi, nervaudi
		Pektīnesterāze	3.1.1.11	Želatinēšanās un tās laika regulācijai	$\text{Pektīns} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pektīnskābe} + \text{metanols}$	Augi, mikroorganismi
		Fosfolipāze $\text{A}_1$	3.1.1.32	Izmanto analīzēm. Kopā ar fosfolipāzi $\text{A}_2$ sastopama daudzos zīdītājos un baktērijās	Specifiski šķeļ SN-1 estera saiti diacilfosfatīdos	Zīdītāji, mikroorganismi
3.1.3	Fosfātu monoesteru hidrolāzes	Bāziskā fosfatāze	3.1.3.1	Izmanto pasterizēta piena atšķiršanai no svaiga	Šķeļ fosfāta estera saites. Termiski ļoti labila	Piens, medus
3.1.4	Fosfāta diestera hidrolāzes	Fosfolipāze C	3.1.4.3	Izmanto analīzēm	Hidrolizē lecitīnu par diacilglicerolu un holīna fosfātu	Čūsku inde, baktērijas

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
		Fosfolipāze D	3.1.4.4	Hidrolizē holīna fosfatīdus, bet nešķel inozītola fosfatīdus	Atšķel holīna grupu ūdens un metanola, etanola un glicerīna klātienē	Rudzī, kvieši, pakšaugi
3.2	<b>O-glikozilsavienojumu hidrolāzes</b>					
3.2.1	Glikozidāzes	$\alpha$ -amilāze	3.2.1.1	Cietes šķīdumu viskozitātes samazināšana. Aktivitāte samazinās līdz ar cietes polimerizācijas pakāpes samazināšanos. Cietes želatinēšana veicina amilāzes darbību	Hidrolizē cietes, glikogēna un citu glikānu iekšējās 1-4-g-glikozīdsaites. No amilozes atšķel 6-7 glikozes vienības. Amilopektīna glikozīdsaites hidrolizē nejausā secībā, apejot sazarojumus. Beigu produkts maltoze	Augos, dzīvniekos un mikroorganismos
		$\beta$ -amilāze	3.2.1.2	$\beta$ -amilāze nevar hidrolizēt $\alpha$ -1,6-glikozīdsaites un apiet šo saiti saturošās grupas, tāpēc amilopektīna hidrolīze ir nepilnīga vidēji 40–50% maltozes. Tā pārtrauc darbību 2–3 glikozes atlikumus pirms atzarojuma. Arī amilozī šis ferments sašķel tikai līdz 70–90% neideālās linearitātes dēļ	$\beta$ -amilāze hidrolizē cietes un glikogēna $\alpha$ -1,4-glikozīdsaites no nereducējošā gala ar anomērā oglekļa koformācijas maiņu no $\alpha$ uz $\beta$	Augos, un mikroorganismos
		Glikān-1,4- $\alpha$ -D-glikozidāze (L-glikoamilāze)	3.2.1.3		Eksoglikozidāze atšķel glikozi no nereducējošā poliglikāna gala. Tai ir zems specifiskums, jo spēj hidrolizēt $\alpha$ -1,3- un $\alpha$ -1,6-tāpat kā $\alpha$ -1,4-glikozīdsaites. Veido $\beta$ -D-glikozi	Augos, un mikroorganismos
		Celulāze	3.2.1.4	Celusomas M10 <sup>8</sup> satur celulāzi (Cx), celulozes 1,4- $\beta$ -celobiozidāzi (C1) un $\beta$ -glikozidāzi	Celuloze <sup>24</sup> > celobioze <sup>21</sup> > glikoze. $\beta$ -glikozidāze atšķel $\beta$ -D-glikozes atlikumus no 4-gala	Augos, un mikroorganismos
		Poligalakturonāze	3.2.1.15	Pektīna un protopektīna sašķelšana sulās. Sulu azidrināšana	Sašķel iekšējās glikozidās saites pektīnā	Augi
		Lizocīms	3.2.1.17	Grampozitīvo baktēriju šūnu sienīņu sašķelšana	Sašķel 1-4- $\beta$ -glikozidās saites peptidoglikāna (mureīnā) starp N-acetilglikozamīnu un N-acetilmurāmskābi	Olas baltums, dzīvnieku audi, augu piensulas, mikroskopiskās sēnes

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
		$\alpha$ -D-glikozidāze (maltāze)	3.2.1.20	Maltozes noteikšana	Maltoze + H <sub>2</sub> O → 2 glikoze	Plaši izplatīta
		$\beta$ -D-glikozidāze	3.2.1.21	Rudzu miltu un rudzu maizes ar daļēju pentozānu sašķelšanu, augļu, biezeņu, sausu kartupeļu putru kvalitātes uzlabošana. Kopā ar proteīnāzēm garneju izlobīšanai no čaulām	Tehniskie preparāti satur hekso- un pento- $\beta$ -glikozidāžu maisījumu, kopā ar celulāzēm $\beta$ -mannozidāzēm un pektolītiskiem enzīmiem	<i>Aspergillus niger</i>
		$\alpha$ -D-galaktozidāze	3.2.1.22	Rafinozes sadalīšanai cukura rūpniecībā pirms kristalizācijas	O- $\alpha$ -D-Gal <sub>3</sub> (1-6)-O- $\alpha$ -D-Glc <sub>6</sub> -(1-2)- $\beta$ -D-Fru <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O → Galaktoze + Saharoze	Mikroorganismi
		$\beta$ -D-galaktozidāze (laktāze)	3.2.1.23	Imobilizētu enzīmu izmanto piena laktozes hidrolīzei saldējuma un laktozi nesaturošas diētas piena ražošanā	Laktoze + H <sub>2</sub> O → galaktoze + glikoze	<i>Aspergillus niger</i> , raugi
		$\beta$ -fruktofuranozidāze (invertāze, saharāze)	3.2.1.26	Invertcukura iegūšanai no saharozes konditorijas rūpniecībā. Medus termiskās apstrādes konstatēšanai	Saharoze + H <sub>2</sub> O → glikoze + fruktoze	Raugi
		1,3- $\beta$ -D-ksilanāze	3.2.1.32	Celulāžu sastāvā (sk. augstāk)	Šķeļ iekšējās 1,4- $\beta$ -D-glikozidās ksilozes veidotās saites hemicelulozēs	Augi, mikroorganismi
		$\alpha$ -L-ramnozidāze	3.2.1.40	Rūgtās garšas novēršanai, hidrolizējot flavona glikozidās saites citrusaugļu sulās un bieženos	Naringīns + H <sub>2</sub> O → naringenīns + L-ramnoze (6-deoksi-L-mannoze) + glikoze	<i>Phormopsis citri</i> , <i>Cochliobolus miyabeanus</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>
		Pullunāze	3.2.1.41	Cietes hidrolīzē, ogļhidrātu analīze	Hidrolizē amilopektīna, glikogēna un pululāna 1-6- $\alpha$ -glikozidās saites, veidojot amilozes fragmentus	Dažādi augi
		Eksopoligalakturonāze	3.2.1.67	Galakturonskābes atšķelšana no pektīnskābes. Pektīnu analīzei	Pektīnskābe + H <sub>2</sub> O → galakturonskābe	Augi un mikroorganismi
3.2.3	S-glikozilsavienojumu hidrolāzes	Tioglikozidāze (mirozīnāze)	3.2.3.1	Sinepju eļļu saturošu glikozinolātu sadalīšana	Glikozinolāti + H <sub>2</sub> O → izotiocianāti (sinepju eļļas) + glikoze	Krustzieži

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
3.4	<b>Peptidāzes</b>					
3.4.21	Serīna endopeptidāzes	Mikrobiālā serīna endopeptidāze, piem., subtilizīns	3.4.21.62	Gaļas mīkstināšanai	Serīna proteāze, kura hidrolizē aromātisko aminoskābju veidotās peptīda saites	Mikroorganismi
3.4.22	Cisteīna endopeptidāzes	Papaīns	3.4.22.2	Gaļas mīkstināšanai, apsmidzinot vai izplatot pa asinsrites sistēmu tūlīt pirms vai pēc kaušanas. Piena sarecināšanai	Tas hidrolizē gan peptīdus ar īsu ķēdi gan olbaltumvielas ar lielu molekulu masu. Papaīnu stipri inhibē oligopeptīdi, kam no C gala otrā aminoskābe ir fenilalanīns. Enzīmam piemīt arī peptīdu saiti sintēzes spējas	Papajas ( <i>Carica papaya</i> ) sula (latekss)
		Ficīns	3.4.22.3	Gaļas mīkstināšanai. Baltā duļķojuma novēršanai alū	Pēc darbības līdzīgs papaīnam	Vīģes sula
		Bromelains	3.4.22.33	Gaļas mīkstināšanai. Baltā duļķojuma novēršanai alum	Pēc darbības līdzīgs papaīnam	Ananāsi
3.4.23.	Asparagīnskābes endopeptidāzes	Himozīns (renīns)	3.4.23.4	Jau sen plaši lieto siera ražošanā. Piena sarecināšanas spēja ātri zūd neitrālā un bāziskā vidē. Pie pH 3,5–4,5 ātri zaudē aktivitāti pašsagreimošanās dēļ	Iedarbojoties uz kazeīnu, pārvērš to par makroglikoproteīnu un p-X-kazeīnu, kurš izgulsnējas ar kalcija joniem, veicinot citu kazeīna frakciju līdzizgulsnēšanos	No teļu kūģa ceturtā iecirkņa proenzīma veidā
3.4.24	Metaloendopeptidāzes	Termolizīns	3.4.24.27			1.4.5.2.3
3.5	<b>Iedarbojas uz C-N saitēm, kuras nav peptīdu saites</b>					
3.5.2	Cikliskos amīdus	Kreatināze	3.5.2.10	Gaļas garšas uzlabošanai. Analīzei	Kreatīns + H <sub>2</sub> O ← → kreatīns	2.6.1
<b>4.</b>	<b>Liāzes</b>					
4.2	<b>C-O liāzes</b>					
	Iedarbojas uz polisaharīdiem	Pektāta liāze	4.2.2.2	Sulu dzidrināšanai. Aktīva kalcija jonu klātienē. Darbojas bāziskā vidē (pH 8,5–9,5)	Pektīnskābes endopoligalakturonātu liāze	Mikroorganismi
		Eksopoli-galakturonāta liāze	4.2.2.9	Sulu dzidrināšanai.	Pektīnskābes ekso-poligalakturonātu liāze	Mikroorganismi
		Pektīna liāze	4.2.2.10	Sulu dzidrināšanai, aktīva kalcija jonu klātienē. Darbojas bāziskā vidē (pH 8,5–9,5)	Pektīna endopoligalakturonātu liāze	Pelējumu sēnes

Klases un apakšklases kods	Klases vai apakšklases nosaukums	Enzīms	EC-numurs	Pielietojums	Reakcija	Avots
5.	<b>Izomerāzes</b>					
5.3	<b>lekšmolekulārās oksireduktāzes</b>					
5.3.1	Aldozes un ketozes pārvēršana	Ksilozes izomerāze	5.3.1.5	Glikozes – fruktozes sīrupa ražošana no glikozes	Glikoze $\leftarrow \rightarrow$ Fruktoze	Mikrobi, ģēnu inženierija
		Glikozes 6-fosfāta izomerāze	5.3.1.9		Glikozes 6-fosfāts $\leftarrow \rightarrow$ fruktozes 6-fosfāts	Plaši izplatīta

### 3.6. Enzīmu izmantošana pārtikā un pārtikas tehnoloģijā

Neapzināti enzīmus ēdiena pagatavošanā lietoja jau no aizvēsturiskiem laikiem. Enzīmi ir vai nu pārtikas būtiska sastāvdaļa, vai arī tos izdala no mikroorganismiem un citiem avotiem. Bagātinātu vai attīrītu dzīvnieku, augu, it sevišķi mikroorganismu izcelsmes, enzīmu preparātu pievienošana ir pēdējā laika prakse. Šāda mērķtiecīga piedevu izmantošana rada ļoti daudzas priekšrocības pārtikas tehnoloģijā; izteiktu substrātu specifiskumu, lielu reakcijas ātrumu maigos apstākļos (temperatūra, pH, jonu spēks), ātru, nepārtrauktu un vieglu reakcijas procesa kontroli ar nelieliem ekspluatācijas izdevumiem un ieguldījumiem.

#### 3.6.1. Enzīmu avoti

Atkarībā no enzīma lietošanas jomas ir dažādas prasības to tīrības pakāpei, sastāvam un ieguves avotam. Piemēram, zinātniskiem pētījumiem, medicīnā un analītiskiem mērķiem izmanto tikai individuālus, ļoti augstas tīrības enzīmus, kamēr lauksaimniecības atkritumu pārstrādei pietiek ar daudzkomponentu kompleksiem enzīmu preparātiem, turklāt ar zemāku tīrības pakāpi tie ir efektīvāki.

Enzīma avota izvēle atkarīga no 1) enzīma preparāta patēriņa, 2) avota pieejamības, 3) izejvielas kompleksas pārstrādes iespējām, 4) ražošanas izmaksām, 5) specifiskām prasībām par nekaitīgumu.

3.7. tabula

No mikroorganismiem iegūtu enzīmu piemēri

Enzīma nosaukums	Avots	Izmantošana
Sekrēcijas enzīmi		
α-amilāze	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Cietes hidrolīze glikozes, glikozes un fruktozes sīrupa, spirta ražošanā
β-glukanāze	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Alus rūpniecībā
Celulāze	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Celulozi saturošu izejvielu hidrolīzē
Dekstranāze	<i>Penicillium sp.</i>	Dekstrīnu hidrolīze sulu ražošanā
Glikoamilāze	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus sp.</i>	Cietes sacukurošanā, spirta rūpniecībā
Hemicelulāze	<i>Aspergillus niger</i>	Laktozes hidrolīze pārtikas rūpniecībā
Laktāze	<i>Aspergillus niger</i>	Laktozes hidrolīze pārtikas rūpniecībā
Lipāze	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida cylindraceae</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Mucor sp.</i>	Pankreatiskās lipāzes aizstāšana tauku hidrolīzē, siera rūpniecībā
Pektināze	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i>	Sulu un vīna rūpniecībā
Proteāze	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Mazgāšanas līdzekļu ražošanā, olbaltumvielu hidrolīze uzturlīdzekļu un lopbarības rūpniecībā, ādas rūpniecībā, gaļas rūpniecībā, graudu hidrolīze alus rūpniecībā
Proteāze un mikroorganismu renīns	<i>Endothia parasitica</i> , <i>Mucor miehei</i> ,	Piena sarecināšanā
Pullulanāze	<i>Mucor pusillus</i> , <i>Klebsiella acrogenes</i>	Amilopektīna hidrolīze cietes hidrolīzes rūpniecībā
Šūnu iekšējie enzīmi		
L-asparagināze	<i>Escherichia coli</i>	Akūtas leikozes ārstēšanai
Katalāze	<i>Aspergillus niger</i>	Piena rūpniecībā sterilizēšanai lietotā H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> neutralizācijai
Holesteroloksidāze	<i>Nocardia rhodochrous</i>	Holesterīna analīzē
β-galaktozidāze	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Sascharomyces baltus</i>	Laktozes hidrolīzē
Glikoizomerāze	<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Sreptomyces sp.</i>	Glikozes fruktozes sīrupa ražošanā
Invertāze	<i>Saccharomyces cereviscae</i>	Saharozes hidrolīzē
Penicilinacilāze	<i>Escherichia coli</i>	Benzilpenicilīna deacilēšanā

Galvenie enzīmu avoti: dzīvnieku audi, (aizkuņģa dziedzeris un kuņģis), augu audi (papaīns no melnkokoka *Cacica papaya* piensulas, bromelīns no ananasa stiebriem, ficīns no *Ficus* koka sulas un

lapām) un mikroorganismi, kas ir vispieejamākais un gandrīz neierobežots enzīmu avots. Celulītiskos enzīmus – glikoizomerāzes u. c. – var iegūt tikai no mikroorganismiem.

No mikrobiem iegūto enzīmu preparātu priekšrocības salīdzinājumā ar augu vai dzīvnieku izcelsmes enzīmu preparātiem ir šādas:

- 1) plašs producēto enzīmu spektrs ļauj mikroorganismus izmantot vairāku enzīmu iegūšanai;
- 2) mikroorganismu audzēšana notiek viegli pieejamās vidēs, ieskaitot dažādus rūpniecības atkritumus;
- 3) liels augšanas ātrums nodrošina ātru biomasas uzkrāšanu;
- 4) iespējams ievērojami intensificēt rindu enzīmu veidošanos ar vides izvēli, selekciju un mutantu iegūšanu;
- 5) sekretēto enzīmu uzkrāšanās vidē vienkāršo to izdalīšanu.

Enzīmu preparāti bez galvenā enzīma satur vēl vairākus citus enzīmus un dažādas balastvielas.

Dažreiz par enzīmu preparātiem izmanto veselas mikroorganismu šūnas, jo tām ir liela stabilitāte, tās ir lētas un satur nepieciešamās multienzīmu sistēmas.

### 3.6.2. Tehniskie enzīmu preparāti

**Sasmalcināšana un ekstrahēšana.** Audu sasmalcināšanā jāievēro vairāki piesardzības pasākumi: sasmalcināšanas procedūra jāveic tā, lai pārplēstu šūnu apvalkus un šūnu saturu varētu ekstrahēt. Parasti to izdara ekstrakcijas buferšķīduma klātienē, kam pievieno piedevas enzīmu aizsardzībai pret oksidēšanos un smago metālu iedarbību. Sevišķi grūti ir izdalīt ar membrānām cieši saistītus enzīmus, jo membrānas lipīdi ūdenī nešķīst. Šādu enzīmu atdalīšanu var veicināt ar virsmas aktīvām vielām. Tā kā enzīmu koncentrācija audos ir neliela, parasti nākas apstrādāt ļoti lielus audu daudzumus, ņemot vērā arī enzīmu zudumus tālākajā attīrīšanā.

3.8. tabula

Biežāk lietotās enzīmu izdalīšanas un attīrīšanas metodes

Attīrīšanas stadija	Attiecīgajā stadijā izmantojamās metodes un vielas
<b>Šūnu dezintegrācija</b>	Mehāniskā, fizikālā, ķīmiskā, enzīmatīvā, bioloģiskā
<b>Enzīmu ekstrakcija</b>	Ar ūdeni, atšķaidītām skābēm un bāzēm, buferšķīdumiem, organiskiem šķīdinātājiem, ūdens divfāzu sistēmām
<b>Nešķīstošu daļiņu atdalīšana</b>	Centrifugēšana, filtrācija, separācija
<b>Neolbaltumvielu atdalīšana</b>	
Mazmolekulāru vielu atdalīšana	Dialīze, gelfiltrācija, ultrafiltrācija
Nukleīnskābju atdalīšana	Nukleāzes, protamīns
Lipīdu atdalīšana	Organiskie šķīdinātāji
<b>Olbaltumvielu un enzīmu maisījumu sadalīšana</b>	
Nogulsnēšana	Ar sāļiem, organiskiem šķīdinātājiem, polimēriem, biospecifiskiem aģentiem
Sadalīšana ūdens divfāzu sistēmās	Ar polimēru ūdens šķīdumiem
Blakus olbaltumvielu denaturācija	Ar skābēm, bāzēm, paaugstinātā temperatūrā
Hromatogrāfija	Adsorbcijas, kovalentā, hidrofobā, jonu apmaiņas, sadalījuma, afīnā, gelfiltrācijas
Centrifugēšana	Zonālā ātruma, blīvuma gradientā
Elektroforēze	Zonālā diskelektroforēze, izotahoforēze
Izoelektriskā fokusēšana	Kolonnās un uz plakana gela
Kristalizācija	Ar sāļiem, organiskiem šķīdinātājiem
<b>Koncentrēšana</b>	Ultrafiltrācija, liofilā žāvēšana, vakuumietvaice, dialīze, izgulsnēšana ar sāļiem un organiskiem šķīdinātājiem

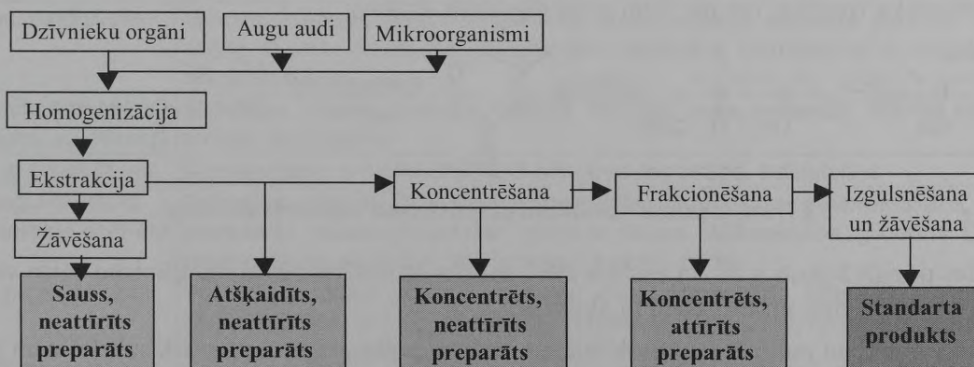
**Enzīmu attīrīšana.** Enzīmu attīrīšanā parasti piemaisījumus pakāpeniski atdala no proteīna. Pirmais solis ir proteīna izgulsnēšana, piesātinot tā šķīdumu ar amonija sulfātu. Pēc tam atdalīto proteīnu var sadalīt pēc molekulas ar kolonnu gelhromatogrāfiju. Enzīmu saturošo frakciju pēc tam tālāk attīra ar jonapmaiņas hromatogrāfijas metodi. Var izmantot arī preparatīvo elektroforēzi, gelu diskelektroforēzi vai izoelektrisko fokusēšanu. Attīrīšanas procedūru ievērojami saīsina afīnās hromatogrāfijas metode, kurā nekustīgā fāze satur specifisku enzīma inhibitoru, kas nodrošina enzīma selektīvu saistīšanu. Enzīmu no kolonnas izskalo ar citu inerta proteīna, kurš labāk saistās ar inhibitoru, šķīdumu.

**Tīrības kontrole.** Kontrolei izmanto augstas efektivitātes elektroforēzes vai augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfiju (AEŠH). Hromatogrammas raksturs dod papildu informāciju par enzīma tīrību. Simetrisks eluēšanās maksimums ar atbilstošu absorbcijas maksimumu un specifisko aktivitāti, kura nemainās tālākā attīrīšanā, liecina, ka metode tālāku attīrīšanu nenodrošina.

3.9. tabula

Pupu glikozidāzes izdalīšanas rezultāti (Belitz *et al.*, 2004)

Izdalīšanas solis	Proteīns (mg)	α-glikozidāze			
		Aktivitāte (μcat)	Specifiskā aktivitāte (μcat/mg)	Bagātināšanās (reizes)	Iznākums (%)
Ekstrakcija ar acetāta buferi, 0,01 mol/L, pH 5,3					
Piesātināšana līdz 90% ar amonija sulfātu un sekojošu izšķīdināšanu acetāta buferī, 0,01 mol/L, pH 5,3	44200	3840	0,087	1	100
Izgulsnēšana ar polietilēnglikolu (20%). Nogulsnes pēc tam šķīdina 0,025 mol/L tris-HCl buferī pie pH 7,4	7610	3590	0,47	5,4	93
Hromatogrāfija jonapmaiņas kolonnā ar DEAE-celulozi	1980	1650	0,83	9,5	43
Hromatogrāfija jonapmaiņas kolonnā ar SP-Sephadex C-50	130	845	6,5	75	22
Preparatīva izoelektriskā fokusēšana	30	565	18,8	216	15



3.11. att. Enzīmu preparātu rūpnieciska ražošana

Atšķirībā no augsti attīrītiem zinātniskiem un analītiskiem mērķiem paredzētiem enzīmiem tehniskiem mērķiem izmantojamo enzīmu ieguves tehnoloģija virzīta uz to savienojumu un faktoru atdalīšanu, kas var būt traucējoši tālākā enzīmu izmantošanā, bet saglabājot ekonomiski pieņemamas izmaksas. Biežāk lietotās izdalīšanas metodes ir:

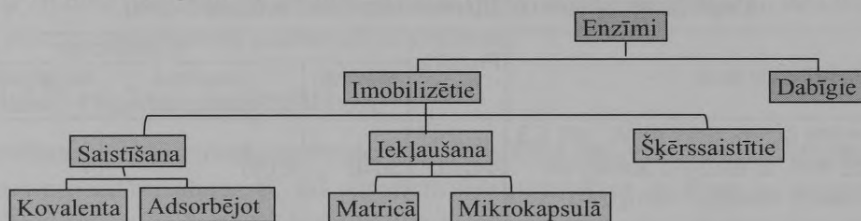
- selektīva jonu spēka vai pH izmaiņa;
- adsorbcija uz neorganiskiem gēliem (piem., kalcija fosfāta vai hidroksiapatīta gēla);
- gelhromatogrāfijas metodes (sadalīšana uz poraina gēla pēc molekulas);
- ultrafiltrēšana (filtrēšana caur membrānām).

Reti šiem mērķiem izmanto dārgās jonu apmaiņas hromatogrāfijas, afinās hromatogrāfijas un preparatīvās elektroforēzes metodes. Komerciāliem enzīmu preparātiem ieregulē enzīma katalītisko aktivitāti, pievienojot inertu pildvielu, piemēram, sāļus vai ogļhidrātus. Enzīma saturs tajos parasti ir relatīvi zems, piemēram, proteināžu preparātos enzīma saturs nepārsniedz 5–10 %, bet amilāzes preparāti, kurus pievieno miltiem, satur tikai 0,1 % sēņu  $\alpha$ -amilāzes.

Galvenais kritērijs metodes izvēlē ir enzīma aktivitāte un deaktivācija.

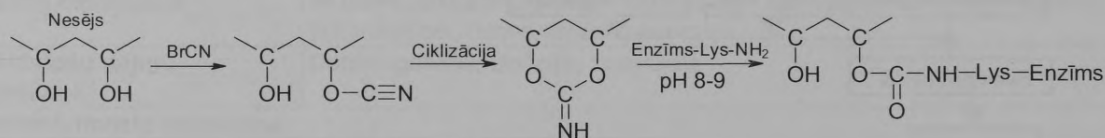
### 3.6.3. Imobilizētie enzīmi

Enzīmu šķīdumu var izmantot tikai vienu reizi, un pastāv risks, ka pat denaturēta enzīma klātbūtne galaproduktā var izraisīt alergiskas parādības. Turpretī uz nesēja fiksētu enzīmu var izmantot atkārtoti. Tas ir ļoti būtiski nepārtrauktas darbības iekārtās, kurās enzīmu nostiprina uz stacionārās fāzes, ar ko piepildīts aparāts, kurā veic tehnoloģiskā procesu. Šajā gadījumā reakcijas ātrumu un dziļumu viegli kontrolēt, izmainot plūsmas ātrumu. Enzīmu imobilizēšanu veic ar dažādām metodēm (sk. 3.12. att.).



3.12. att. Enzīmu imobilizēšana

Enzīmu ar nesēju var saistīt ar kovalentām saitēm vai adsorbējot, izmantojot lādiņu mijiedarbības, ūdeņraža saišu vai hidrofobās mijiedarbības hemosorbciju. Kovalentai saistīšanai izmanto peptīdu ķīmijas metodes, kad nesēju vispirms aktivē, padarot tā virsmas funkcionālās grupas reaģētspējīgas attiecībā uz proteīna aminogrupām, un maigos apstākļos pie aktīviem centriem pievieno enzīmu (sk. 3.13. att.). Par nesējiem izmanto neorganiskas, organiskas vielas (sintētiskos un biopolimērus) vai neorganiskos nesējus, kas pārklāti ar organiskas vielas slāni. Neorganisko nesēju priekšrocība ir to lielā mehāniskā izturība, bet pie tiem grūti piesaistīt enzīmu.



3.13. att. Enzīmu kovalenta piesaistīšana celulozes matricai

Metodes pozitīvā puse ir tā, ka enzīms cieši saistīts ar nesēju, bet jaunu ķīmisko saišu veidošana kropļo enzīma molekulu un līdz ar to tā aktivitāti.

Enzīmu var iekļaut polimēra režģa dobumos, un caur polimēra porām notiek substrāta un produkta apmaiņa, ko viegli kontrolēt, izmainot plūsmas ātrumu.

Enzīmu var iekļaut puscaurlaidīgas membrānas mikrokapsulās vai dobu šķiedru kūļos.

Ar bifunkcionāliem savienojumiem, piemēram, glutārskābes aldehīdu enzīmu molekulas var “sašūt” kopā lielos nešķīstošos agregātos, kuri saglabā katalītisko aktivitāti. Šīs metodes trūkums ir enzīmu nelielā mehāniskā stabilitāte, tāpēc tos vairāk izmanto analītiskiem mērķiem.

Visvājākā saistība ar nesēju veidojas adsorbcijas rezultātā, kas rada neizbēgamus enzīma zaudējumus.

Imobilizēto enzīmu īpašības ievērojami ietekmē nesējs un imobilizācijas metode.

**Ietekme uz  $K_m$ .** Salīdzinājumā ar dabīgo enzīmu nepieciešamas lielākas substrāta koncentrācijas, lai piesātinātu imobilizētā enzīma aktīvos centrus, jo jānodrošina koncentrācijas gradients polimēra

porās. Imobilizētā enzīma šķietamā Mihaelisa konstante ( $K_m$ ) arī palielinās matricas elektrostātiskā lādiņa ietekmē pat tad, ja lādiņi sakrīt pēc zīmēm, jo daļa substrāta var adsorbēties uz nesēja.

**Optimālā pH izmaiņas.** Nesēja negatīvi lādētas grupas palielina kovalenti saistītā enzīma optimālā pH vērtību, kamēr pozitīvi lādētās – samazina līdz pat divām vienībām.

**Termiskā stabilitāte.** Imobilizācija bieži palielina enzīma termisko izturību, jo jaunās kovalentās saites papildus stabilizē proteīna trešējo struktūru.

### 3.7. Pārtikas produktu enzimatiskās analīzes metodes

Ar enzimatisko analīzi pārtikas ķīmijā saprot pārtikas sastāvdaļu noteikšanu, kas var būt gan substrāti un enzīmu inhibitori, kā arī enzīmu aktivitātes noteikšanu. Metodēm raksturīgas vairākas īpašības.

1. Augsts specifiskums un ticamība. Enzīma aktīvā centra konformācijas atbilstība substrātam nodrošina specifiskumu. Bieži izmanto vairāku enzīmu katalizētu analītisko reakciju ķēdi.
2. Vienkārša paraugu sagatavošana, kas izslēdz analizējamā komponenta zudumus. Dažos gadījumos noteikšanu var izdarīt pat bez iepriekšējas apstrādes, ja tajā nav traucējošu faktoru. Ja nepieciešams, tad izmanto vienkāršas metodes: atšķaidīšanu, filtrāciju vai centrifugēšanu, neitralizāciju vai paskābināšanu, ekstrakciju, atkrāsošanu.
3. Vienkārša un ātra mērīšanas procedūra, izmantojot fotometriskās metodes.
4. Metodes augsta jutība un atkarotamība.
5. Universālums.
6. Mazi izdevumi.
7. Nekaitīgi reaģenti.

3.10. tabula

Enzīmu izmantošana pārtikas produktu komponentu noteikšanai

Produktu grupa	Analizējamie komponenti
Bērnu uzturs un diētiskie produkti	Saharozē, glikozē, fruktozē, laktozē, maltozē, ciete, askorbīnskābe, citronskābe, D un L pienskābe, sorbīts, ksilīts, lecitīns, holīns
Alus, vīns, dzirkstošie vīni	Glikozē, fruktozē, saharozē, glikozes sīrups, etanols, glicerīns, sorbīts, sulfīts, D un L pienskābe, glikonskābe, etiķskābe, citronskābe, dzintarskābe, askorbīnskābe
Maize, un konditorejas izstrādājumi, saldējums	Saharozē, glikozē, fruktozē, laktozē, maltozē, ciete, metanols, sorbīts, ksilīts, lecitīns, holesterīns
Olas un to izstrādājumi	Dzintarskābe, L pienskābe, D-3-hidroksisviestskābe, holesterīns
Sulas, augļu produkti, bezalkoholiskie dzērieni	Saharozē, glikozē, fruktozē, izocitronskābe, citronskābe, askorbīnskābe, D un L pienskābe, etanols, etiķskābe, glikozes sīrups, skābeņskābe, glicerīns, D un L ābolskābe, skudrskābe, glikonskābe, sorbīts, nitrāti
Gaļa un gaļas produkti	Saharozē, laktozē, glikozē, galaktozē, ciete, citronskābe, etiķskābe, glikonskābe, glutamīnskābe, D un L pienskābe, skudrskābe, glicerīns, amonjaks, urīnviela, kreatīns, kreatinīns, pirofosfāti, holesterīns
Piens un piena produkti	Laktozē, glikozē, galaktozē, fruktozē, ciete, saharozē, citronskābe, etiķskābe, L ābolskābe, etanols, acetaldehīds, triacilglicerīni, urīnviela, nitrāti
Pārtikas koncentrāti	Kreatīns, glutamīnskābe, saharozē, ciete
Cukurs un tā izstrādājumi	Saharozē, glikozē, fruktozē, rafinozē, skudrskābe, citronskābe, D un L pienskābe, sorbīts, etanols

Pārtikas produktu enzimatiskās analīzes metodes lieto ražošanas, gatavās produkcijas un izejvielu kvalitātes kontrolē.

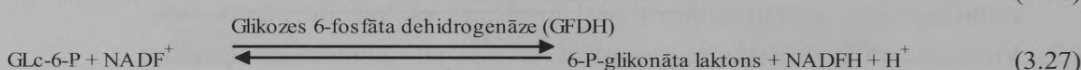
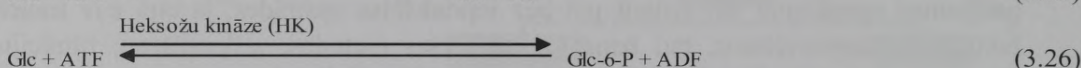
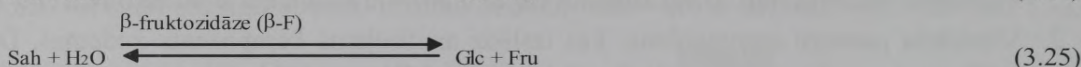
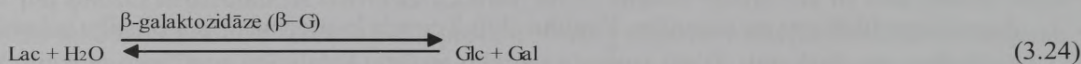
#### 3.7.1. Substrāta noteikšana

Substrāta noteikšanā izmanto spektroskopiskās vai elektroķīmiskās metodes. Ja tas nav iespējams, tad noteikšanai izmanto sajūgto enzimatisko metodi, kurā pārtikas produkts palīdz enzimatīvā reakcijā

pārvēršas produktā, kas indikatorreakcijā reaģē ar indikatora enzīmu un veido produktu, kura veidošanās vai sadalīšanās var viegli noteikt.



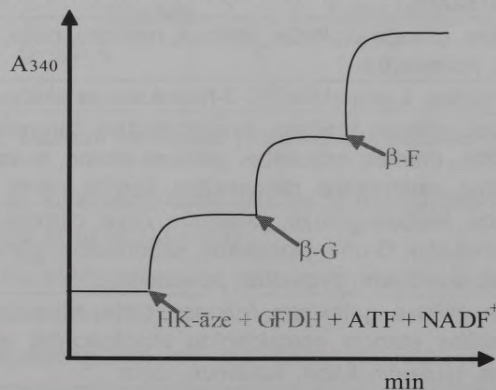
kur: **A** ir pārtikas sastāvdaļa, kuras daudzums jānosaka. **C** vai **R**, vai **S** ir mērāmie lielumi (vielas). Sajūgtās indikatorreakcijas līdzsvars ir atkarīgs no koncentrācijas. Reakcijas jāizdara tā, lai nodrošinātu palīgreakcijas produkta **P** aizvākšanu pirms līdzsvara sasniegšanas palīgreakcijā. Izmantojot vairākas secīgas palīgreakcijas un vienu indikatorreakciju, vienlaicīgi var noteikt vairākus komponentus vienā un tai pašā paraugā (reakcijas 3.24 – 3.27).



Pēc otro substrātu **ATF** un **NADF<sup>+</sup>** ievadīšanas pievieno heksozokināzi (**HK**) un glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzi (**GFDH**), kad summārā absorbcija nepieaug, pievieno pēc kārtas  $\beta$ -galaktozidāzi ( $\beta$ -G) un pēc absorbcijas palielinājuma izbeigšanās –  $\beta$ -fruktozidāzi ( $\beta$ -F) (sk. 3.14. att.).

### 3.7.1.1. Beigu punkta metode

Beigu punkta metodi var lietot tad, ja reakcija iet līdz galam. Pretējā gadījumā tas jānodrošina ar līdzsvara nobīdi produkta veidošanās virzienā vai nu palielinot reaģentu koncentrāciju, vai arī izolējot vienu no produktiem no reakcijas vides. Ja to nevar nodrošināt, tad jāveido kalibrācijas līkne, izmantojot standartus. Pretēji kinētiskajām metodēm analizējamā substrāta koncentrācijai jābūt lielākai par palīgreakciju katalizējošā enzīma Mihaelisa konstanti. Reakcijas laiku var viegli aprēķināt, ja limitējošās reakcijas stadijas reakcijas ātrums atbilst pirmās kārtas kinētikai.



3.14. att. Enzimātiska glikozes, laktozes un saharozes noteikšana vienā vidē

Divu substrātu reakcijas gadījumā jānodrošina, lai ferments būtu piesātināts ar otro substrātu, kura koncentrāciju nenosaka. Tas nodrošina reakcijas atbilstību Mihaelisa–Mantena vienādojumam, un reakcijai nepieciešamā enzīma aktivitāti var aprēķināt gan viena, gan divu substrātu gadījumam.

Fermenti ar mazu  $K_m$  ir vēlamāki, jo nodrošina lielāku beigu punkta metodes manevrējamību.

$K_m$  un  $V_{max}$  vērtības izmanto reakcijas ilguma aprēķinam. Priekšnosacījums ir, lai reakcijas līdzsvars būtu novirzīts produkta veidošanās virzienā ne mazāk kā par 99%.

### 3.7.1.2. Kinētiskā metode

Substrāta koncentrāciju nosaka pēc reakcijas ātruma mērījumiem. Lai saīsinātu analīzes laiku, var neievērot prasību par pilnīgu substrāta pārvērtību. Kinētiskās metodes mazāk pakļaujas traucējumiem, tāpēc tām ir priekšrocības enzimatiskās analīzes automatizācijā.

Substrāta noteikšanai kinētisko metodi var lietot tikai tad, ja reakcijas ātruma izmaiņa ir proporcionāla substrāta koncentrācijai, t. i., ja tā  $C_s \ll K_m$ , piem.,  $C_s = 0,05 \times K_m$ :

$$v_o = \frac{V_{\max}}{K_m} C_s \quad (3.28)$$

Jāizpilda šādi nosacījumi:

1. Divu substrātu reakcijas gadījumā jānodrošina vismaz tik liela otrā substrāta koncentrācija, lai reakcijas ātrums būtu atkarīgs tikai no nosakāmā substrāta koncentrācijas.
2. Vēlams izmantot enzīmus ar lielu  $K_m$ , kas nodrošina lielas nosakāmā substrāta koncentrācijas iespējamību (reakcijas norisi lineārajā apgabalā).
3. Ja nav iespējams izmantot enzīmu ar lielu  $K_m$ , tad pielietotā enzīma  $K_m$  palielina ar konkurējošo inhibitoru.

Reakcijas ātrums ar inhibitoru pie  $C_s \ll K_m = C_s < 0,05 \times K_m$ :

$$V_o = \frac{V_{\max}}{K_m \left(1 + \frac{C_I}{K_I}\right)} \cdot C_s \quad (3.29)$$

kur:  $C_I$  – konkurējošā inhibitora koncentrācija,  $K_I$  – konkurējošā inhibitora un enzīma kompleksa veidošanās – stabilitātes konstante.



$$K_I = \frac{C_E \cdot C_I}{C_{EI}} \quad (3.31)$$

kur:  $C_E$  – enzīma koncentrācija,  $C_{EI}$  – enzīma un inhibitora kompleksa koncentrācija.

Inhibitors palielina  $K_m$   $1 + C_I/K_I$  reizes. Inhibitoru var lietot jebkurai secīgai reakcijai, padarot to par limitējošo.

### 3.7.2. Enzīma aktivitātes noteikšana

Enzīma aktivitātes noteikšana ir būtiska pārtikas produktu termiskās apstrādes pilnības novērtēšanai, izejvielu kvalitātes novērtēšanai, pārstrādes procesa parametru optimizācijai, tehnoloģijā izmantojamo enzīmu preparātu kvalitātes un aktivitātes raksturošanai pirms to pielietošanas.

Enzīma aktivitātes mērs ir tā katalizētās reakcijas ātrums, ko nosaka optimālos apstākļos, kad optimāli ir:

- buferšķīduma jonu spēks un pH;
- substrāta, kosubstrāta un izmantotā aktivatora koncentrācija;
- vides temperatūra.

Optimālo apstākļu ievērošana ir ļoti būtiska, jo bieži salīdzināšanai nevar izmantot salīdzināšanas standartus. Svarīgi ir ievērot temperatūru un novērst tās svārstības, jo tās izmaiņas par 1 grādu izmaina enzīma reakcijas ātrumu aptuveni par 10%. Ja vien iespējams, temperatūrai jābūt 25 °C.

Ideāli substrāta koncentrācijai būtu jābūt daudz reižu lielākai par Mihaelisa konstanti ( $C_s \gg K_m$ ), kas ne vienmēr iespējams sakarā ar substrāta šķīdības ierobežojumiem, lielu substrāta spektroskopisko absorbciju vai lielas substrāta koncentrācijas inhibējošo ietekmi. Šādos gadījumos patiesās enzīma aktivitātes noteikšanai jālieto speciālas metodes.

Enzīma aktivitāti parasti izsaka ar tā katalizētās reakcijas sākuma ātrumu ( $V_0$ ). Tā mērvienība ir  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ , kuru var izteikt arī kā enzīma vienību (U) vai katalu (kat), pie tam  $1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} 1 \text{ U} = 16,67 \text{ nanokat}$ . Termins "aktivitāte" (kopējā aktivitāte) apzīmē kopējo fermenta vienību skaitu paraugā. Specifiskā aktivitāte ir vienību skaits miligramā proteīna (vienības  $\text{mg}^{-1}$ ).

3.11. tabula

Pārtikas komponentu enzimatiskās analīzes piemēri

Substrāts	Paļģireakcija	Paļģenzģms	Indikatorreakcija	Indikatorenzģms
Glikoze	$\beta\text{-D-glikopiranoze} + \text{O}_2 \rightarrow \delta\text{-D-glikonolaktons}$	Glikozes oksidģze	$\text{o-diazidģns} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{oksidģts o-diazidinģns} + \text{H}_2\text{O}$	Peroksidģze
Glikoze	$\text{D-glikopiranoze} + \text{ATF} \rightarrow \text{glikopiranozes 6-fosfģts}$	Heksozokinģze	$\text{Glikopiranozes 6-fosfģts} + \text{NADF}^+ \rightarrow \delta\text{-D-glikonolaktons} + \text{NADFH} + \text{H}^+$	Glikozes 6-fosfģta dehidrogenģze
Fruktoze	$\text{Fruktoze} + \text{ATF} \rightarrow \text{fruktozes 6-fosfģts} \rightarrow \text{glikopiranozes 6-fosfģts}$	Heksozokinģze Heksozofosfģtu izomerģze	$\text{Glikopiranozes 6-fosfģts} + \text{NADF}^+ \rightarrow \delta\text{-D-glikonolaktons} + \text{NADFH} + \text{H}^+$	Glikozes 6-fosfģta dehidrogenģze
Sorbitols			$\text{D-sorbitols} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{fruktoze} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Sorbitola dehidrogenģze
Galaktoze			$\text{D-galaktoze} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{D-galaktono-}\gamma\text{-laktons} + \text{NADFH} + \text{H}^+$	Galaktozes dehidrogenģze
Maltoze	$\text{Maltoze} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ glikoze}$ $\text{Glikoze} + \text{ATF} \rightarrow \text{glikozes 6-fosfģts}$	$\alpha$ -glikozidģze Heksozokinģze	$\text{Glikozes 6-fosfģts} + \text{NADF}^+ \rightarrow \delta\text{-D-glikonolaktons} + \text{NADFH} + \text{H}^+$	Glikozes 6-fosfģta dehidrogenģze
Ciete	$\text{Ciete} + (n-1)\text{H}_2\text{O} \rightarrow n \text{ glikoze}$ $\text{Glikoze} + \text{ATF} \rightarrow \text{glikozes 6-fosfģts}$	$\alpha$ -amilģze + glikoamilģze + heksozokinģze	$\text{Glikozes 6-fosfģts} + \text{NADF}^+ \rightarrow \delta\text{-D-glikonolaktons} + \text{NADFH} + \text{H}^+$	Glikozes 6-fosfģta dehidrogenģze
Etanols			$\text{Etanols} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{acetaldehģds} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Alkohola dehidrogenģze
Glicerģns	$\text{Glicerģns} + \text{ATF} \rightarrow \text{sn-Glicerģna 3-fosfģts} + \text{ADF}$ $\text{ADF} + \text{fosfoenolpiruvģts} \rightarrow \text{ATF} + \text{piruvģts}$	Glicerģna kinģze Piruvģta kinģze	$\text{Piruvģts} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{laktģts} + \text{NAD}^+$	L-laktģta dehidrogenģze
L-laktģts			$\text{L-laktģts} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{piruvģts} + \text{NADH} + \text{H}^+$	L-laktģta dehidrogenģze
D-laktģts			$\text{D-laktģts} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{piruvģts} + \text{NADH} + \text{H}^+$	D-laktģta dehidrogenģze
Kreatģnģns un kreatģns	$\text{Kreatģnģns} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{kreatģns}$ $\text{Kreatģns} + \text{ATF} \rightarrow \text{kreatģna fosfģts} + \text{ADF}$ $\text{ADF} + \text{fosfoenolpiruvģts} \rightarrow \text{ATF} + \text{piruvģts}$	Kreatģnģnģze Kreatģna kinģze Piruvģta kinģze	$\text{Piruvģts} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{laktģts} + \text{NAD}^+$	L-laktģta dehidrogenģze
Atsevišķģ aminoskģbe			$\text{Aminoskģbe} \rightarrow \text{pirmģjais amģns} + \text{CO}_2$	Tyr, Lys, Glu, Asp vai Arg dekarboksilģze
L-malģts			$\text{L-malģts} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{oksģlacetģts} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Malģta dehidrogenģze

### 3.7.3. Imunoloģiskģ metode

Pārtikas produkta komponentes specifģski un jutģji var noteikt ar imunoloģiskģm metodģm, kas pamatojas uz asģns seruma antidaļģnu mijiedarbģbu ar antigģnu, kuru iegģst, imunizģjot dzģvģniekus, piemģram, truģsus. Mazmolekulģru ( $M < 5000$ ) proteģnu imunoloģiskģai analģzei nepiecieģšams haptģnu kovalenti saģstģt ar polimģru, lai izraisģtu antidaļģnu veidoģanos. Haptģns ir savģenojums vai biopolimģra iecirknis, kas saģstģs ar antidaļģnu, izraisģt imģnreakciju.

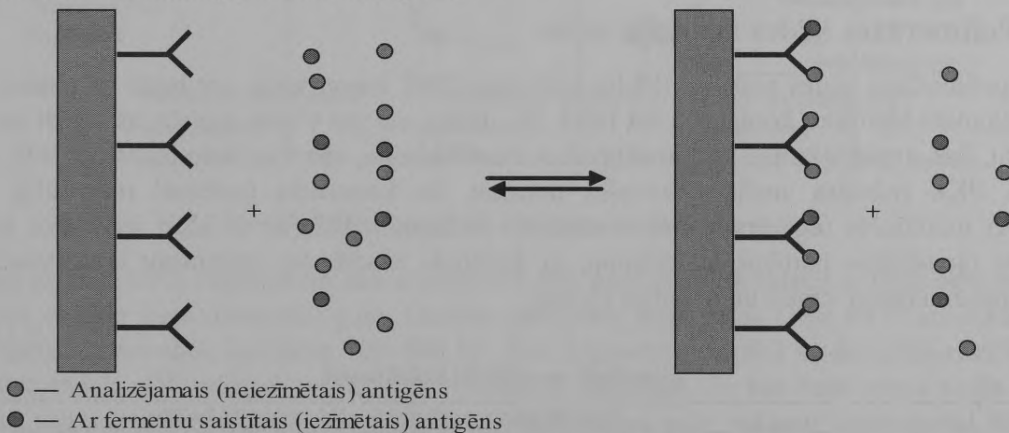
Vispirms jāpārbauda antiseruma specifiskums pret visiem analizējamā pārtikas produktā esošajiem proteīniem. Ja vien iespējams, vēlams visas nespecifiskās komponentes atdalīt. Daudzos gadījumos nav iespējams specifiskumu palielināt proteīnu ciešās imunoķīmiskās radniecības dēļ.

Noteikšana pamatojas uz iezīmēta un neiezīmēta antigēna mijiedarbību ar antidaļiņām. Ja antidaļiņu un iezīmēta antigēna koncentrācija ir nemainīga, vienīgais mainīgais ir neiezīmētā antigēna koncentrācijas izmaiņas. Tā koncentrāciju var noteikt atbilstoši masu mijiedarbības likumam pēc ar antidaļiņām saistītā iezīmētā antigēna koncentrācijas, kura ir proporcionāla saistītā neiezīmētā antigēna koncentrācijai, jo abi vienādi konkurē par iespēju mijiedarboties ar antidaļiņām.

Antigēna iezīmēšanai izmanto radioaktīvos izotopus ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ), fluorescējošas vai luminiscējošas krāsvielas vai stabilos radikāļus.

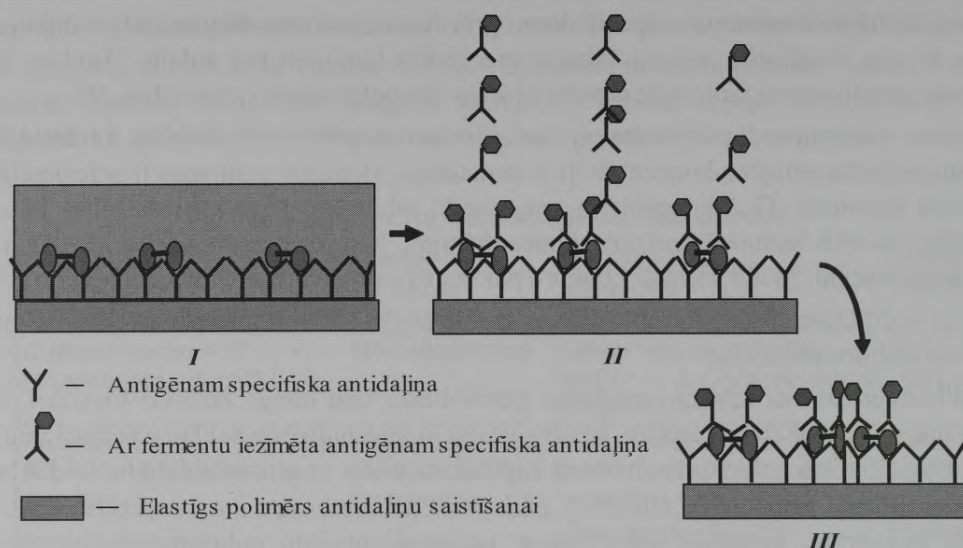
Par indikatorenzīmiem izmanto mārrotku peroksidāzi, teļu kuņģa bāzisko fosfatāzi, luciferāzi, glikozes oksidāzi, jo tie ir stabili enzīmi, kas iegūstami ar augstu tīrības pakāpi, specifiski un jutīgi var noteikt to aktivitāti. Šos indikatorenzīmus ar haptēniem saista ar glutarilaldehīdu vai karbodiimīdu. Antigēnu iezīmēšanai izmantojot enzīmus, pārbaudes laboratorijām nav nepieciešamas speciālas iekārtas, kā, piemēram, iezīmējot antigēnus ar radionukleotīdiem radioimunoloģiskajās metodēs. Bez tam radioimunoloģiskajā noteikšanā nesaistītais antigēns jāatdala no antigēna, kas saistīts ar antidaļiņu, kamēr enzimatiskajā imunoloģiskajā analīzē ar antidaļiņu saistījies enzīms ir zaudējis aktivitāti, un nesaistītā enzīma aktivitāti var noteikt bez tā atdalīšanas no saistītā enzīma.

Enzimātiskajā imunoloģiskajā analīzē (EIA) izmanto divas metodes: konkurējošo un nekonkurējošo (sviestmaižu) metodi. Konkurējošo EIA izmanto mazmolekulāru savienojumu analīzei, kamēr sviestmaižu tipa EIA piemērota lielāku antigēnu noteikšanai. Konkurējošā EIA metodē uz adsorbenta saistītās antidaļiņas saista antigēnus.



3.15. att. Konkurējošā enzimātiskā imunoanalīzes metode

Sviestmaižu tipa (EIA) antigēnam jāsaturs vismaz divi ar antidaļiņu mijiedarbojošies iecirkņi (haptēni), kuri novietoti pietiekami tālu, lai vienlaicīgi saistītos ar divām atsevišķām antidaļiņām. Imobilizēto antidaļiņu pārākums saistās ar paraugā esošo antigēnu. Citas antidaļiņas, kuras saistītas ar enzīmu, piemēram, peroksidāzi, bāzisko fosfatāzi, luciferāzi vai glikozes oksidāzi, un specifiski mijiedarbojas ar imobilizēto antidaļiņu saistīto antigēnu, veido sviestmaižu (sendviča) tipa kompleksu. Pēc tam ar antigēnu neizreaģējušās, ar enzīmu saistītās antidaļiņas izskalo un nosaka atlikušo enzimatīvo aktivitāti, kas proporcionāla parauga antigēna koncentrācijai, kuru nosaka pēc kalibrācijas standartlīknes.



3.16. att. Sviestmaižu (nekonkurējošā) tipa enzimatiskā analīze

Ar enzimatiskās imunoloģiskās analīzes metodi var noteikt: gaļas tipu, sojas proteīnu piemaisījumus gaļā, miozīna saturu muskuļaudos, graudu proteīnu un papaīna saturu alū, gliadīna saturu diētiskos produktos, veterinārmedicīniskos preparātus vai govīs barībai pievienotos biostimulatorus pienā, dabīgos vai sintētiskos estrogēnus gaļā, toksīnus (aflatoksīnus, enterotoksīnus, okratoksīnus) pārtikā, pesticīdus, glikoalkaloīdus.

### 3.7.4. Polimerāzes ķēdes reakcija

Ar polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) jebkuram DNS fragmentam var iegūt miljoniem un pat simt miljoniem identisku kopiju ļoti īsā laikā. No dažām vai pat vienas molekulas iegūst ļoti daudz molekulu, kas nepieciešamas spektroskopiskai identifikācijai, sākot ar kriminālistiku līdz pārtikas analīzei. PĶR balstītas analīzes metodes izmanto, lai konstatētu ģenētiski modificētu pārtiku (ģenētiski modificētu organismu izmantošanu tās ražošanā). Līdz ar to kļūst iespējams kontrolēt ģenētiski modificētas pārtikas iezīmēšanu, jo ģenētiski modificētu organismu izmantošana augu ražības palielināšanai strauji un nemitīgi pieaug.

3.12. tabula

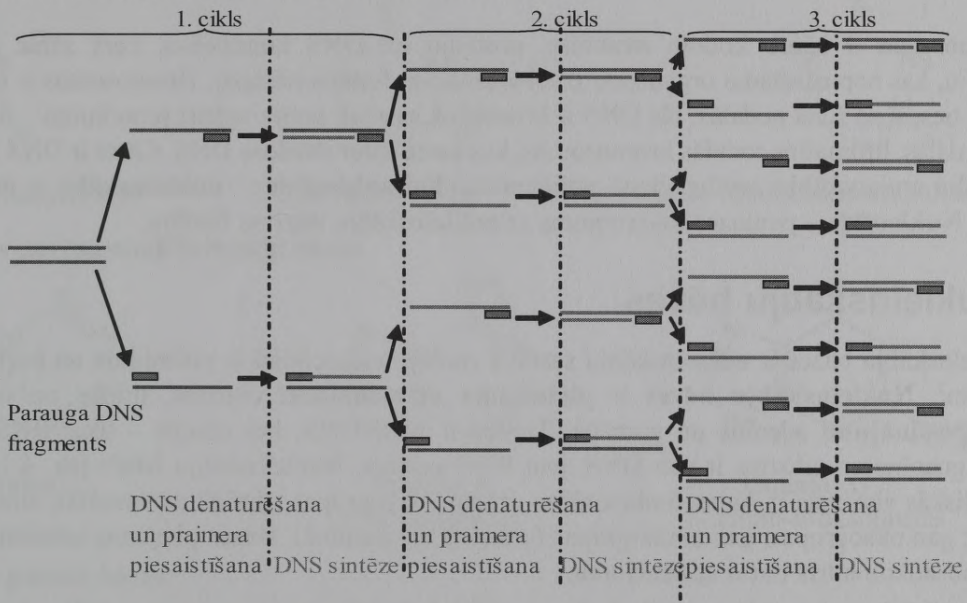
#### Ģenētiski modificēti kultūraugi

Kultūraugs	Ģenētiskās modifikācijas ceļā izmainītā īpašība
Kukurūza	Izturība pret kaitēkļiem un herbicīdiem
Soja	Izturība pret herbicīdiem, palielināts proteīnu saturs
Tomāti	Palēnināta nogatavošanās, izturība pret herbicīdiem, vīrusiem, puvēm
Kartupeļi	Izturība pret kaitēkļiem, herbicīdiem, puvēm
Cigoriņi	Izturība pret herbicīdiem
Melones	Izturība pret vīrusiem
Papaja	Izturība pret vīrusiem
Rapsis	Izturība pret herbicīdiem, laurīnskābes satura palielināšana
Kvieši, saulespuķes, cukurbietes, rīsi, gurķi	Izturība pret herbicīdiem, vīrusiem vai patogēnām sēnēm
Banāni	Palēnināta nogatavošanās
Spināti	Nitrātu satura samazināšana
Kartupeļi	Palielināts cietes saturs
Rīsi	Alerģēnu veidošanās samazināšana

Ekstraktu, kurš bez citām vielām satur analizējamās DNS fragmentu uzvarsē līdz 95 °C, kas izraisa DNS dubultspirāles denaturāciju – sadalīšanos divās vienpavediena ķēdēs. Strauji atdzesējot,

šīs ķēdes veido komplementāru pāri ar pirmajai un otrajai ķēdei komplementāru 15–30 nukleotīdu garu deoksiribooligonukleotīda – praimera pārākumu, kas izslēdz DNS dubultspirāles reģenerāciju. Praimerus iepriekš sintezē, izmantojot automātisko DNS sintezatoru. Paaugstina temperatūru un pievieno četru dezoksiribonukleotīdu 5'-trifosfātu maisījumu kopā ar termostabilu DNS polimerāzi, piemēram, *Taq polymerase* no *Thermus aquaticus*. Izmantojot pievienotos dezoksiribonukleotīdu trifosfātus, DNS polimerāze uz vienpavediena DNS ķēdes sintezē tai atbilstošu jauno DNS ķēdi 3' → 5' virzienā. Atkal atkārtoti uzkaršējot, atdzesējot un uzsildot panāk jaunu sintēzes cikla atkārtošanos, tikai šajā ciklā jau būs 2 reizes vairāk “mātes” DNS, aiznākošajā ciklā – 4 reizes, pēc tam 8, 16, 32 utt. reizes, atkārtojot ciklu  $n = 20 \div 30$  reizi. Kopiju skaits būs  $2^n$ .

Ja nav speciālu praimeru, tad dažos gadījumos PĶR var izmantot universālu praimeri. Iegūtajām kopijām veic restrikcijas fragmentu polimorfisma analīzi.



3.17. att. Polimerāzes ķēdes reakcijas realizācijas shēma

Gaļas parauga DNS vispirms nosaka ar praimeru pāri, kurš vislabāk saistās ar DNS atbilstošajiem iecirkņiem dažādu sugu dzīvnieku gaļā. Dažādu dzīvnieku sugu gaļas DNS PĶR rezultātā iegūst relatīvi garus fragmentus, kas satur 300–500 bp. Šos fragmentus sagriež ar dažādām restriktāzēm, fragmentus sadala elektroforēzē un pēc tās rezultātiem identificē. To var lietot viena veida dažādu dzīvnieku sugu gaļas produktiem. Ja dažādu dzīvnieku sugu gaļa pakļauta ievērojamai termiskai sašķelšanai, tad metode jālieto katrai sugai.

## 4. Nukleīnskābes

Nukleīnskābēm ir galvenā loma iedzimto pazīmju pārnēsē un proteīnu biosintēzes vadīšanā. Šūnu kodolos tās 1868. gadā atklāja Šveices ķīmiķis F. Mišers.

Nukleīnskābju polimēru ķēdes veidotas no monomērām vienībām – mononukleotīdiem, no kā radies arī nukleīnskābju nosaukums – polinukleotīdi. Nukleotīda īpatnība ir tā, ka atšķirībā no monosaharīdiem vai aminoskābēm mononukleotīdi paši sastāv no trīs komponentiem – heterocikliskās bāzes, monosaharīda un fosforskābes.

Ogļhidrāts ir vai nu  $\beta$ -*D*-ribofuranoze vai 2'-deoksi- $\beta$ -*D*-ribofuranoze. Nukleīnskābes, kas satur ribozī, ir ribonukleīnskābes (RNS), bet tās, kuras satur dezoksiribozī, – dezoksiribonukleīnskābes (DNS).

**Hromosoma** ir šūnas kodola struktūra, proteīnu un DNS komplekss, kurš satur ģenētisko informāciju, kas nepieciešama organisma izveidošanai un funkcionēšanai. Hromosomas ir redzamas, šūnai daloties. Kad šūna nedalās, tās DNS ir hromatīna sastāvā savīta apkārt proteīniem – histoniem. Kad šūna dalās, hromatīns sadalās hromosomās, kas katra satur dažādas DNS. **Gēns** ir DNS iecirknis, kurš nosaka aminoskābju secību vienā polipeptīdā. **Polinukleotīds**  $\equiv$  **nukleīnskābe** ir nukleotīdu polimērs. **Nukleotīds** – pentozes savienojums ar nukleīnskābju bāzi un fosfātu.

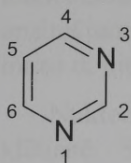
### 4.1. Nukleīnskābju bāzes

Nukleīnskābju bāzes ir nukleīnskābju sastāvā esošie heterocikliskie pirimidīna un purīna rindas savienojumi. **Nukleīnskābju bāzes** ir **pirimidīna atvasinājumi** citozīns, timīns un uracils un **purīna atvasinājumi** adenīns un guanīns. Timīns ir tikai DNS, bet uracils – tikai RNS sastāvā. Adenīns, guanīns un citozīns ir gan DNS, gan RNS sastāvā. Nukleīnskābju bāzēs (sk. 4.1. att.) pie heterocikliskās sistēmas ir šādas funkcionālas grupas: oksogrupas (timīnā un uracilā); aminogrupas (adenīnā); gan oksogrupas, gan aminogrupas (citozīnā un guanīnā). Bāzes pieņemts saīsināti apzīmēt ar bāzes nosaukuma trīs burtu apzīmējumu.

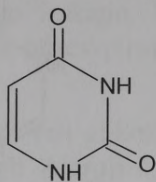
Heterociklisko savienojumu hidroksiatvasinājumiem (okso) un aminoatvasinājumiem eksistē šādiem savienojumiem raksturīgā laktīm-laktāma un enamīna-imīna tautomērija. Abās tautomērajās formās heterocikli saglabā aromātisko raksturu.

Dažu ļaundabīgo audzēju ķīmiskajā terapijā izmanto antimetabolītus – nukleīnskābju bāzēm līdzīgas vielas, kuras darbojas kā attiecīgās bāzes antagonisti, konkurējot ar dabiskajām bāzēm, tie traucē nukleīnskābju sintēzi organisma šūnās. Strauji dalošās ļaundabīgo audzēju šūnās notiek intensīva nukleīnskābju sintēze, tāpēc tajās ir arī vislielākie traucējumi.

### Galvenās pirimidīna nukleīnskābju bāzes

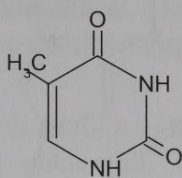


Pirimidīns



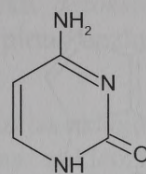
Uracils U

2,4-dioksopirimidīns



Timīns T

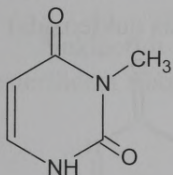
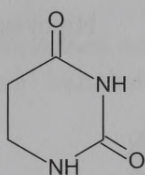
5-metil-2,4-dioksopirimidīns



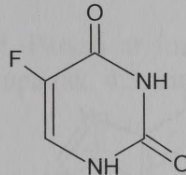
Citozīns C

4-amino-2-oksopirimidīns

### Minorās pirimidīna bāzes

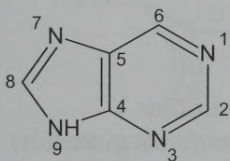
3-N-metiluracils  $m_3U$ Dihidrouracils  $UH_2$ 

### Pirimidīna rindas antimetabolīti

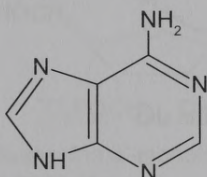
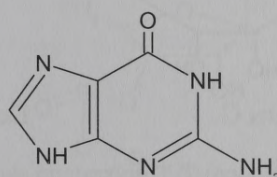


Fluoruracils-timīna antimetabolīts

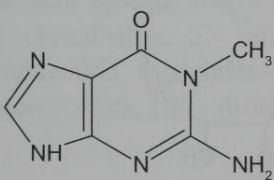
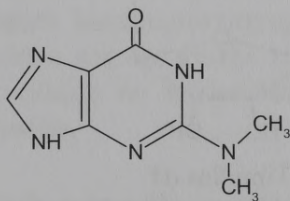
### Galvenās purīna nukleīnskābju bāzes



Purīns

Adenīns A  
6-aminopurīnsGuanīns G  
2-amino-6-oksopurīns

### Minorās purīna bāzes

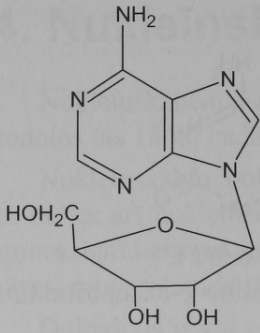
1-N-metilguanīns  $m^1G$ 2-N,N-dimetilguanīns  $m_2^2G$ 

4.1. att. Pirimidīna un purīna rindas galvenās un minorās nukleīnskābju bāzes un antimetabolīti

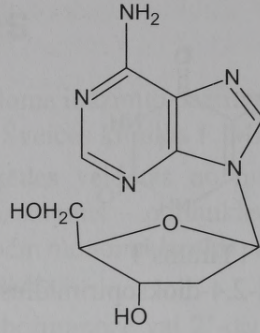
## 4.2. Nukleozīdi

Nukleozīdi (sk. 4.2. att.) ir ribozes vai dezoksiribozes un nukleīnskābju bāzu N-glikozīdi, veidojot glikozīdisko saitī starp ribozes vai dezoksiribozes pirmo oglekļa atomu ( $C_1'$ ) un pirimidīna bāzes pirmo slāpekļa atomu ( $N_1$ ) vai purīna bāzes devīto slāpekļa atomu ( $N_9$ ). Lai atšķirtu atomu numerāciju ribozei no bāzes, ribozes atomu numerāciju uzrāda ar (').

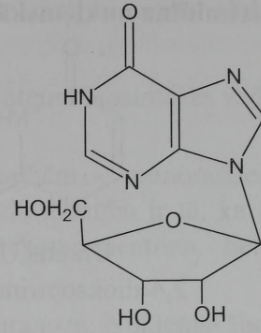
Nukleozīdu nosaukumi veidoti pēc tiem pašiem principiem, kādus izmanto glikozīdiem, piemēram, adenīna  $\beta$ -D-ribofuranozīds, tomēr parasti tā vietā lieto no bāzes triviālā nosaukuma atvasinātu nosaukumu, tam pievienojot izskaņu *-idīns* pirimidīna un *-ozīns* – purīna rindas nukleotīdiem.



Adenoziņš A

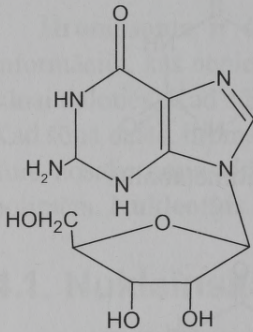


Dezoksiadenozīns dA

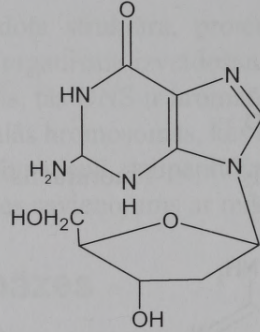


Inozīns I

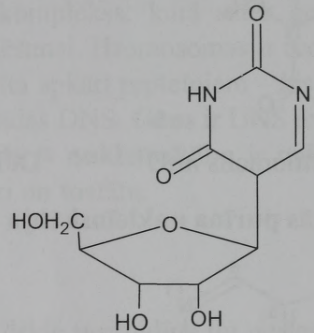
Hipoksantīna ribozīds (minora nukleozīds)



Guanozīns G

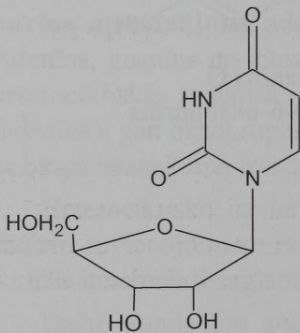


Dezoksiguanoziņš dG

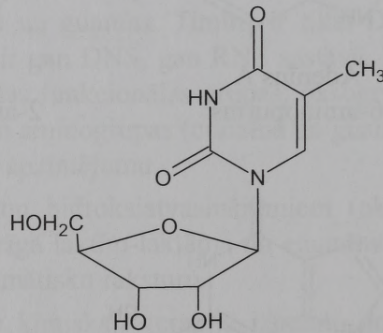


Pseudouridīns Y

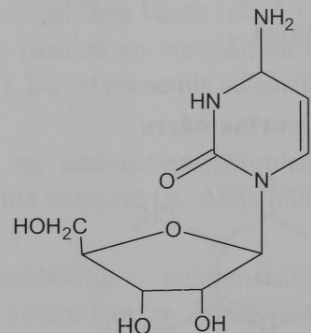
C-glikozīds (minora glikozīds)



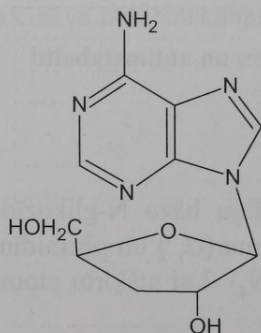
Uridīns U



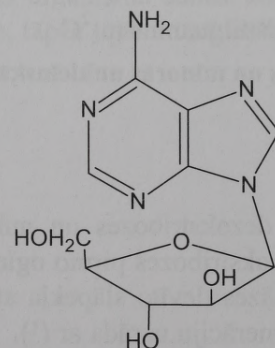
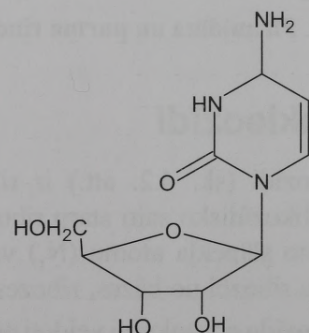
Timidīns dT



Citidīns C



Kordicepiņš

Adenīna arabozīds  
(sintētiskais antivīrusa preparāts)

Dezoksicitidīns dC

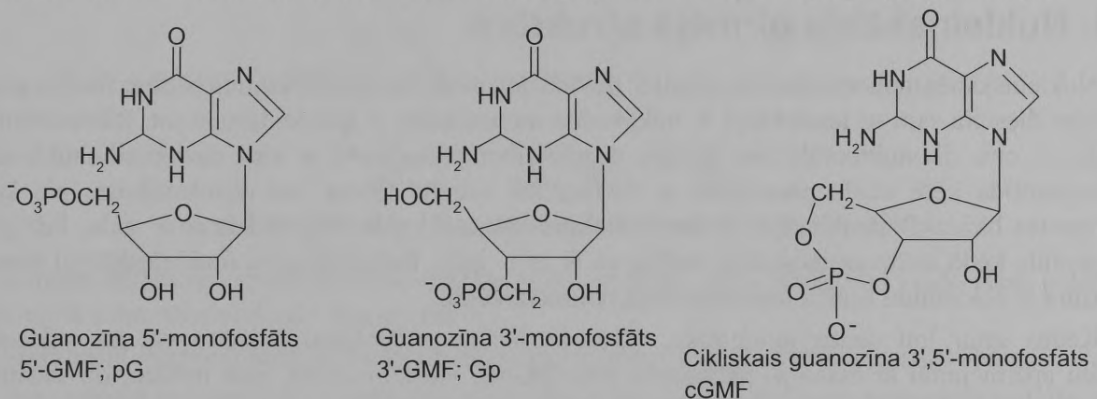
## 4.2. att. Nukleozīdi un nukleozīdi-antibiotiķi

Izņēmums ir *hipoksantīnu* saturošs ribozīds – *inozīns* ar specifisku nosaukuma sakni un purīna nukleozīdiem raksturīgo izskaņu. Dezoksinukleozīdiem pievieno priedēkli *dezoksi-*. Saīsinātiem apzīmējumiem izmanto bāzes pirmo burtu un dezoksiribonukleotīdiem pirms apzīmējuma raksta mazo d, piemēram, dG.

Nukleozīdi, tāpat kā visi glikozīdi, ir stabili bāziskā vidē, bet hidrolizējas skābju vai fermentu klātienē. Sevišķi viegli hidrolizējas purīna nukleozīdi, bet pirimidīna nukleozīdu hidrolīzei nepieciešama stipri skāba vide un karsēšana. Ļoti izturīgs pret hidrolīzi ir pseidouracils, jo būtībā tas nav glikozīds, bet gan ribozes C-1 alkilēšanas produkts.

### 4.3. Nukleotīdi

Nukleotīdi ir nukleozīdu un fosforskābes esteri – nukleozīdu fosfāti. Parasti ar fosforskābi ir esterificēta ribozes vai dezoksiribozes 3'-hidroksilgrupa vai 5'-hidroksilgrupa (sk. 4.3. att.).



4.3. att. Guanozīna monofosfāti

Nukleotīdu nosaukumu veido, nukleozīda nosaukumam pievienojot vārdu “fosfāts” un ar ciparu norādot oglekļa atoma numuru ogļhidrātā, kura hidroksilgrupa ir fosforilēta, piemēram, adenozīna 5'-monofosfāts. 5'- stāvoklī ar ogļhidrātu var būt saistīts arī difosfāts (pirofosfāts) vai trifosfāts. Nukleotīda saīsinātais apzīmējums veidojas no nukleozīda apzīmējuma, kam pievieno MF – monofosfāts, DF – difosfāts, TF – trifosfāts.

4.1. tabula

Nukleīnskābju bāzu, nukleozīdu un nukleotīdu nosaukumi

Bāze	Nukleozīds	Nukleotīds
<b>DNS</b>	<b>Dezoksiribonukleozīdi</b>	<b>Dezoksiribonukleotīdi</b>
Adenīns (Ade)	Dezoksiadenozīns (A)	Dezoksiadenozīna 5'-monofosfāts (dAMF)
Guanīns (Gua)	Dezoksiguanozīns (G)	Dezoksiguanozīna 5'-monofosfāts (dGMF)
Citozīns (Cyt)	Dezoksicitidīns (C)	Dezoksicitidīna 5'-monofosfāts (dCMF)
Timīns (Thy)	Dezoksitimidīns (T)	Dezoksitimidīna 5'-monofosfāts (dTMF)
<b>RNS</b>	<b>Ribonukleozīdi</b>	<b>Ribonukleotīdi</b>
Adenīns (Ade)	Adenozīns (A)	Adenozīna 5'-monofosfāts (AMF)
Guanīns (Gua)	Guanozīns (G)	Guanozīna 5'-monofosfāts (GMF)
Citozīns (Cyt)	Citidīns (C)	Citidīna 5'-monofosfāts (CMF)
Uracils (Ura)	Uridīns (U)	Uridīna 5'-monofosfāts (UMF)

Šūnās par signālu pārnesējiem kalpo nukleotīdu cikliskie fosfāti, kuros fosfāts vienlaicīgi saistīts C-3 un C-5 pozīcijā. Šādi cikliski fosfāti raksturīgi adenozīnam un guanozīnam.

Nukleotīdi ir ne tikai polinukleotīdu monomēri, tie piedalās bioķīmiskajos procesos koenzīmu sastāvā. Visos organismos brīvā veidā sastopami nukleozīdu monofosfāti, difosfāti un trifosfāti. It sevišķi bieži sastopams adenozīna 5'-monofosfāts (AMF), adenozīna 5'-difosfāts (ADF) un adenozīna

5'-trifosfāts (ATF). Dažās reakcijās piedalās arī guanozīna 5'-trifosfāts (GTF), uridīna 5'-trifosfāts (UTF), citidīna 5'-trifosfāts (CTF) vai to difosfāti GDF, UDF, CDF. Difosfāta grupa satur vienu, bet trifosfāta grupa – divas makroenerģētiskās anhidrīda saites, jo, tām hidrolizējoties, izdalās 32 kJ/mol enerģijas. Par makroenerģētisko saiti pieņemts uzskatīt ķīmisko saiti, kuras hidrolīzē izdalītā enerģija ir lielāka par 21 kJ/mol.

ATF organismā kalpo par fosfāta avotu, tā pārnēsē uz substrātu veidojot estera vai jauktā anhidrīda grupu:  $R-O-PO_3^{2-}$  un  $-CO-O-PO_3^{2-}$ .

Otrs ATF makroenerģētisko saišu izmantošanas virziens ir ATF hidrolīze, lai ar izdalīto enerģiju veicinātu termodinamiski neizdevīgas reakcijas novirzi vēlamā virzienā sajūgtās reakcijās.

Daži dinukleotīdi: nikotīnamīd-adenozīn-dinukleotīds ( $NAD^+$ ) un flavīn-adenozīn-dinukleotīds (FAD) piedalās oksidēšanās reakcijās kā dehidrogenāžu koenzīmi, kas no substrāta atņem elektronus un protonus un pārnēs tos uz citu substrātu vai enzīmu ar zemāku oksidēšanās-reducēšanās potenciālu.

#### 4.4. Nukleīnskābju pirmējā struktūra

Nukleīnskābēs mononukleotīdi saistīti 5' nukleoīdu monofosfātu nesazarotā ķēdē ar fosfāta grupu, veidojot diestera saiti ar iepriekšējā 5' nukleoīda monofosfāta 3' hidrosilgrupu utt. Ribonukleotīds saistās ar citu ribonukleotīdu un, līdzīgi, dezoksiribonukleotīds – ar citu dezoksiribonukleotīdu. Polinukleotīda ķēdi veido pārmaiņus ar fosforskābi saistītā riboze vai dezoksiriboze, pie kuras pievienotas bāzes. Polinukleotīda ķēdes attēlošanu sāk ar 5' galu un pabeidz ar 3' galu, līdzīgi kā polipeptīdu ķēdē attēlo aminoskābju secību no N uz C galu. Polinukleotīdu (nukleīnskābju) pirmējā struktūra ir nukleotīdu secība nepārtrauktajā polimēra ķēdē.

Ķēdes satur ļoti daudz nukleotīdu, tāpēc to secības attēlošanai izmanto vai nu nukleotīdu fosfātu apzīmējumu ar mazo *p*, piemēram, *pApCpGpU*, vai izmantojot tikai nukleoīdu saīsinātos apzīmējumus, tad tā pati secība attēlojama kā *ACGU*.

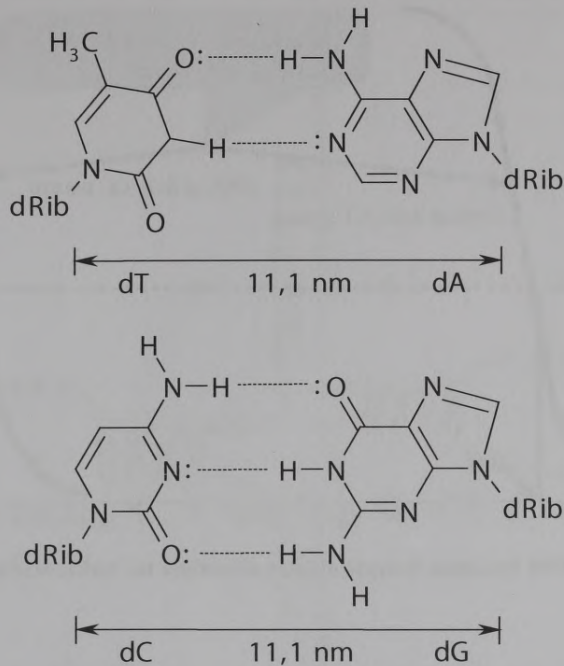
Nukleīnskābju polimēra ķēde, tāpat kā visi esteri, hidrolizējas gan skābā, gan bāziskā vidē, gan ar enzīmiem. Praksē ribonukleoīdu iegūšanai izmanto RNS (piemēram, rauga RNS) bāzisko hidrolīzi. DNS ķīmisko hidrolīzi neizmanto blakus procesu dēļ. DNS (arī RNS) hidrolīzei par katalizatoru izmanto nukleāzes, kuras specifiski šķēļ fosforskābes diestera vai monoestera saites, piemēram, nukleāzes no čūsku indes. Nukleotīdu secības noteikšana polinukleotīdā (DNS) balstās uz izmainītām to biosintēzes metodēm.

#### 4.5. DNS otrējā struktūra

Polidezoksiribonukleotīdu ķēdes telpiskais izkārtojums ir tās otrējā struktūra. DNS dubultspirāles telpisko struktūru, kas ir divu DNS polinukleotīdu ķēžu dubultspirāle ar pretēji vērstām polimēru ķēdēm un labējo vijumu, kuras diametrs ir 1,8–2,0 nm, atklāja Dž. Vatsons un F. Krīks, pamatojoties uz daudzu pētīnieku darbiem. Saistību starp ķēdēm nodrošina ūdeņraža saites starp abu ķēžu pirimidīna un purīna bāzu pāriem. Starp timīnu un adenīnu veidojas divas un starp citozīnu un guanīnu – trīs ūdeņraža saites (sk. 4.4. att.). Heterocikliskās bāzes ir plakanas, tāpēc arī ūdeņraža saites novietotas šajā plaknē. Attālums starp divu bāzu plaknēm spirāles ass virzienā ir 0,34 nm. Vienā spirāles vijumā izvietoti 10,5 bāzu pāri.

Indiešu zinātnieks E. Čargafs formulēja atbilstības likumības:

- 1) purīna un pirimidīna bāzu skaits ir vienāds:  $(A + G) = (C + T)$ ;
- 2) adenīna un timīna bāzu skaits ir vienāds, tāpat kā guanīna un citozīna bāzu skaits  $A = T$  un  $G = C$ ;
- 3) aminogrupu summa pirimidīna 4 stāvoklī un purīna 6 stāvoklī vienāda ar karbonilgrupu skaitu tajos pašos stāvokļos  $(A + C) = (G + T)$ .



4.4. att. Ūdeņraža saites starp atbilstošām (komplementārām) bāzēm

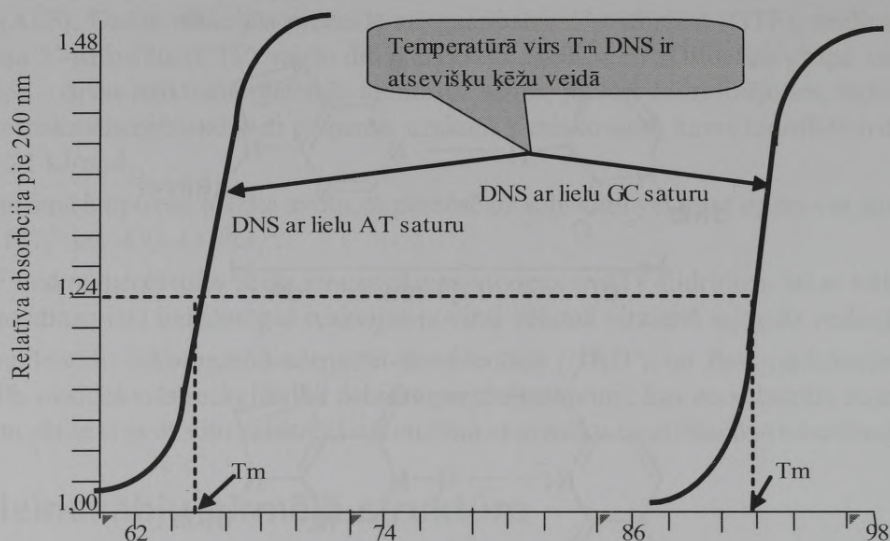
Čargafa likums nav spēkā RNS vai izpildās nepilnīgi tāpēc, ka to molekulas veido viena polimēra ķēde, un tā satur relatīvi daudz minoro bāzu.

Spiralizētā struktūra piedod DNS dubultspirālei asimetriju, tāpēc DNS ir optiski aktīva.

Paaugstinātā temperatūrā var noārdīties ūdeņraža saites starp bāzēm, un dubultspirāle sadalās divās DNS ķēdēs. Tas ir atgriezenisks process, atdzesējot šķīdumu dubultspirāle atjaunojas. Temperatūru, kurā notiek sadalīšanās vienpavediena DNS, sauc par kušanas temperatūru. Ar adenozīnu un timidīnu bagātos iecirkņos sasita tikai divas ūdeņraža saites, tāpēc tiem ir zemāka kušanas temperatūra nekā ar guanozīnu un citidīnu bagātiem iecirkņiem ar trim ūdeņraža saitēm starp bāzu pāriem.

Bāzu atbilstība nodrošina to secībā iekodētās informācijas pareizu pārkopēšanu jaunas DNS biosintēzē – replikācijā, RNS biosintēzē – transkripcijā, kā arī daļēji proteīna sintēzē ribosomās – translācijā. Pirmajā gadījumā uz vienas DNS ķēdes kā matricas sintezējas tai komplementāra otra DNS ķēde, tādējādi jaunajā DNS molekulā viena ķēde ir no mātes DNS. Otrajā gadījumā uz DNS matricas sintezējas tai komplementāra RNS ķēde, tikai tajā T vietā ir U. Transporta un informācijas RNS bāzu komplementārās mijiedarbības dēļ kodona un antikodona bāzu atbilstība nodrošina arī pareizu aminoskābju secību polipeptīdu ķēdē. Lielākā daļa DNS molekulu ir izvietotas šūnas kodolā. Mitohondriji satur nelielu daudzumu DNS.

DNS nukleotīdu secība dažādu faktoru ietekmē var izmainīties, nomainot vienu bāzu pāri ar citu. Viens no iemesliem ir tautomērā līdzsvara nobīde, piemēram, timīns laktāma formā neveido, bet laktāma formā veido ūdeņraža saites ar guanīnu, kuras parasto pāri timīns–adenīns nomaina ar pāri timīns – guanīns. Līdzīgi šāds pāris var veidoties, nobīdoties tautomērajam līdzsvaram guanīnā. Cits iemesls bāzu nomaīnai ir ķīmiska reakcija vai starojuma iedarbība. Piemēram, ja adenozīns reaģē ar nitrītiem, tad deaminēšanās dēļ aminogrupa nomainās ar hidroksilgrupu, veidojot citu nukleozīdu – inozīnu, kurš satur hipoksantīnu, kas izraisa komplementārā pāra adenīns – timīns nomaīņu ar pāri hipoksantīns – citozīns.

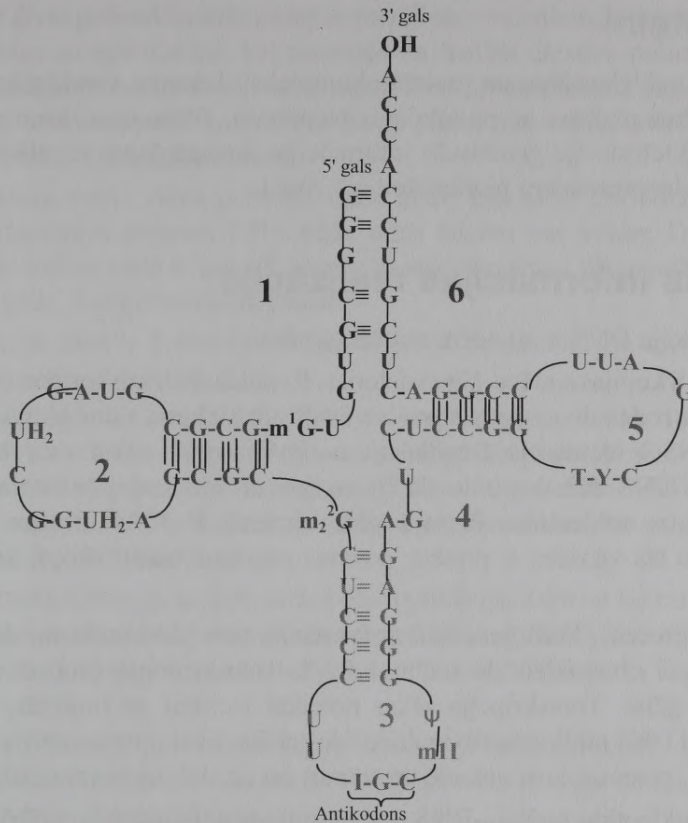


4.5. att. DNS kušanas temperatūras atkarība no nukleotīdu sastāva

## 4.6. RNS veidi

Ribonukleīnskābes ģenētisko informāciju izmanto proteīnu sintēzes vadīšanai.

- **Ribosomālās RNS (r-RNS)** atrodamas ārpus kodola citoplazmā mazu organelļu, kurās notiek proteīnu sintēze – ribosomu sastāvā, kopā ar daudziem proteīniem. Katra ribosoma satur 60% ribosomālo RNS, un pārējais ir proteīni. Ribosomu masa ir aptuveni  $5 \cdot 10^{-6}$  g.
- **Informācijas RNS (i-RNS)** (lieto arī apzīmējumu m-RNS) pārnes informāciju par aminoskābju secību proteīna ķēdē no kodola uz ribosomām. Informācija tajā ir iekodēta nukleotīdu secībā. Trīs nukleotīdu secība, kuru sauc par kordonu, kodē vienu aminoskābi. i-RNS satur arī informācijas nolasīšanas uzsākšanas un nobeiguma signālus.
- **Transporta RNS (t-RNS)** veido aptuveni 20% no visām šūnas RNS, to molekulmasa ir ap 30 000 Da un satur 78–80 nukleotīdus. To bioloģiskā funkcija ir aminoskābju transports uz ribosomām un dalība ģenētiskās informācijas par aminoskābju secību realizācijā. 20 proteīnogēno aminoskābju transportu veic 32 t-RNS. To struktūrā (sk. 4.6. att.) var izdalīt 6 iecirkņus:
  - 1) 5' gala iecirknis visām aminoskābēm sākas ar guanozīnu (G);
  - 2) dihidrouridīna cilpa satur vairākus dihidrouridīnus ( $UH_2$ );
  - 3) antikodona cilpa satur katrai t-RNS specifisku trinukleotīdu – antikodonu, kurš atbilst kodonam uz i-RNS;
  - 4) mazo cilpu veido nukleotīdi, kas novietoti starp antikodona un kopīgo cilpu;
  - 5) kopīgā (universālā) cilpa satur visām t-RNS raksturīgu secību GTΨC;
  - 6) 3' gals visām t-RNS beidzas ar trinukleotīdu CCA, ar kuru saistās transportējamā aminoskābe.



4.6. att. Alanīna t-RNS nukleotīdu secība

t-RNS nukleotīdu ķēdes atsevišķu posmu nukleotīdi veido sapārotu bāzu pārus, veidojot īsus dubultspirāles posmus. Visu t-RNS telpiskā struktūra izklātā veidā atgādina āboliņa lapu, kas papildus savērpta L burta formā.

Informācijas RNS (i-RNS) pārnes informāciju par aminoskābju secību proteīna ķēdē no DNS uz polipeptīdu, ko veido viena nukleotīdu ķēde, kuras garums atkarīgs no informācijas apjoma. Katra aminoskābe iekodēta i-RNS ar trīs nukleotīdu secību, ko sauc par kodonu. i-RNS, tāpat kā visas citas RNS, sintezējas uz DNS šūnas kodolā un pēc tam nonāk citoplazmā, kur saistās ar ribosomām. Katram kodonam atbilst antikodons t-RNS, un kodonu izkārtojums nodrošina attiecīgo antikodonu saturošo t-RNS ar aminoskābēm secīgu izkārtošanos proteīna sintēzes gaitā ribosomā. Vienlaicīgi ar ribosomu saistās i-RNS un 2 t-RNS. Kodonu un antikodonu atbilstību nosaka ģenētiskais kods, kas ir universāls visiem dzīvniekiem organismiem ar nelielu variāciju attiecībā uz mitohondrijiem. Eikariotiem i-RNS 5' galā pievienojas “cepurīte”, kuru veido metilēti nukleotīdi un 3' galā pievienots poliadenozīns, kas satur līdz 200 nukleotīdu – “aste”. Abu šo veidojumu uzdevums ir nodrošināt efektīvāku proteīna biosintēzi un informācijas atpazīšanu uz i-RNS, kā arī tās aizsardzību no priekšlaicīgas hidrolīzes fermentu ietekmē, jo i-RNS “dzīves laiks” ir īss.

Ribosomu veidošanā kopā ar katalītiskas un nekatalītiskas dabas nukleotīdiem piedalās ribosomu RNS. Bez tam kodolā un kodoliņā ir kodola RNS, kuras ir gan citu RNS biosintēzes un tālāko pārvērtību starpprodukti, gan arī ir fermenti – ribozīmi RNS pārvērtībām.

## 4.7. Nukleoproteīni

Nukleoproteīni ir nukleīnskābju un proteīnu kompleksi. Izņemot vienkāršās t-RNS, lielākā daļa nukleīnskābju veido kompleksus ar proteīniem, piemēram, ribosomas, hromosomas, vīrusi u. c. Proteīnu nozīme ir nukleīnskābju ģenētiskās informācijas izmantošanas regulācija un nukleīnskābes cieša sapakošana. Nukleoproteīniem pieskaitāmi arī vīrusi.

## 4.8. Ģenētiskās informācijas realizācija

Ģenētiskā informācija DNS ir iekodēta ar bāzu secību.

**Replikācija** ir DNS kopijas sintēze, šūnai daloties. Replikācija ir puskonservatīva. No vienas mātes šūnas DNS replikācijā rodas divas jaunas meitas DNS, kuras katra satur vienu DNS ķēdi no mātes DNS. Abas meitas DNS ir identiskas. Replikāciju nodrošina rinda enzīmu un dezoksiribonukleotīdu trifosfāti. Replikācijā DNS dubultspirāle daļēji atvijas un enzīms, pārvietojoties gar DNS ķēdi, savieno komplementāros nukleotīdus jaunajā ķēdē virzienā 3'→5'. Uz otras DNS ķēdes sintēze notiek pa posmiem, jo tās virziens ir pretējs, posmus pēc tam "sašuj" kopā, izveidojot divas DNS dubultspirāles.

**Transkripcija** ir process, kurā ģenētiskā informācija tiek pārrakstīta no dezoksiribonukleotīdu secības DNS sastāvā uz ribonukleotīdu secību i-RNS. Transkripcijas procesā izmanto tikai vienas DNS ķēdes posmu – gēnu. Transkripcija sākas noteiktā iecirknī un turpinās, līdz sasniedz STOP kodonu. RNS ir gēnam DNS atbilstoša ribonukleotīdu secība, tikai timīna vietā ir uracils. Transkribētā i-RNS satur intronus – posmus, kuri nekodē proteīnus, un tie tiek izgriezti vēlākās pārvērtībās.

**Translācijā** ribonukleotīdu secība i-RNS tiek pārtulkota aminoskābju secībā proteīna polipeptīda ķēdē. Vienai aminoskābei atbilst triju nukleotīdu secība i-RNS – kodons. Ģenētiskais kods, kas visām Zemes būtnēm ir kopējs, nosaka kādā nukleotīdā un kādā secībā kodēs aminoskābi kodonā. 4 bāzes pa 3 veido 64 kodonus, no tiem 3 ir STOP kodoni. Translācija sākas ar translējošās ribosomas izveidošanos no tās lielās un mazās subdaļiņas, i-RNS un metionīna t-RNS ribosomas proteīna iecirknī. Ķēdes pagarināšanas (elongācijas) laikā nākošo aminoskābi nesošā t-RNS ar antikodonu saistās ar kodonu, un enzīms izveido peptīdsaiti starp abām aminoskābēm. Ribosomai pārvietojoties par vienu kodonu, dipeptīds nonāk proteīna iecirknī, atbrīvojot aminoskābes iecirkni jaunu aminoskābi nesošai t-RNS, un process atkārtojas, līdz sasniegts STOP kodons, kurš nekodē nevienu aminoskābi un pārtrauc translāciju. Ribosoma noslīd no i-RNS un sadalās abās subdaļiņās, atbrīvojot proteīnu. Enerģiju nodrošina GTF (ATF analogs).

**Ribosoma** ir šūnas struktūra, kurā notiek translācija, un to veido proteīni un ribosomu RNS. i-RNS piegādā informāciju par aminoskābju secību polipeptīda ķēdē kodonu formā no DNS. t-RNS pārnes aminoskābes uz ribosomu un, savienojot kodonu uz i-RNS ar antikodonu t-RNS, nodrošina translāciju.

## 4.9. Apkopojums

- Nukleīnskābes ir polinukleotīdi. Katru nukleotīdu veido heterocikliskā bāze, pentoze un fosfāts. Pentoze ir  $\beta$ -D-ribofuranoze ribonukleīnskābēs (RNS) un  $\beta$ -2-dezoksi-D-ribofuranoze dezoksiribonukleīnskābēs (DNS). Nukleīnskābes pamatu veido fosfāta diesteris ar ribozi vai dezoksiribozi. Fosfāts veido estera saiti ar pentozes 3' oglekļa atomu un otras pentozes 5' oglekļa atomu. Bāzes saistītas ar pentozes 1' oglekļa atomu ar  $\beta$ -N-glikozīdisko saiti. Nukleīnskābes atšķiras ne tikai ar pentozēm, bet arī ar heterociklisko bāzu sastāvu. DNS nesatur uracilu, bet satur timīnu, bet RNS – pretēji.
- Nukleozīdi ir heterocikliskās bāzes  $\beta$ -N-glikozīdi ar D-ribozi vai 2-dezoksi-D-ribozi.

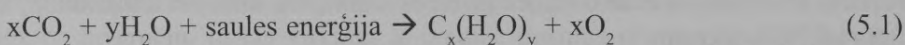
- DNS satur divas polinukleotīdu ķēdes ar pretējiem virzieniem, kuras savērtas dubultspirālē. Bāzes vērsta uz spirāles asi, bet pentozes un fosfāta diestera polimērā ķēde – uz ārpusi. Bāzes ar ūdeņraža saitēm savā starpā saista abas polinukleotīda ķēdes. Saistība timīnam ir ar adenīnu, un citozīnam – ar guanīnu. Starp pirmo pāri veidojas divas ūdeņraža saites, bet starp otro pāri – 3 ūdeņraža saites.
- RNS struktūru veido viena polinukleotīda ķēde, kas satur D-ribozi un timīna vietā satur uracilu. Atsevišķos posmos RNS ķēde starp bāzēm var veidot DNS līdzīgas ūdeņraža saites, tikai timīna vietā ir uracils, tomēr šīs struktūras nav tik regulāras, jo tās veido viena un tā pati ķēde, kas pārlocīta uz pusēm.
- DNS funkcija šūnā ir ģenētiskās informācijas par aminoskābju secību proteīnā glabāšana un kopēšana, šūnai daloties.
- RNS ir dažādas. Ribosomālā RNS kopā ar proteīniem veido ribosomas, kurās notiek proteīna sintēze. Informācijas RNS pārnes informāciju par aminoskābju secību proteīnā no DNS kodolā uz ribosomām citoplazmā. Vienu aminoskābi i-RNS kodē trīs nukleotīdu secība. Transporta RNS pārnes aminoskābes uz ribosomām, tās satur arī antikodonu, kurš komplementārs i-RNS kodonam.
- DNS ģenētiskā informācija tiek pārkopēta replikācijā, kurā uz katras no abām DNS ķēdēm kā matricas sintezējas tām komplementāra pretēji vērsta DNS ķēde, līdz ar to veidojas divas jaunas “meitas” DNS, kura katra satur vienu “mātes” DNS ķēdi. Tāpēc DNS replikācija ir puskonservatīva.
- Gēns ir informācija par aminoskābju secību polipeptīda ķēdē, kas DNS iekodēta ar nukleotīdu secību. Vienu aminoskābi kodē trīs nukleotīdu secība. Ģenētiskais kods ir universāls visām Zemes būtnēm.
- DNS ģenētiskās informācijas daļa tiek pārrakstīta no dezoksiribonukleotīdu secības vienā DNS ķēdē ribonukleotīdu secībā RNS ķēdē procesā, ko sauc par transkripciju. Transkripcijā par matricu izmanto tikai vienas DNS ķēdes posmu no sākuma līdz beigu signālam. Transkripcijā sintezējas visu veidu RNS. i-RNS parasti pārnes informāciju par viena proteīna polipeptīdu ķēdes aminoskābju secību.
- Ribonukleotīdu secība i-RNS tiek pārtulkota aminoskābju secībā polipeptīdā translācijas procesā, kas notiek ribosomās. Ribosomas veido r-RNS un proteīni. Translācijā ribosomās piedalās aminoskābes pārnesošās katrai aminoskābei specifiska transporta t-RNS. Aminoskābju secību nodrošina ar nukleotīdu tripleta secības – kodona un tam komplementāra t-RNS antikodona atbilstību.

## 5. Ogļhidrāti

Nosaukums **ogļhidrāts** tika iecerēts glikozes apzīmēšanai, jo tās sastāvs ir  $C_6H_{12}O_6$ , kas it kā atbilst  $C_6(H_2O)_6$  – oglekļa hidratam. Doma par glikozi kā oglekļa hidratu tika atmesta, bet nosaukums saglabājies, lai apzīmētu biomolekulu klasi ar līdzīgu sastāvu un struktūru. Ogļhidrāti ir uz Zemes visizplatītākie organiskie savienojumi. Pēc masas tie sastāda lielāko organisko vielu daļu. Ogļhidrāti tajos uzkrāto Saules fotonu enerģiju nodod dzīvniekiem ķīmisko saišu enerģijas veidā. Dzīvajā dabā tie ir metabolisko procesu enerģijas avots (augos – ciete, dzīvniekos – glikogēns), šūnu sienīņu struktūras komponenti (augiem celuloze, baktērijām muramīns, sēnēm hitīns), dzīvībai nozīmīgu vielu (nukleīnskābju, koenzīmu, vitamīnu u. c.) komponenti. Ogļhidrāti ir visu šūnu sastāvā.

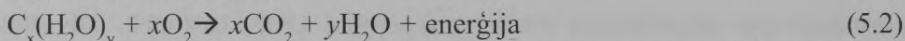
Visu dzīvo organismu ogļhidrātu pirmavots ir augos un citos fotosintezējošos organismos noritošā fotosintēze, kuru no ķīmijas viedokļa var uzskatīt par oglekļa dioksīda reducēšanu ar saules enerģiju.

Fotosintēze:



Tādējādi ogļhidrāti veido savdabīgu uzkrātās Saules enerģijas ķīmisko depo. Šī enerģija atbrīvojas dzīvnieka organismā notiekošajos ogļhidrātu katabolītiskajos procesos, kuri no ķīmiskā viedokļa ir oksidācijas procesi.

Ogļhidrātu katabolisms:



Lielākā atbrīvojusies enerģijas daļa pārvēršas jaunā ķīmiskās enerģijas formā, kas uzkrājas adenozīna trifosfātā (ATF) un pēc tam tiek izlietota dzīvības procesu nodrošināšanai.

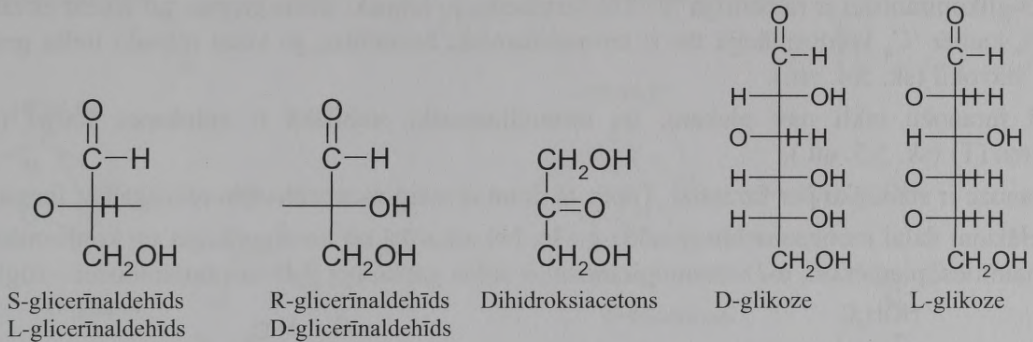
Parasti ogļhidrātus iedala monosaharīdos un to polikondensācijas produktos – polisaharīdos. No polisaharīdiem atsevišķi izdala oligosaharīdus, kurus veido ne vairāk par 10 monosaharīdu, jo tie pēc īpašībām vēl tikai nedaudz atšķiras no monomēriem.

### 5.1. Monosaharīdi

**Monosaharīdi** ir ogļhidrāti, kuri **nehidrolizējas** par vienkāršākiem savienojumiem, tāpēc tos sauc arī par vienkāršiem cukuriem. Tie no organisko savienojumu klasifikācijas viedokļa pieder **polihidroksialdehīdiem** un **polihidroksiketoniem** vai arī to atvasinājumiem. Tiem katram ir no 3 līdz 7 oglekļa atomiem, viena oksogrūpa, kura ir vai nu aldehīdgrūpa, vai ketogrūpa, un pārējie oglekļa atomi katrs saistīti ar hidroksilgrupu. Monosaharīdus, kuri satur aldehīdgrupu, sauc par **aldozēm**, keto grupu saturošos – par **ketozēm**. Aldehīdgrūpa ir galējā, bet keto grupa parasti monosaharīdos atrodas pie otrā oglekļa atoma. Aldoze satur vienu pirmējo spirta grupu aldehīdgrupai pretējā molekulas galā, bet ketozes – divas, katru savā molekulas galā, pārējās ir otrējo spirtu hidroksilgrupas. Izskaņa nosaukumā **-oze** norāda, ka tas ir ogļhidrāts: **glikoze**, **mannoze**, **riboze**.

Monosaharīdu vispārējais nosaukums norāda uz funkcionālo grupu un oglekļa atomu skaitu ar grieķu skaitļa vārdiem, tas beidzas ar izskaņu **-oze**, piemēram, aldoheksoze sešus oglekļa atomus saturošs monosaharīds ar aldehīdgrupu, ketopentoze – piecus oglekļa atomus saturošs monosaharīds ar ketogrupu. Monosaharīdi var reaģēt cits ar citu, veidojot **oligomērus** un polimērus. Monosaharīdu oligomēriem ar līdz 10 monosaharīda atlikumiem kopējais nosaukums ir **oligosaharīds**, kurā ar grieķu skaitļa vārdu norāda monosaharīda atlikumu skaitu, piemēram, pentasaharīds ir piecus monosaharīdus saturošs oligosaharīds. Polisaharīdi ir polimēri ar vairāk par 10 monosaharīdu atlikumiem. Gan oligosaharīdi, gan polisaharīdi var būt gan **homopolisaharīdi**, kurus veido viens monosaharīds, gan **heteropolisaharīdi** ar dažādiem monosaharīdiem.

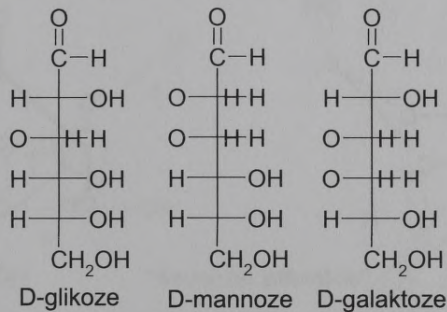
Monosaharīdi ir hirālas molekulas, jo satur vairākus asimetriskos centrus un dažādas grupas molekulas galos, tāpēc tie nevar veidot mezoformu, t. i., nav iespējama simetrija, kam ir būtiska nozīme, jo bieži no asimetriskām aminoskābēm veidotie enzīmi reaģē tikai ar vienu stereoizomēru. Vienkāršākie monosaharīdu pārstāvji ir glicerīnaldehīds un dihidroksiacetons. Glicerīnaldehīda molekulā ir asimetriskais oglekļa atoms, un tam ir divi enantiomēri *L*- (vai *S*) un *D*- (vai *R*)-glicerīnaldehīds.



### 5.1. att. Monosaharīdu D un L rindas

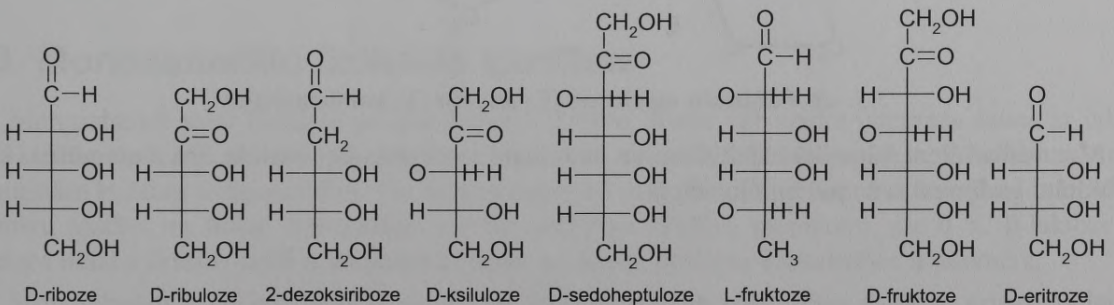
Monosaharīdi parasti satur vairākus asimetriskos oglekļa atomus, tāpēc to D vai L konfigurāciju nosaka pēc tālākā no karbonilgrupas asimetriskā oglekļa atoma konfigurācijas. D monosaharīda enantiomērs ir L monosaharīds, piemēram, D un L glicerāldēhīds vai D un L glikoze.

Monosaharīdi, kuri atšķiras tikai ar viena asimetriskā oglekļa atoma aizvietotāju telpisko izvietojumu, ir epimēri, piemēram, D glikoze un D mannoze vai D glikoze un D galaktoze.



### 5.2. att. Monosaharīdu epimēri

Bioloģiski nozīmīgākie monosaharīdi bez jau pieminētajām D-glikozes, D-mannozes, D-galaktozes ir: D-riboze, D-ribuloze, 2-dezoksi-D-riboze, D-ksiluloze, D-sedoheptuloze, D-fukoze, D-fruktoze, D-eritroze.



### 5.3. att. Nozīmīgākie monosaharīdi

## 5.2. Monosaharīdu konformācija

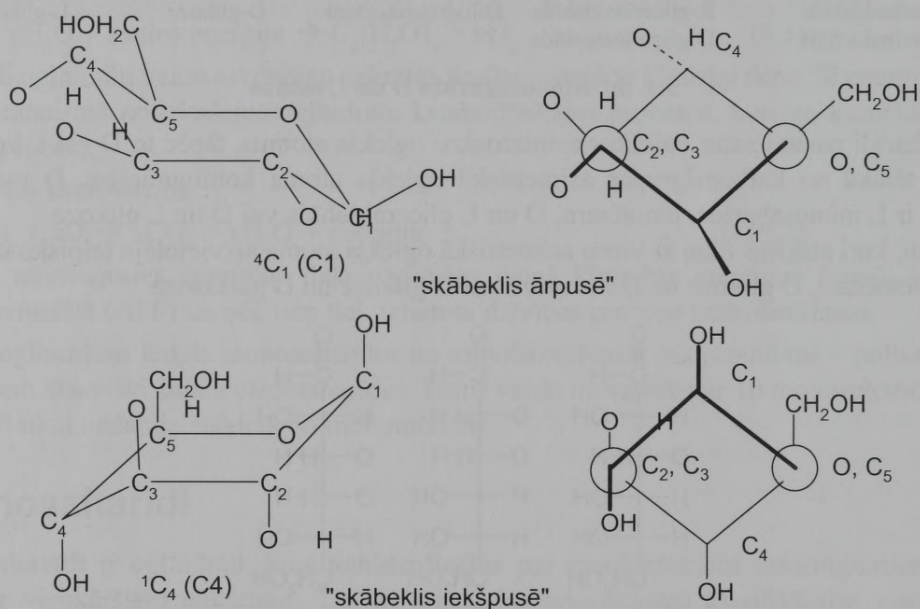
Lielu daļu monosaharīdu fizikāli ķīmisko īpašību var izskaidrot tikai ar konformācijas analīzi. Piranozei termodinamiski izdevīgākā ir krēsla konformācija. Iespējamās divas krēsla konformācijas  ${}^4C_1$ , kur augšējais indekss nozīmē oglekļa atomu augšējā krēsla pozīcijā un apakšējais indekss – oglekļa atomu zemākajā pozīcijā.

$\beta$ -D-glikopiranozei ir raksturīga  ${}^4C_1$  konformācija, jo telpiski lielās grupas tad ieņem ekvatoriālo stāvokli, kamēr  ${}^1C_4$  konformācijā tās ir termodinamiski nestabilas, jo visas telpiski lielās grupas ir aksiālā stāvoklī (sk. 5.4. att.).

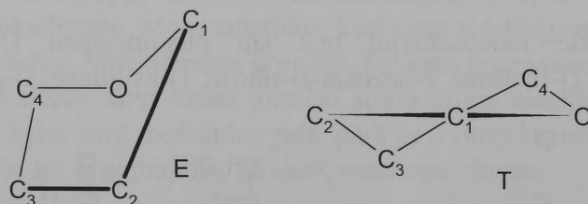
Arī furanožu cikli nav plakani, un termodinamiski stabilākā ir aploknes forma (E) un tvistforma (T) (sk. 5.5. att.).

Piranoze ir stabilāka par furanozi. Tāpēc tā dominē starp monosaharīdu cikliskajām formām.

Lielākajai daļai monosaharīdu ir salda garša, bet atkarībā no konfigurācijas un konformācijas tā var mainīties, piemēram,  $\alpha$ -D-mannopiranozei ir salda garša, bet  $\beta$ -D-mannopiranozei – rūgta.

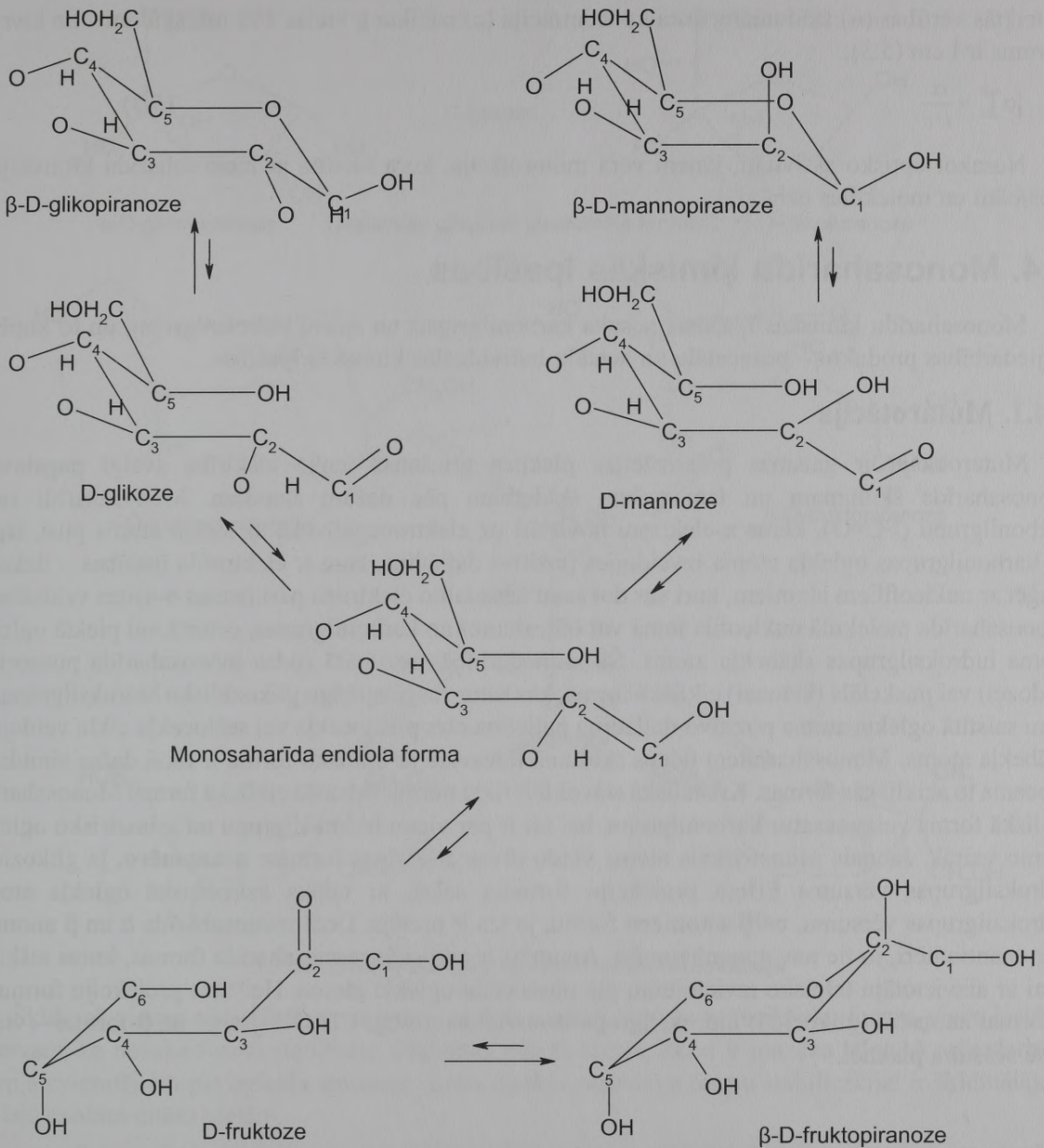


5.4. att.  $\beta$ -D-glikopiranozes krēsla formas stereoķīmiskie modeļi un projekciju formulas



5.5. att. Furanožu aploknes (E) un tvist (T) konformācijas

Monosaharīdiem, tāpat kā aldehīdiem un ketoniem, iespējama ketonenola tipa tautomērija, kuru ogļhidrātu gadījumā sauc par epimerizāciju.



5.6. att. Monosaharīdu epimerizācija

### 5.3. Monosaharīdu fizikālās īpašības

Monosaharīdi satur daudzas polārās hidroksilgrupas, kuras var veidot ūdeņraža saites ar ūdens molekulām, tāpēc cukuri labi šķīst ūdenī un kristāliskā stāvoklī ir hidroskopiskas, kristāliskas vielas ar augstām kušanas temperatūrām. Tie nešķīst nepolārā vidē. Šķīdību ietekmē monosaharīda uzbūve, izomēru sastāvs un tīrība. Anomēriem var būt atšķirīga šķīdība, piemēram, pie 0 °C  $\beta$ -laktozei ir 9 reizes lielāka šķīdība nekā  $\alpha$ -anomēram, tāpēc no ūdens šķīduma kristalizējas  $\alpha$ -anomērs.

Monosaharīdi ir optiski aktīvas vielas, tie izmaina plāknē polarizētas gaismas griešanas leņķi. Gaismas polarizācijas plaknes griešanu pie noteikta viļņa garuma, kurš atbilst nātrija spektra D līnijai, un 20 °C temperatūrā raksturo ar īpatnējo griešanu, ko aprēķina no griešanas leņķa eksperimentāli

noteiktās vērtības ( $\alpha$ ) šķīdumam, kura koncentrācija ( $c$ ) izteikta g vielas 100 mL šķīduma, un kivetes garums ir 1 cm (5.3):

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (5.3)$$

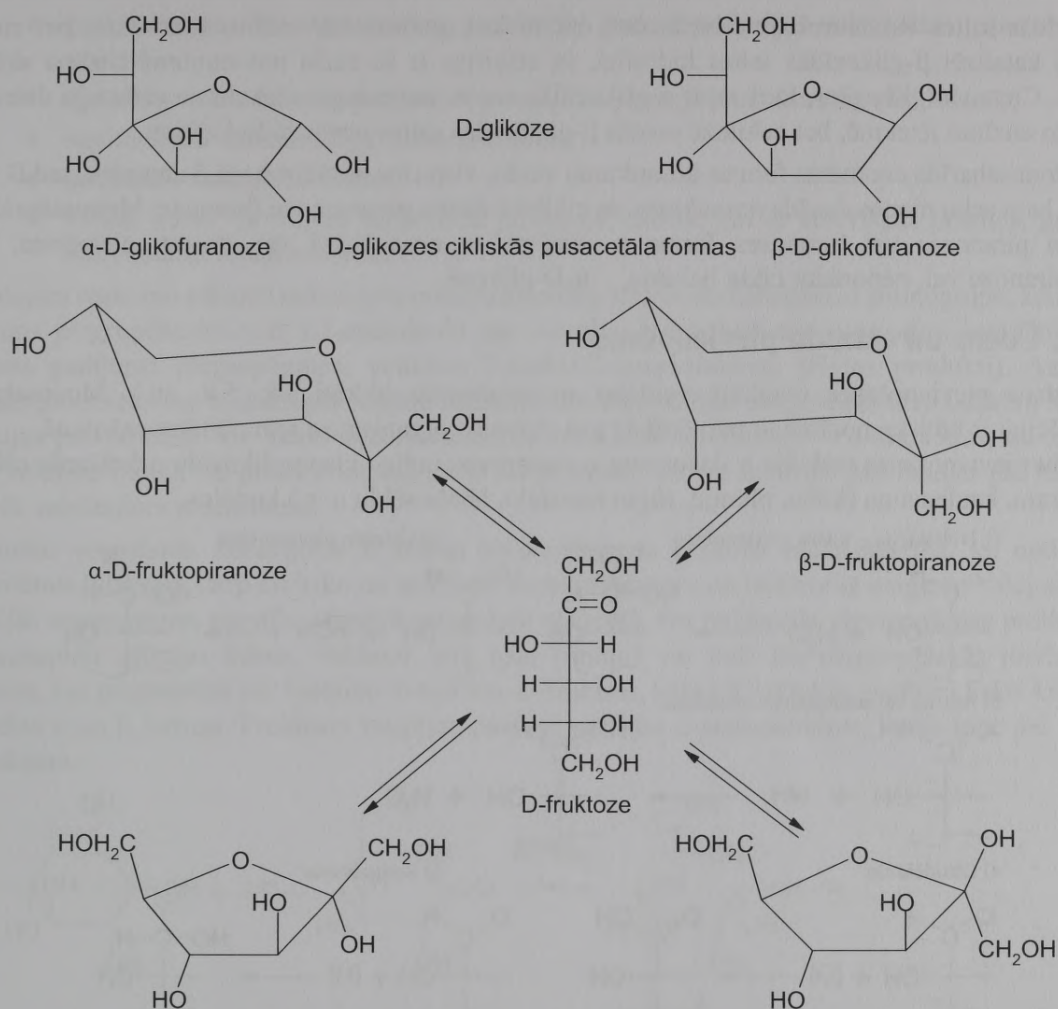
Nosakot optisko aktivitāti, jāņem vērā mutarotācija, kura saistīta ar monosaharīdu ķīmiskajām īpašībām un molekulas uzbūvi.

## 5.4. Monosaharīdu ķīmiskās īpašības

Monosaharīdu ķīmiskās īpašības nosaka karbonilgrupas un spirtu hidroksilgrupu, un to kopējās mijiedarbības produktu – pusacetālu un acetālu individuālās ķīmiskās īpašības.

### 5.4.1. Mutarotācija

Mutarotācija ir gaismas polarizācijas plaknes griešanas leņķa atšķirība svaigi pagatavota monosaharīda šķīdumam un tam pašam šķīdumam pēc dažām stundām. Monosaharīdi satur karbonilgrupu ( $>C=O$ ), kuras  $\pi$ -elektroni novirzīti uz elektronegatīvākā skābekļa atoma pusi, tāpēc uz karbonilgrupas oglekļa atoma izveidojies pozitīvs daļlādiņš, kam ir elektrofila īpašības – tieksme reaģēt ar nukleofiliem atomiem, kuri var dot savu nesadalīto elektrona pāri jaunas  $\sigma$ -saites veidošanai. Monosaharīda molekulā nukleofila lomā var būt, skaitot no karbonilgrupas, ceturtā vai piektā oglekļa atoma hidroksilgrupas skābekļa atoms. Šīs mijiedarbības rezultātā rodas monosaharīda pusacetāla (aldozei) vai pusketāla (ketozei) cikliskā forma, kas satur reaģētspējīgo glikozīdisko hidroksilgrupu, ar kuru saistītā oglekļa atoma pozitīvo daļlādiņu palielina otrs pieclocekļa vai sešlocekļa ciklu veidojošs skābekļa atoms. Monosaharīdiem ūdens šķīdumā līdzsvarā ar ciklisko formu ir tikai dažas simtdaļas procenta to acikliskās formas. Kristāliskā stāvoklī ir tikai mazāk šķīstošā cikliskā forma. Monosaharīda cikliskā forma vairs nesatur karbonilgrupu, bet tai ir par vienu hidroksilgrupu un asimetrisko oglekļa atomu vairāk. Jaunais asimetriskais atoms veido divas atšķirīgas formas:  **$\alpha$ -anomēro**, ja glikozīdās hidroksilgrupas vērsums Fišera projekciju formulā sakrīt ar tālāka asimetriskā oglekļa atoma hidroksilgrupas vērsumu, un  **$\beta$ -anomēro** formu, ja tas ir pretējs. Dotā monosaharīda  $\alpha$  un  $\beta$  anomēri nav enantiomēri, jo tie nav spoguļizomēri. Anomēri ir cikliskās monosaharīda formas, kuras atšķiras tikai ar aizvietotāju telpisko izvietojumu pie pusacetāla oglekļa atoma. Heiverta projekciju formulās  $\alpha$  formai anomēri (glikozīdā) hidroksilgrupa ir novietota pretēji  $CH_2OH$  grupai un  $\beta$ -formai – vienā pusē sešstūra plaknei.



5.7. att. Monosaharīdu virknes – cikla tautomērija

Šķīdumā vienas cikliskās formas pāreja otrā var notikt tikai caur neciklisko formu, tāpēc iestājas līdzsvars, ko nosaka formu stabilitāte. Stabilākā būs tā forma, kurai ir mazāka telpiskā mijiedarbība starp aizvietotajiem pie oglekļa atomiem. Liela nozīme atsevišķo formu stabilizācijai ir šķīdinātājam un tajā esošām citām vielām.

α un β anomērija ir mutarotācijas cēlonis. Viena no anomērām formām parasti ir ar mazāku šķīdību, tāpēc no šķīduma kristalizējoties izdalās šī forma. Ja šos kristālus izšķīdina, tad vispirms veidojas šīs formas šķīdums ar tai atbilstošu optisko aktivitāti. Šķīdumā pastāv līdzsvars starp ciklisko formu un nelielu daudzumu aciklisko karbonilformu, kura savukārt var veidot otru anomēro formu, līdz iestājas līdzsvars ar atbilstošu optiskās aktivitātes izmaiņu.

Anomērās hidroksilgrupas un ciklu veidojošā skābekļa atomu negatīvā indukcijas efekta dēļ uz oglekļa atoma ir ievērojams elektronu iztrūkums. Jo lielāks ir šis pozitīvais lādiņš uz oglekļa atoma, jo lielāka ir ar to saistītās hidroksilgrupas nukleofilās aizvietošanās varbūtība, tāpēc anomērā hidroksilgrupa (tā ir vienlaikus arī pusacetāla vai pusketāla formas hidroksilgrupa, jo veidojusies no aldehīdgrupas vai ketogrupas skābekļa atoma) pēc savas aktivitātes nukleofilās aizvietošanās reakcijās atšķiras no pārējām monosaharīda hidroksilgrupām.

Reaģētspējas atšķirības starp α un β anomērām formām ir nelielas, bet tām ir telpiski citāds novietojums, kam ir ļoti liela fizioloģiskā nozīme. Ja glikozes atlikumi polisaharīdā saistīti ar α-glikozīdisko saiti, kas rodas, glikozīdai hidroksilgrupai veidojot glikozīdisko saiti ar otras glikozes molekulas kādu citu hidroksilgrupu un saglabājot α-anomēra telpisko konfigurāciju, tad šādas

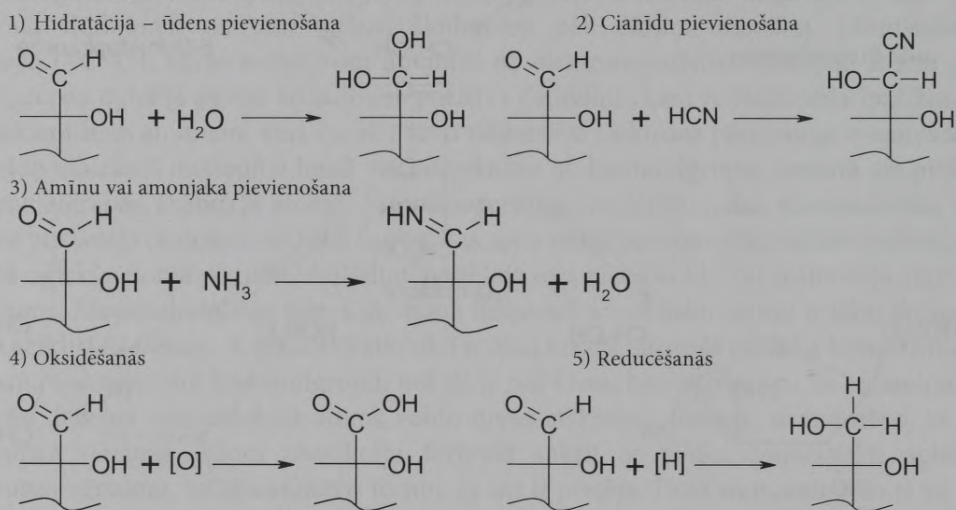
glikozīdās saites var hidrolizēt cilvēka (arī dzīvnieku) gremošanas enzīms  $\alpha$ -amilāze, bet enzīms nespēj katalizēt  $\beta$ -glikozīdās saites hidrolīzi, jo atšķirīgs ir šo saišu novietojums enzīma aktīvajā centrā. Ciete vai glikogēns, kuri satur  $\alpha$ -glikozīdās saites, sagremojas siekalu un aizkuņģa dziedzera izdalīto enzīmu ietekmē, bet celulozē esošās  $\beta$ -glikozīdās saites nevar hidrolizēties.

Monosaharīda anomērās formas nosaukumu veido, vispirms norādot  $\alpha$  vai  $\beta$  anomēru, tad D vai L rindu, kam seko monosaharīda nosaukums un cikliskā forma piranoze vai furanoze. Monosaharīdiem, kuriem piranozes vai furanozes forma ir vienīgā, to nosaukumā var atstāt, piemēram,  $\alpha$ -D-glikopiranoze vai, nenorādot cikla lielumu, –  $\alpha$ -D-glikoze.

### 5.4.2. Ūdens un cianīdu pievienošana

Ūdens pievienošanas rezultātā veidojas monosaharīdu hidratī (sk. 5.8. att.). Monosaharīdu hidratācijai ir būtiska nozīme to pārvērtībās gan dzīvajos organismos, gan pārtikas ražošanā.

Cianīdu pievienošanas reakcija ir dažos augos sastopamo indīgo ciano-glikozīdu uzkrāšanās cēlonis, piemēram, kauleņaugu (ķiršu, plūmju, rūgto mandeļu, ābolu sēkļu u. c.) kodolos.



5.8. att. Nukleofilās pievienošanās monosaharīdu karbonylgrupai un tās oksidēšanās un reducēšanās reakcijas

### 5.4.3. Reakcijas ar aminogrupu saturošiem savienojumiem (Majāra reakcijas)

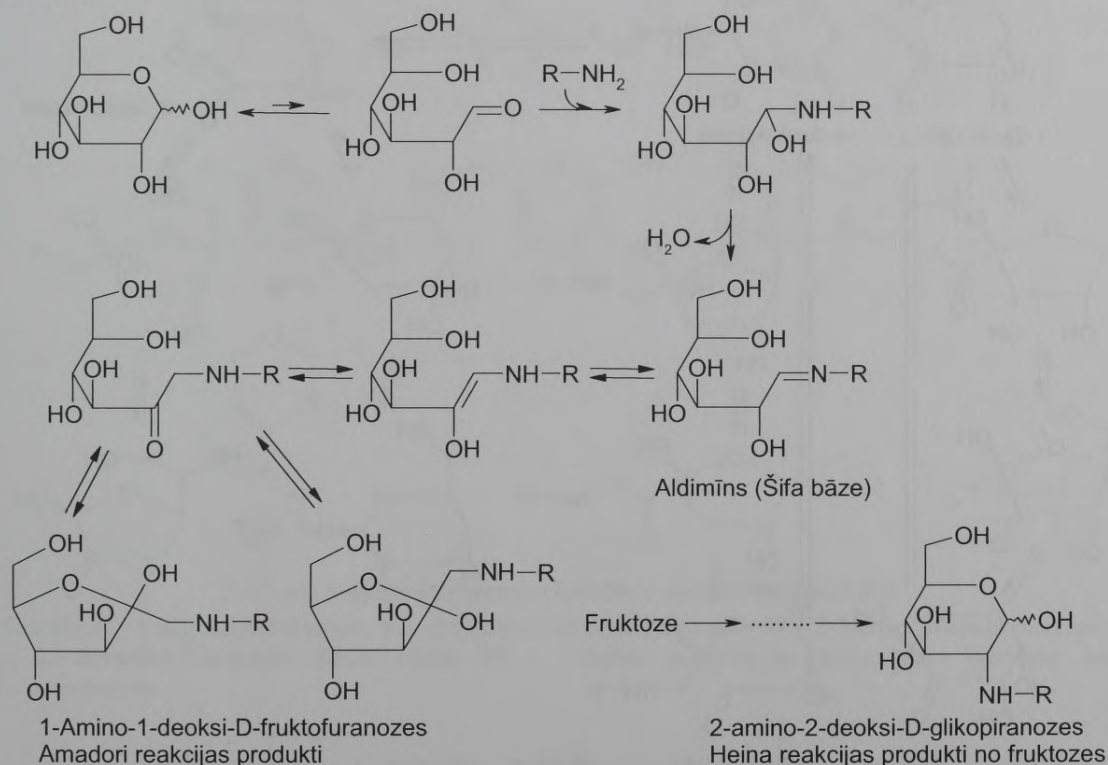
Reakcijās ar aminogrupu saturošiem savienojumiem veidojas N-glikozīdi, sekojošajās daudzveidīgajās reakcijās rodas dažādi produkti, no kuriem daudzi ir krāsaini. N-glikozīdi plaši izplatīti dabā, piemēram, nukleīnskābes, nukleotīdi, nukleozīdi, dinukleotīdi. Reakcijas produkti ar amīniem veidojas dabā, kad reducējošie cukuri nonāk kontaktā ar proteīniem, peptīdiem, aminoskābēm vai amīniem paaugstinātā temperatūrā zemas ūdens aktivitātes apstākļos un ilgstošā kontaktā. Aldimīnu vai ketimīnu veidošanās kopā ar tai sekojošām reakcijām pazīstama kā Majāra reakcija, jeb neenzimātiskā brūnēšana. Reakcijas produkti ir:

- brūnie pigmenti ar nenoteiktu struktūru, ko sauc par melanoīdiem. Brūnēšana ir vēlama īpašība ceptiem un grilētiem produktiem, bet nevēlama, piemēram, kondensētajam pienam, sausajām zupām;
- gaistošie savienojumi, kas rodas Majāra reakcijā un piedalās aromāta veidošanā, nodrošina cepto ēdienu aromātu, bet tie var būt arī nevēlami, jo var veidoties nevēlams aromāts, produktu uzglabājot vai karsējot pārtikas produktu pasterizācijas, sterilizācijas vai grauздēšanas laikā;

- garšvielas, sevišķi rūgtas vielas, piemēram, grauzdētas kafijas vai grilētas gaļas aromāta veidotāji;
- reducētāji, ko sauc par reduktoniem, kas pasargā produktus no oksidēšanās;
- neaizstājamo aminoskābju zuduma cēlonis;
- potenciāli mutagēnas vielas;
- vielas, kuras var veidot šķērssaites proteīnos, saistot gan to atsevišķus posmus, gan pat individuālas olbaltumvielas.

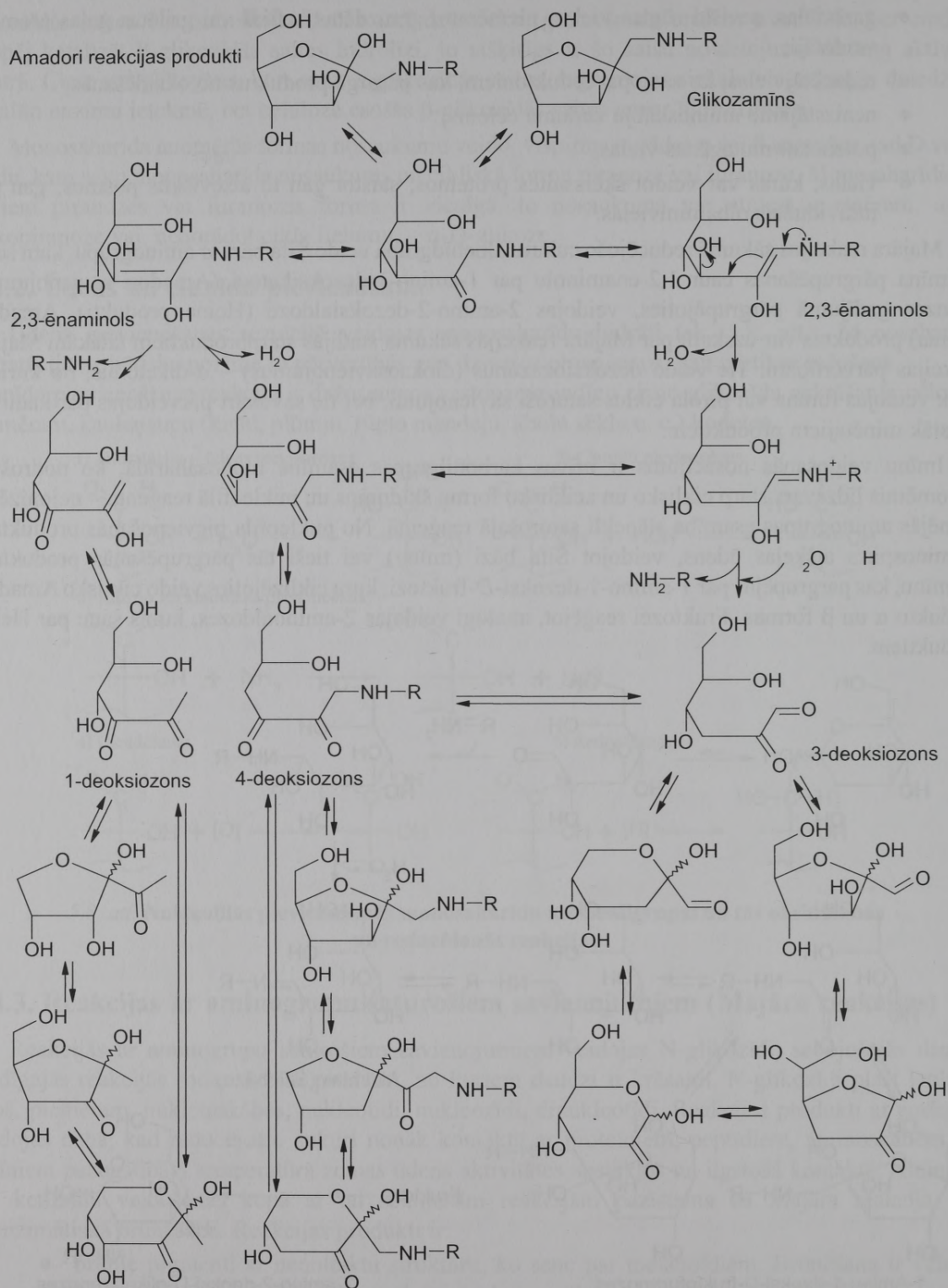
Majāra reakcijas sākumā reducējošo cukuru aldehīdgrupa veido Šifa bāzi ar aminogrupu, kam seko aldimīna pārgrupēšanās caur 1,2-enamīnolu par 1-amino-1-dezoksiketozi (Amadori savienojumu). Ketozes gadījumā pārgrupējoties, veidojas 2-amino-2-dezoksialdoze (Heina produkti). Amadori (Heina) produktus var uzskatīt par Majāra reakcijas sākuma stadijas starpproduktiem tālākām Majāra reakcijas pārvērtībām. Tie veido dezoksiozonus (diokso savienojumus) –  $\alpha$ -diketonus, no kuriem tālāk veidojas furāna vai pirola ciklus saturoši savienojumi, bet tie savukārt pārveidojas par kādu no augstāk minētajiem produktiem.

Imīnu veidošanās nosacījums ir brīvas karbonilgrupas esamība monosaharīdā, ko nodrošina tautomērais līdzsvars starp ciklisko un aciklisko formu šķīdumos un nukleofilā reaģenta – nejonizētas pirmējās aminogrupas esamība slāpekli saturošajā reaģentā. No nukleofila pievienošanās produkta –  $\alpha$ -aminospirta atšķēlas ūdens, veidojot Šifa bāzi (imīnu) vai tieši tās pārgrupēšanās produktu – enamīnu, kas pārgrupējas par 1-amino-1-dezoksi-*D*-fruktozi, kura ciklizējoties veido ciklisko Amadori produktu  $\alpha$  un  $\beta$  formas. Fruktozei reaģējot, analogi veidojas 2-aminoaldezes, kuras sauc par Heina produktiem.



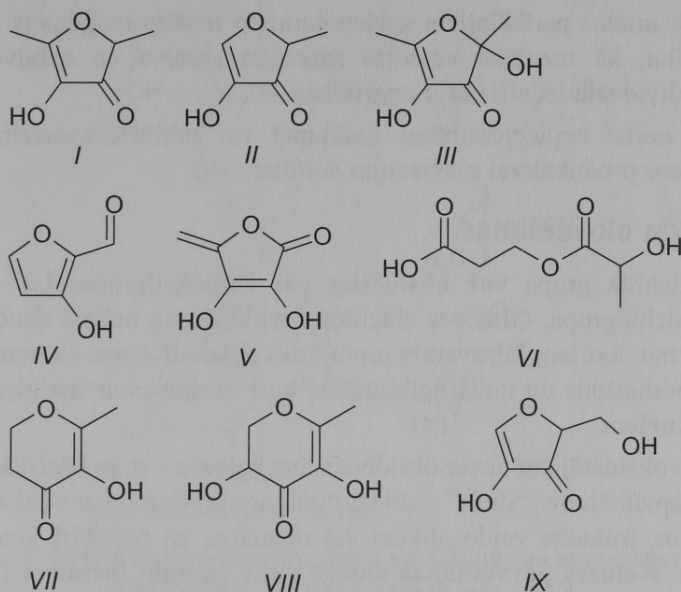
### 5.9. att. Amadori un Heina reakcijas produktu veidošanās reakcijā ar aminogrupu saturošiem savienojumiem (Majāra reakcijas pirmā fāze)

Amadori (Heina) produkti ir tikai Majāra reakcijas starpprodukti, un tie ir nestabili, jo ātri sadalās par 1-, 3- vai 4-dezoksi- $\alpha$ -dikarbonilsavienojumiem – dezoksiozazoniem.



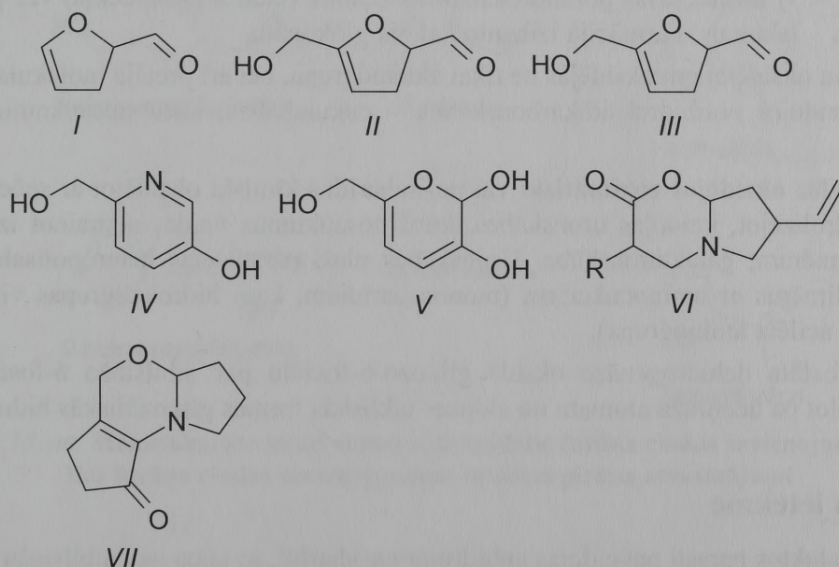
5.10. att. Dezoksiozozonu veidošanās no Amadori produktiem

Dezoksiozozoniem raksturīga liela reaģētspēja, jo blakus novietotie pozitīvo daļlādiņu saturošie karbonilgrupu oglekļa atomi savstarpēji palielina karbonilgrupu reaģētspēju ļoti daudzveidīgās reakcijās. Produktu iznākums atkarīgs no dezoksiozozonu uzbūves, šo pārvērtību norise un mehānismi pilnībā nav zināmi, sevišķi tas attiecas uz 4-dezoksiozozoniem.



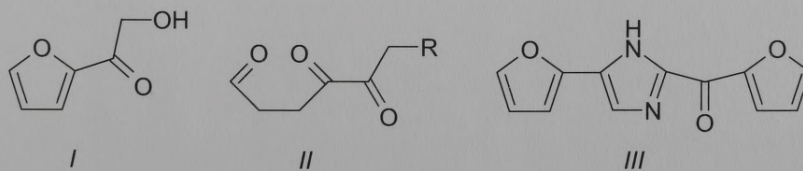
**5.11. att. 1-dezoksiozozonu sekundāro pārvērtību produkti:**

*I* – 4-hidroksi-2,5-dimetil-(2H)-furān-3-ons, *II* – norfurānenols, *III* – acetilformoīns, *IV* – 2-formil-3-hidroksifurāns, *V* – metilēnredukskābe, *VI* – β-hidroksipropionāta laktāts (β-hidroksipropionskābes pienskābes esteris), *VII* – maltols, *VIII* – 3,5-dihidroksi-2-metil-5,6-dihidropirān-4-ons, *IX* – 3-hidroksi-5-hidroksimetilfurān-4-ons



**5.12. att. 3-dezoksiozozona sekundāro pārvērtību produkti:**

*I* – furanāls, *II* – 5-hidroksimetilfuranāls, *III* – 2-formil-5-hidroksimetilfuranāls, *IV* – 3-hidroksi-6-hidroksimetilpiridīns, *V* – 2,3-dihidroksi-5-hidroksimetil-(2H)-pirāns, *VI* – Amadori produkta un aminoskābes bicikliskais laktons, *VII* – maltokszazīns



**5.13. att. 4-deoksiozozonu pārvērtību sekundārie produkti:**

*I* – 2-hidroksiacetilfurāns, *II* – furozīns, *III* – 2(2-furoil)-5-(2-furil)-1H-imidazols

Visiem 5.11.–5.13. attēlos parādītajiem savienojumiem ir liela reaģētspēja. Tā nodrošina tālāko pārvērtību daudzveidību, kā rezultātā veidojas sarežģīta sastāva un uzbūves produkti ar lielu molekulasmasu, kuru individuāla izdalīšana ir apgrūtināta.

Majāra reakcijas norisi nepieciešamības gadījumā var inhibēt: samazinot pH, mitruma un reducējošo cukuru saturu produktā vai pievienojot sulfītus.

#### 5.4.4. Monosaharīdu oksidēšanās

Monosaharīdu aldehīda grupa **var oksidēties** par karboksilgrupu. Lai notiktu oksidēšanās, nepieciešama brīva aldehīdgrupa. Glikozes aldehīdforma šķīdumā nelielā daudzumā ir līdzsvarā ar ciklisko pusacetāla formu, kas ļauj līdzsvaram novirzīties aldehīdformas virzienā, tai oksidējoties par karboksilgrupu. Monosaharīdus un citus ogļhidrātus, kuri oksidējas ar maigiem oksidētājiem, sauc par **reducējošiem cukuriem**.

Ketoni ar maigiem oksidētājiem nevar oksidēties, bet ketozes var, jo bāziskā vidē tās caur endiolo (“en” divkāršas saites apzīmējums, “diols” – divvērtīgais spirts) formu var veidot kādu no epimērajām aldozēm. Tā, piemēram, fruktoze veido glikozi vai mannozi, kā rezultātā ketoze var oksidēties ar maigiem oksidētājiem. **Ketozes pārvēršanās aldozē caur endiolo formu** ir līdzsvara process, kas atbilst aldehīdiem un ketoniem raksturīgajai ketonenola tautomērijai, dotajā gadījumā epimerizācijai. Tā praktiski nenotiek, ja pH ir 3–7.

Monosaharīdu reakciju ar kompleksiem vara(II) vai sudraba(I) hidroksīdiem izmanto ogļhidrātu pierādīšanai. Reakcijas produkta nosaukumu veido, nomainot aldozes izskaņu *-oze* ar *-onskābe*. Skābā vidē (pH < 3) izveidojušās polihidroksikarbonskābes veido  $\delta$  (sešlocekļa) vai  $\gamma$  (pieclocekļa) cikliskos esterus – laktonus. Farmācijā izmanto kalcija glukonātu.

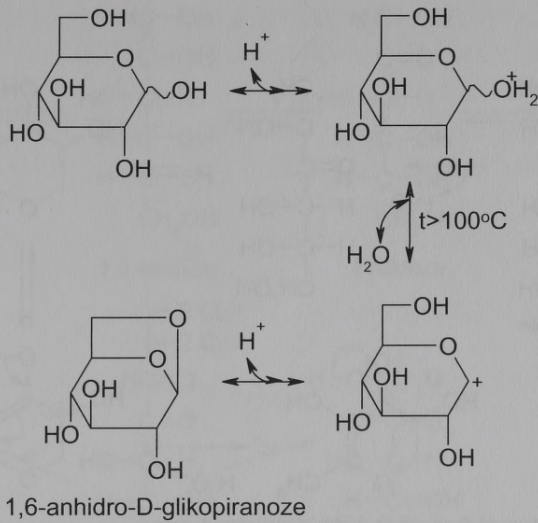
Ar spēcīgiem oksidētājiem oksidējas ne tikai aldehīdgrupa, bet arī pretējā molekulas gala pirmējā spirta grupa, veidojot polihidroksidikarbonskābes – cukurskābes, kuru nosaukumiem ir izskaņa *-ārskābe*.

Monosaharīdus **oksidējot enzimatiski** vai polisaharīdus ķīmiski oksidējot ar spēcīgu oksidētāju un pēc tam hidrolizējot, veidojas uronskābes, kuru nosaukumus veido, nomainot izskaņu *-oze* ar *-uronskābe*, piemēram, galakturonskābe. Uronskābes plaši pārstāvētas heteropolisaharīdu sastāvā, kur tās veido dimērus ar aminocukuriem (monosaharīdiem, kam hidroksilgrupas vietā pie C-2 ir aminogrupa vai acilēta aminogrupa).

Glikozo-6-fosfāta dehidrogenāze oksidē glikozo-6-fosfātu par atbilstošu 6-fosfoglikonskābes  $\delta$ -laktonu, atšķeļot pa ūdeņraža atomam no aldozes cikliskās formas glikozīdiskās hidroksilgrupas un C-1 atoma.

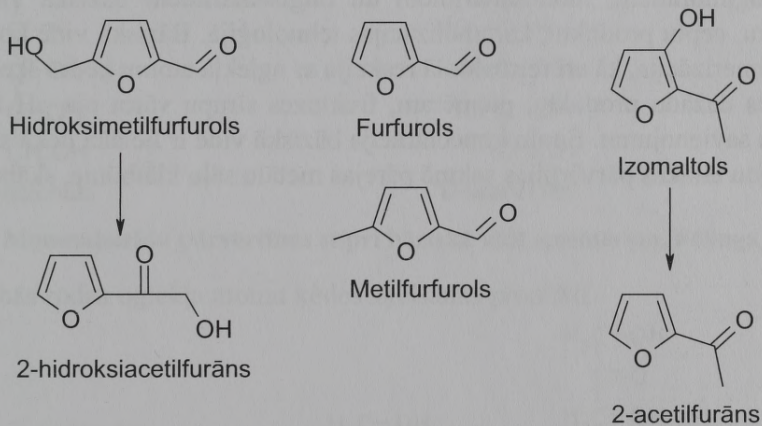
#### 5.4.5. Skābes ietekme

Pārtikas produktos parasti neveidojas anhidromonosaharīdi, jo tajos nav atbilstošu apstākļu, kādi ir, piemēram, maizes garozas veidošanās procesā, kurā apstākļi ir krietni skarbāki. Tomēr pilnīgi to veidošanās iespēju nevar izslēgt.

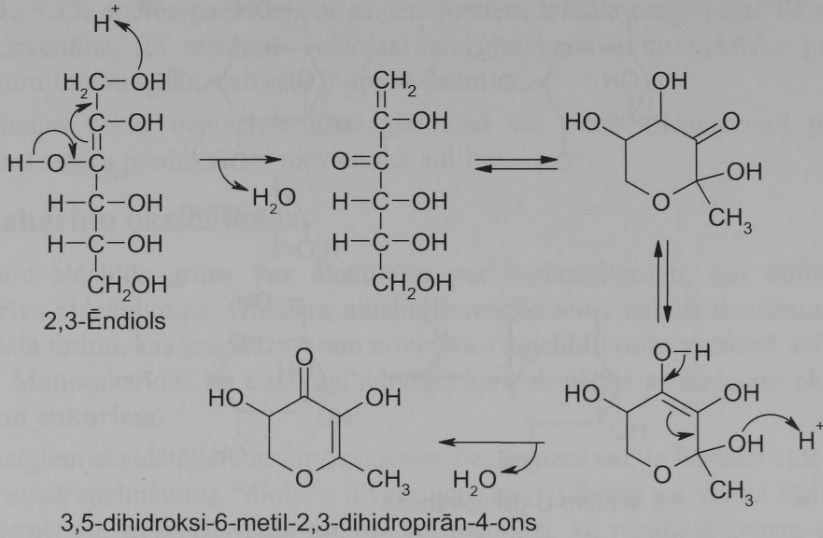


5.14. att. Anhidromonosaharīdu zīmju veidošanās no monosaharīdiem stipri skābā vidē temperatūrā zem 100 °C

No pārtikas drošuma un kvalitātes kontroles viedokļa izšķiroša ir furāna rindas savienojumu veidošanās skābes katalīzē, kas sākas jau istabas temperatūrā ogļhidrātu ilgstošā saskarē ar skābi. Sevišķi aktīvi tas notiek paaugstinātā temperatūrā.



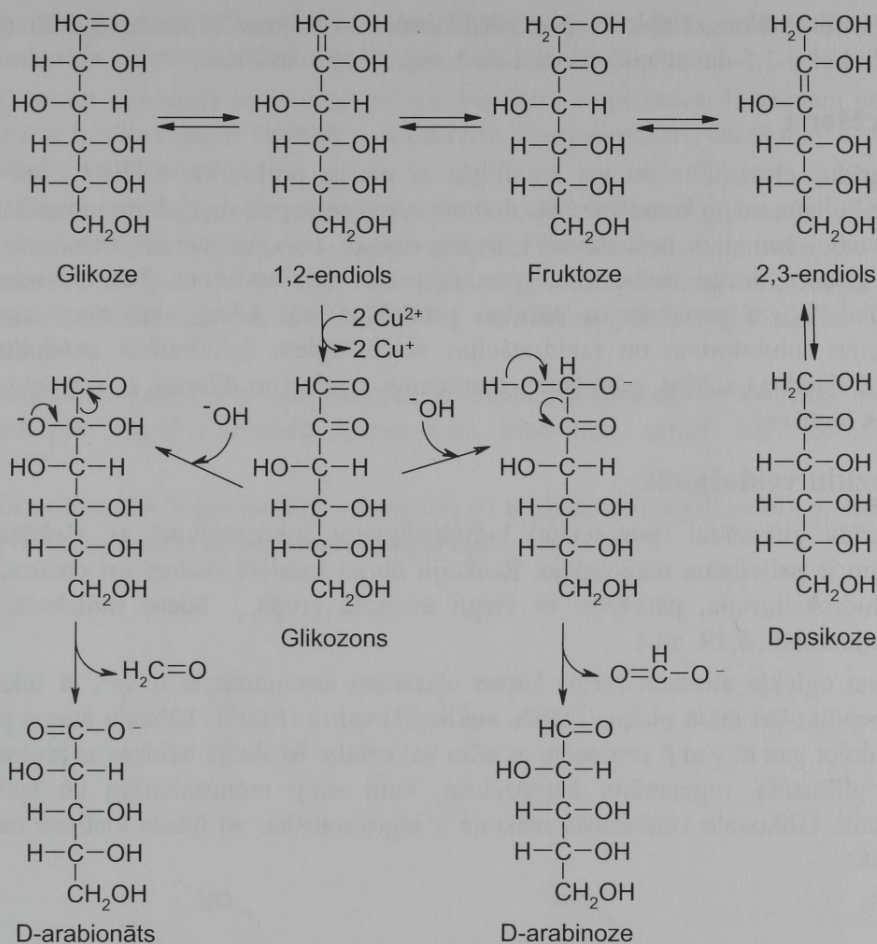
5.15. att. Monosaharīdu stipri skābā vidē veidotie furāna rindas savienojumi. Bez furāna rindas savienojumiem veidojas pirāna atvasinājumi



5.16. att. Pirāna rindas savienojumu veidošanās no monosaharīdiem stipri skābā vidē un paaugstinātā temperatūrā

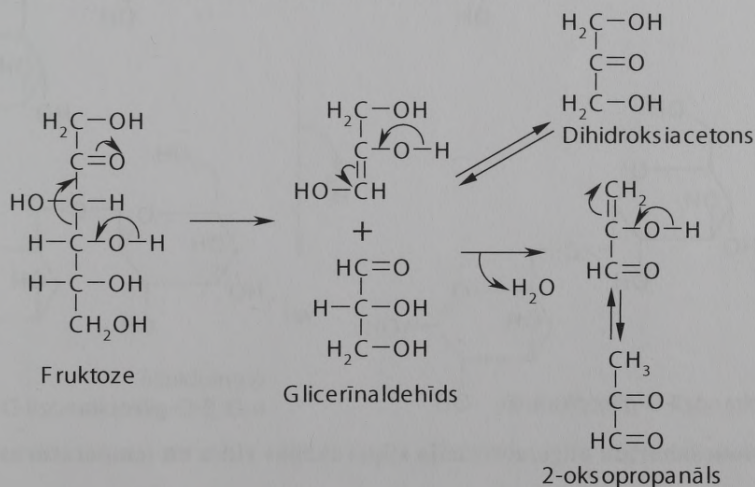
#### 5.4.6. Pārvērtības bāziskā vidē

Reakcijas ar ogļhidrātiem, monosaharīdiem un oligosaharīdiem bāziskā vidē notiek cukura ražošanā un bāzisku, ceptu produktu, karamelizācijas tehnoloģijā. Bāziskā vidē kopā ar oksidēšanos vēl ātrāk notiek epimerizācija, kā arī retroaldolā reakcija ar oglekļa atomu ķēdes šķelšanu, kā rezultātā veidojas liels skaits dažādu produktu, piemēram, fruktozes sīrupu vārot pie pH 8–10, veidojas ap 20 dažādu gaistošu savienojumu. Enolu koncentrācija bāziskā vidē ir lielāka nekā skābes klātienē, un enolizācijas produktu tālākās pārvērtības sekmē pārejas metālu sāļu klātbūtnē, skābeklis un nukleofili reaģenti.



5.17. att. Monosaharīdu pārvērtības stipri bāziskā vidē (piemēram, Fēlinga reakcijā)

Šajās pārvērtībās rodas oglekļa atomu ķēdes šķelšanās produkti.



5.18. att. Fruktozes sašķelšanās stipri bāziskā vidē

Monosaharīdu šķelšanās produktiem ir ļoti liela reaģētspēja, tāpēc tie piedalās daudzveidīgās pārvērtībās, kuru produktiem ir būtiska nozīme pārtikas aromāta veidošanā. Piemēram, fruktozei noārdoties bāziskā vidē (pH 8–10), veidojas šādi gaistoši produkti: acetāts, 1-hidroksibutān-2-ons, 3-hidroksibutān-2-ons, 4-hidroksibutān-2-ons, 2-hidroksimetilfurāns (furiļspirts), 2-hidroksimetil-5-metilfurāns, 4-hidroksi-

2,5-dimetil-(2H)-furan-2-ons, 2-hidroksi-3-metilciklopenta-2-ēn-1-ons, 2-hidroksi-3,4-dimetilciklopenta-2-ēn-1-ons, 2-hidroksi-3,5-dimetilciklopenta-2-ēn-1-ons,  $\gamma$ -butirolaktons.

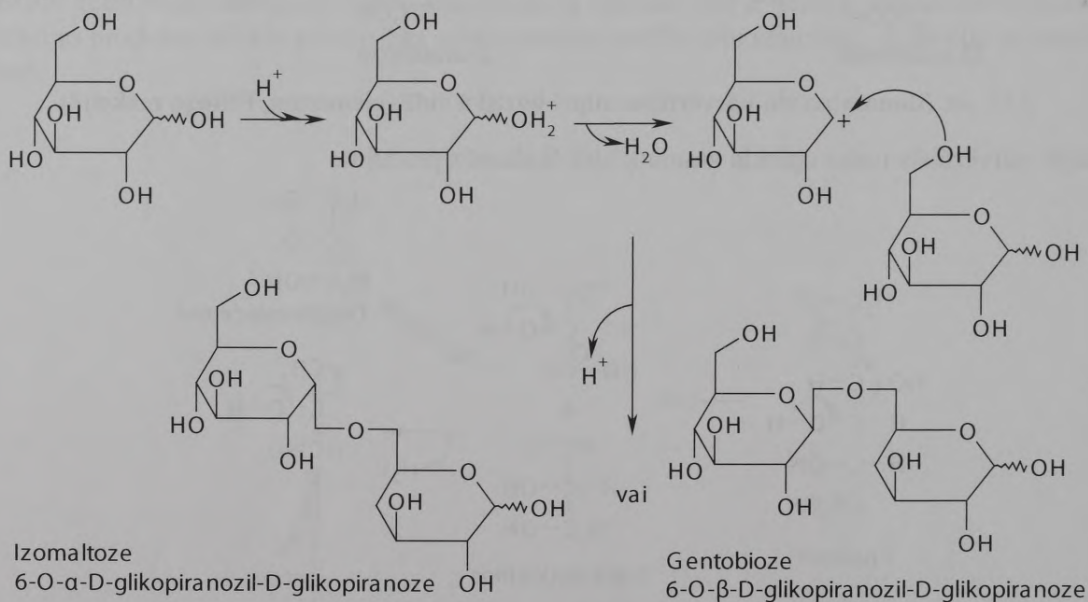
### 5.4.7. Reducēšana

Monosaharīdus elektroķīmiski vai katalītiski ar nātrija borhidrīdu ( $\text{NaBH}_4$ ) var reducēt līdz atbilstošiem polioliem, un no ketozēm rodas divi stereoizomērie polioli. Cukuru reducēšanas produktu nosaukumus veido, nomainot nosaukumā izskaņu *-oze* ar *-itols*, piemēram, mannoze – mannitols. Izņēmums ir glikoze, kuras reducēšanas produktu sauc par sorbitolu. Tos izmanto par cukura aizstājējiem diabētiķiem paredzētajos pārtikas produktos, par ūdens aktivitātes samazinātājiem, par kristalizācijas inhibitoriem un rehidratācijas veicinātājiem dehidratētos produktos. Sorbitols sastopams dabā daudzos augļos, piemēram, bumbieros, ābolos un plūmēs, to izmanto par izejvielu askorbīnskābes iegūšanā.

### 5.4.8. Glikozīdu veidošanās

Monosaharīda glikozīdai (pusacetāla) hidroksilgrupai salīdzinājumā ar pārējām spirta tipa hidroksilgrupām ir palielināta reaģētspēja. Reakciju norisi katalizē skābes vai enzīmi, kas protonē glikozīdisko hidroksilgrupu, pārvēršot to viegli aizejoša grupā – ūdens molekulā, un veidojot glikozilkarbkatjonu (sk. 5.19. att.).

Karbkatjona oglekļa atomam arējās kārtas elektronu konfigurācija ir  $sp^2$ , tā tukšā orbitāle ir novietota perpendikulāri cikla plaknei, tāpēc nukleofila spirta (ROH) skābekļa atoma pievienošanās var notikt, veidojot gan  $\alpha$ , gan  $\beta$  protonēto acetālu vai ketālu. Reakcija beidzas ar protona atšķelšanu no protonētā glikozīda, reģenerējot katalizatoru. Saiti starp monosaharīdu un spirtu sauc par glikozīdisko saiti. Glikozīda veidošanās reakcija ir atgriezeniska, un ūdens klātienē reakcija notiek pretējā virzienā.



5.19 att. Monosaharīdu oligomerizācija stipri skābes vides un temperatūras ietekmē

Dzīvos organismos skābes katalizatora lomu izpilda enzīms, un reakcija notiek uz enzīma aktīvā centra virsmas. Reakcija ir stereospecifiska, un veidojas tikai viena anomēra forma. Glikozīdi nesatur glikozīdisko hidroksilgrupu, tāpēc nav iespējama karbonilgrupas veidošanās un glikozīdiem nav reducējošas īpašības, t. i., tie nereaģē ar vājiem oksidētājiem.

Spirta vietā var būt arī cita monosaharīda vai oligosaharīda hidroksilgrupa. Ja pēdējā ir glikozīdā hidroksilgrupa, tad veidojas nereducējošs disaharīds vai oligosaharīds (sk. 5.20. att. A). Ja tā ir kāda

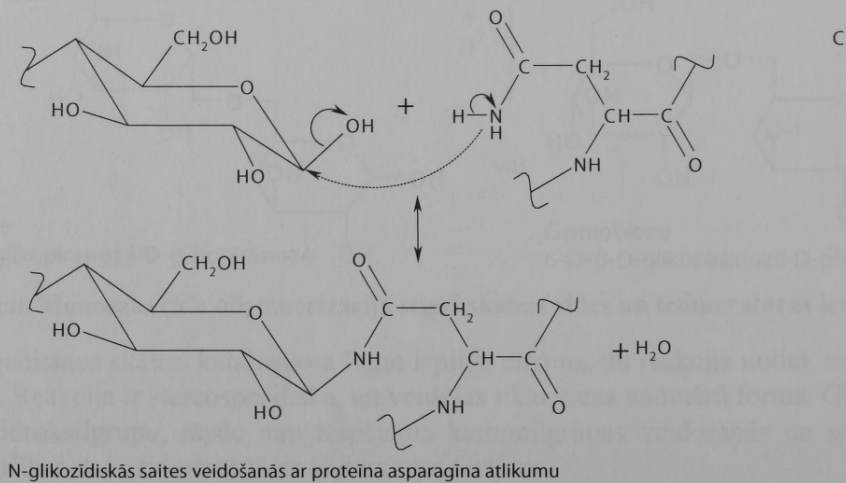
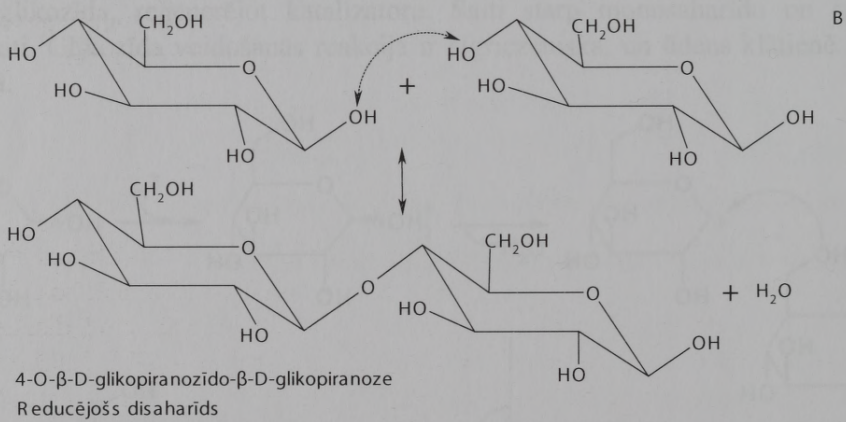
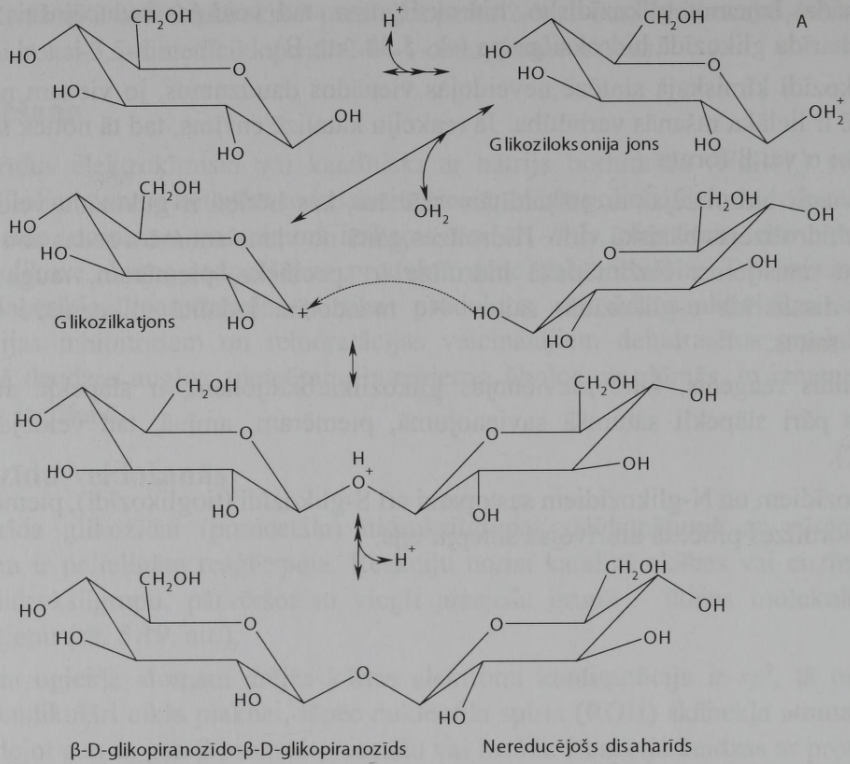
cita monosaharīda, izņemot glikozīdisko, hidroksilgrupa, tad veidojas reducējošais disaharīds, jo saglabājas disaharīda glikozīdā hidroksilgrupa (sk. 5.20. att. B).

$\alpha$  un  $\beta$  glikozīdi ķīmiskajā sintēzē neveidojas vienādos daudzumos, jo vienam no tiem dažādu faktoru ietekmē ir lielāka rašanās varbūtība. Ja reakciju katalizē enzīms, tad tā notiek stereospecifiski un veidojas tikai  $\alpha$  vai  $\beta$  forma.

Glikozīdi viegli hidrolizējas ar atšķaidītām skābēm, kas būtībā ir glikozīdu veidošanai pretējā reakcija. Tie nehidrolizējas bāziskā vidē. Hidrolīzes gaitā no viena anomēra rodas abu monosaharīda anomēro formu maisījums. Enzimātiskā hidrolīze ir specifiska, piemēram, rauga  $\alpha$ -glikozidāze hidrolizē tikai disaharīda  $\alpha$ -glikozīdās saites. No mandelēm izdalītā glikozidāze hidrolizē tikai  $\beta$ -glikozīdiskās saites.

Ja nukleofila reaģents, kurš pievienojas glikozilkarbkatjonam, ir slāpekļa atoms ar nesadalīto elektronu pāri slāpekli saturošā savienojumā, piemēram, amīnā, tad veidojas N glikozīdi (sk. 5.20. att. C).

Bez O-glikozīdiem un N-glikozīdiem sastopami arī S-glikozīdi (tioglikozīdi), piemēram, sinigrīns sinepēs, kura hidrolīzes procesā atbrīvojas sinepju eļļa.



5.20. att. Disaharīdu veidošanās

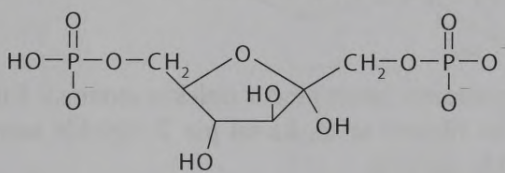
## 5.4.9. Monosaharīdu acilēšana

Monosaharīdu fosforilēšanai ar fosforskābi ir būtiska nozīme monosaharīdu mobilizēšanai šūnā un aktivēšanai tālākajām metaboliskajām pārvērtībām.

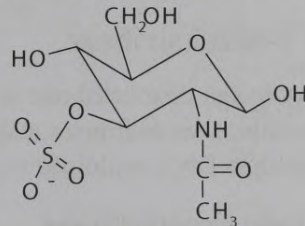
Ar fosfatēšanu šūna panāk glikozes fiksāciju, jo, pirmkārt, jonizēto fosfātu saturoša glikoze nevar izklūt no šūnas caur membrānu, otrkārt, tā veicina glikozes saistīšanos ar enzīmiem, treškārt, ar to palielinās glikozes reaģētspēja. Šādi glikozes un fosforskābes esteri veidojas ne tikai ar glikozi un fosforskābi, bet arī ar difosfātu, kas saistīts ar nukleozīdu, veidojot koenzīmiem NAD, FAD vai koenzīmam-A līdzīgus analogus, kas piedalās glikogēna veidošanā vai galaktozes pārvērtībā glikozē, un otrādi, kā arī citās reakcijās.

Savukārt acilēšanu ar sērskābi dzīvie organismi izmanto heterooligosaharīdu vai polisaharīdu polaritātes palielināšanai, lai organismā saistītu jonus un ūdeni. Saistaudos sastopamie glikozamīn-oglikānu polimēri satur ar sērskābi esterificētas monosaharīdu atlieku hidroksilgrupas.

Monosaharīdu vai disaharīdu un taukskābju esterus, t. s. tauku cukurus, izmanto par pārtikas piedevām, parfimērijā un farmācijā, jo tiem piemīt neitrālo virsmas aktīvo vielu īpašības.



1,6-difosfāt- $\alpha$ -D-fruktofuranoze



3-sulfāt-2-deoksi-2-N-acetilamino- $\beta$ -D-glikopiranoze  
 $\beta$ -N-acetilglikozamīns

5.21. att. Monosaharīdu acilēšanas produkti

## 5.5. Monosaharīdu pārstāvji

Monosaharīdi to lielā hidroksilgrupu skaita dēļ ir bezkrāsainas, kristāiskas vielas ar augstu kušanas temperatūru, kuras labi šķīst ūdenī, bet nešķīst nepolāros šķīdinātājos. Lielākajai daļai monosaharīdu un disaharīdu ir salda garša, un tie nav toksiski. Ja ikdienā lietotā disaharīda saharozes saldumu pieņem par 100%, tad glikozes saldums ir 75%, galaktozes – 30%, fruktozes – 175%, bet mākslīgās saldumvielas saharīna saldums – 35 000%. Lielākā daļa monosaharīdu ir aldoses un pieder D-rindai.

### 5.5.1. Glikoze

Glikoze ir dabā visizplatītākais monosaharīds oligosaharīdu un polisaharīdu sastāvā. Glikoze metabolizējas glikolīzes ceļā par piruvātu, no kura tālāk veidojas acetilkoenzīms-A, kas iekļaujas citronskābes ciklā pilnīgai oksidēšanai. Brīvā veidā glikoze ir medū (aptuveni 50%) un asinīs (aptuveni 100 mg%). Glikoze organismā nodrošina apmēram 60% enerģijas un ir izejviela daudzdu savienojumu oglekļa atomu skeleta veidošanai. Cilvēka veselībai ir būtiski uzturēt konstantu glikozes līmeni asinīs, ko regulē ar hormonu glikagona un insulīna attiecību. Insulīna izdalīšanās traucējumi ir viens no diabēta cēloņiem.

### 5.5.2. Galaktoze

D-galaktoze sastopama dažādu augu hemiceluložu sastāvā, pektīnos un kopā ar glikozi veido disaharīdu laktozi. Galaktoze no glikozes atšķiras ar pretēju hidroksilgrupas novietojumu pie ceturtā oglekļa atoma. Organismā galaktoze pārvēršas glikozē tālākai izmantošanai, kā arī sintezējas no glikozes, lai veidotu piena galveno cukuru – laktozi, kuras saldums salīdzinājumā ar saharozi ir tikai

16%. Ja nav enzīmu, kas nepieciešami galaktozes pārvēršanai glikozē, tad iestājas smagi vielmaiņas traucējumi – galatozēmija ar galaktozes un tās 1-fosfāta uzkrāšanos asinīs un audos. Sākuma simptomi ir vemšana, palielinātas aknas, mentāla atpalicība, kataraktas attīstība, galaktozei reducējoties par galaktānu un uzkrājoties acīs. Lai to novērstu, jāievēro no galaktozes brīva diēta.

### 5.5.3. Fruktoze

Fruktozi dažreiz sauc arī par levulozi (jo tā gaismas polarizācijas plakni griež pa kreisi) vai augļu cukuru (satopama augļos). Daudz tās ir medū (apm. 50%). Fruktoze kopā ar glikozi veido saharozi. Atšķirībā no abiem augstāk apskatītajiem monosaharīdiem fruktoze ir ketoze. Tā veido gan sešlocekļa (piranozes), gan pieclocekļa (furanozes) cikliskās struktūras. Pārtikā fruktozi cenšas izmantot par saldinātāju, jo tā ir saldāka par saharozi, taču tā var izraisīt pastiprinātu aptaukošanos. Aknās fruktoze fosforilējas par fruktozes 1-fosfātu, kurš ar aldolāzi II sadalās par dihidroksiacetona fosfātu un glicerīna aldehīdu, pēc kura fosforilēšanas abi produkti ir glikolīzes metabolīti. Tie radušies, apejot fruktozes 1,6-difosfāta veidošanās stadiju glikolīzē, kurā tiek regulēts **glikolīzes ātrums un līdz ar to acetilkofermenta A, izejvielas taukskābju sintēzei, veidošanās**.

### 5.5.4. Riboze un 2-dezoksiriboze

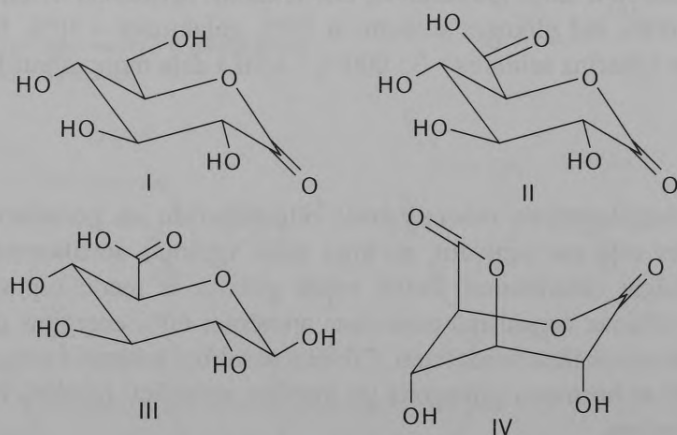
Riboze un tai radniecīgā dezoksiriboze ir aldopentozes (satur piecus oglekļa atomus). Riboze ir ribonukleotīdu sastāvdaļa. Dezoksiriboze atšķiras no ribozes ar to, ka tai pie 2. oglekļa atoma nav hidroksilgrupas. Tā ietilpst DNS veidojošo nukleotīdu sastāvā.

### 5.5.5. Monosaharīdu atvasinājumi

Oksidējot monosaharīda **aldehīdgrupu**, rodas **glukonskābes**, kuru nosaukumus veido, pievienojot monosaharīda nosaukumam izskaņu *-onskābe*. Tās veido cikliskos esterus, reaģējot ar monosaharīda hidroksilgrupu. Stabili ir pieclocekļu vai sešlocekļu cikliskie esteri, kurus sauc par **laktoniem**.

Oksidējot monosaharīda **tālāko pirmējo oglekļa atomu**, rodas **uronskābes**, kuru nosaukumus veido, pievienojot monosaharīda nosaukumam izskaņu *-uronskābe*.

Oksidējot gan aldehīda grupu, gan **pirmējo oglekļa atomu**, rodas glikārskābes (cukurskābes), kuru nosaukumus veido, pievienojot monosaharīda nosaukumam izskaņu *-ārskābe*. Arī tās, tāpat kā glikonskābes, veido pieclocekļu vai sešlocekļu cikliskos esterus – laktonus.



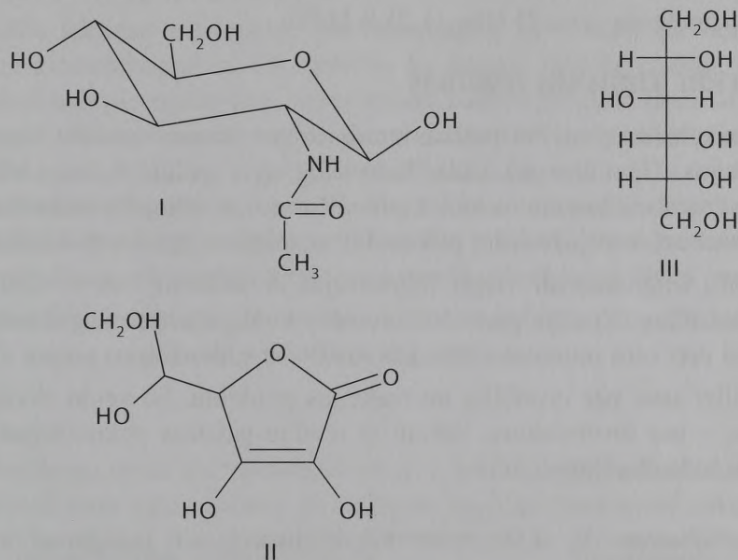
5.22. att. Glikozes oksidācijas produkti

**I** – D-glikono- $\delta$ -laktons (glikonskābes  $\delta$ -laktons), **II** – D-glikāro- $\delta$ -laktons (glikārskābes- $\delta$ -laktons), **III** –  $\beta$ -D-glikopiranozouronskābe ( $\beta$ -glikuronskābe), **IV** – D-glikāro- $\gamma$ ,  $\delta$ -bilaktons (glikārskābes  $\gamma$ ,  $\delta$ -dilaktons jeb cukurskābes dilaktons)

Hidroksilgrupas pie 2. oglekļa atoma aizvietošana ar aminogrupu dod **aminocukurus**, kuru nosaukumu veido, vispirms norādot hidroksilgrupas iztrūkumu ar *2-deoksi-* un aminogrupu ar *2-amino-*, kam seko monosaharīda nosaukums. Populārs ir saīsinātais nosaukums, kurā norāda anomēro formu, kam seko monosaharīda nosaukums, kuram galotnes vietā pievieno *-amīns*, piemēram,  $\beta$ -glikozamīns. Aminogrupas slāpekļa atoms var būt acilēts. Visbiežāk dabā sastopami aminocukuri, kuri acetilēti vai sulfurēti.

Monosaharīda L-gulozes atvasinājums ir L-askorbīnskābe, kas pazīstama ar nosaukumu C vitamīns, kas cilvēkiem, pērtiņiem un jūras cūciņām ir jāuzņem, jo nesintezējas organismā.

Monosaharīda karbonilgrupas reducēšanas rezultātā veidojas polioli, kuru nosaukumus veido, pievienojot monosaharīda nosaukuma saknei izskaņu *-itols*, piemēram, mannitols. Glikozes reducēšanas produktam ir triviālais nosaukums sorbitols. To izmanto diabētiķu pārtikas saldināšanai, jo tas organismā netiek izmantots.



5.23. att. Glikozes hidroksilgrupas aizvietošanas ar aminogrupu, reducēšanas un mikrobioloģiskas oksidācijas produkti

I – 2-N-acetilamino- $\beta$ -D-glikopiranoze ( $\beta$ -N-acetilglikozamīns), II – L-askorbīnskābe, III – D-glikozitols (sorbitols)

## 5.6. Oligosaharīdi

Oligosaharīdi ir mazmolekulāri, līdz 10 monosaharīdu atlikumus saturoši polimēri. Vienkāršākie oligosaharīdu pārstāvji ir disaharīdi.

Disaharīdos divi monosaharīdi saistīti ar glikozīdisko saiti, un tai var būt gan  $\alpha$ , gan  $\beta$  anomērā konfigurācija. Ja disaharīdā saglabājusies otra monosaharīda glikozīdā hidroksilgrupa, izveidojas reducējošs disaharīds. Ja savstarpēji reaģē abas glikozīdiskās hidroksilgrupas, tad izveidojas nereducējošs disaharīds.

Ja pie viena monosaharīda neglikozīdām hidroksilgrupām ar savām glikozīdām grupām saistīti divi vai vairāki monosaharīdi, tad veidojas sazarots oligosaharīds.

Oligosaharīdu nosaukumus veido:

- reducējošiem oligosaharīdam, kas ar savu glikozīdisko (anomēro) hidroksilgrupu veido glikozīdisko saiti, nomainot monosaharīda nosaukumā izskaņu *-oze* uz *-ozil*, pirms šī monosaharīda norāda atoma simbolu, kurš veido glikozīdisko saiti (O, N vai S). Aiz nosaukuma iekavās norāda oglekļa atomu numurus abos monosaharīdos, starp kuriem

veidojas glikozīdiskā saite, pirmo norādot anomēro atomu. Starp cipariem parasti liek svītriņu vai bultiņu, kas vērsta prom no anomērā oglekļa. Beigās nosauc monosaharīdu, kura glikozīdā grupa ir nesaistīta, piemēram, O-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-α-D-glikopiranoze;

- nereducējošo monosaharīdu atšķirība ir tā, ka nosaukums beidzas ar -ozīds, piemēram, saharoze ir O-α-D-glikopiranozil-β-D-fruktofuranozīds. Sazarota nereducējoša oligosaharīda nosaukuma beigās parasti izvēlas to monosaharīdu, kas saistīts ar vairākiem citiem monosaharīdiem, analogi rīkojas organiskajā ķīmijā, veidojot savienojumu nosaukumus pēc IUPAC nomenklatūras.

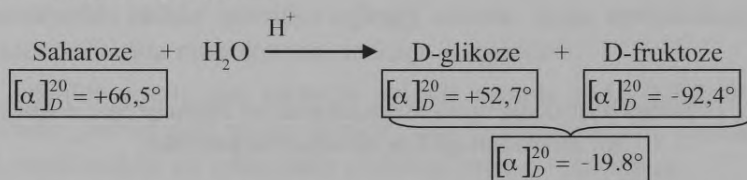
Struktūras attēlošanai bieži izmanto saīsinājumus no monosaharīdu nosaukuma pirmajiem trim burtiem, un furanozes vai piranozes ciklu attiecīgi norāda ar f vai p, kuru uzskatāmībai var novietot kā indeksu (apakšrakstu). Piemēram, laktozes abu anomēru apzīmējums ir O-β-D-Gal<sub>p</sub>-(1→4)-D-Glc<sub>p</sub> un saharozes apzīmējums: O-α-D-Glc<sub>p</sub>-(1-2)-β-D-Fru<sub>p</sub>.

### 5.6.1. Oligosaharīdu ķīmiskās īpašības

Oligosaharīdu fizikālās un ķīmiskās īpašības ir radniecīgas monosaharīdiem, izņemot nereducējošos oligosaharīdu pārstāvjus. Tiem nav glikozīdās hidroksilgrupas un līdz ar to tai raksturīgās reakcijas, ieskaitot iespēju atvērties ciklam un veidot karbonilformu ar sekojošu reducēšanos, oksidēšanos, mutototāciju. Tiem nav arī iespējas veidot glikozīdus ar spirtiem, amīniem vai tioliem.

Būdami glikozīdi, oligosaharīdi viegli hidrolizējas ar skābēm, bet ir relatīvi stabili bāziskā vidē. Enzimātiskā hidrolīze ir jutīga pret C-1 anomēro konfigurāciju un glikozilgrupu, bet samērā nespecifiska attiecībā pret otru monosaharīdu, kas saistīts ar glikozīdisko grupu.

Saharozes hidrolīzi sauc par inversiju, un reakcijas produktu, ko veido ekvimolārs glikozes un fruktozes maisījums, – par invertcukuru, sakarā ar pretēju gaismas polarizācijas plaknes griešanas virzienu saharozē un hidrolīzes produktā.



5.24. att. Gaismas polarizācijas plaknes griešanas maiņa saharozes hidrolīzē

Interesanti ir ciklodekstrīni, ko iegūst, iedarbojoties uz maltodekstrīniem, kas veidojas nepilnīgā cietes hidrolīzē ar enzīmu ciklomaltodekstrīnu glikanotransferāzi, kuru izdala no baktērijām. Šis enzīms šķēļ α-1-4-glikozīdās saites un pārnēs glikozilgrupu uz maltodekstrīna nereducējošo galu, veidojot 6–12 glikopiranozes saturošus cikliskos oligosaharīdus. Šajā reakcijā dominējošais produkts ir ciklodekstrīns ar 7 glikozes atlikumiem. Ciklodekstrīna piranožu hidrofobie cikli veido cilindra sienu, kuru no ārpusē noklāj polārās pirmējā spirta CH<sub>2</sub>OH grupas, bet no iekšpuses – C-2 hidroksilgrupas. Cilindra iekšpuses ūdens molekulas viegli var aizvietoties ar stēriski atbilstošiem nepolāriem savienojumiem, kas pasargā tos no ķīmiskas vai bioķīmiskas ietekmes. Ciklodekstrīnus izmanto pārtikas pārstrādē vitamīnu stabilizācijai un rūgtvielu garšas samazināšanai.

### 5.6.2. Maltoze

Maltozi [4-O-(α-D-glikopiranozil)D-glikopiranozi jeb 4-O-(α-D-glikopiranozīdo)D-glikopiranozi] sauc arī par iesala cukuru, jo tā veidojas dīgstošos graudos (arī iesalā) enzīmu katalizētas cietes hidrolīzes rezultātā. Līdzīgi tas notiek ar cieti saturošiem produktiem cilvēka organismā, tiem sašķeļoties α-amilāzes iedarbībā, kura katalizē cietes α-glikozīdisko saišu hidrolīzi.

Maltoze veidota no divām glikozes molekulām, pie tam vienas glikozes C-1 atoms ar  $\alpha$ -glikozīdisko saiti ir saistīts ar otras glikozes C-4 atomu, tādējādi glikozīdā grupa pie otras glikozes saglabājas, un maltozei ir monosaharīdiem raksturīgās īpašības.

Maltozes konformāciju kristāliskā stāvoklī un aprotonos šķīdinātājos stabilizē ūdeņraža saite starp glikozīda daļas C-2 un glikozes daļas C-3 hidroksilgrupām. Ūdens šķīdumos ūdeņraža saite veidojas starp  $\text{CH}_2\text{OH}$  grupu glikozīda daļā un C-3 hidroksilgrupu glikozes daļā.

### 5.6.3. Laktoze

Laktoze [4-O-( $\beta$ -D-galaktopiranozil) D-glikopiranoze jeb 4-O-( $\beta$ -D-galaktopiranozīdo)D-glikopiranoze] jeb piena cukurs ir sievietes un citu zīdītāju piena galvenais ogļhidrāts. Sievietes pienā laktoze ir aptuveni 7%. Laktozē galaktozes C-1 atoms ar  $\beta$ -glikozīdisko saiti saistīts ar glikozes C-4 atomu, tāpēc arī laktoze ir reducējošs cukurs.

Ar laktozi saistīta laktozes intolerance jeb nepanesība, kas raksturīga lielākajai daļai Zemes iedzīvotāju, izņemot ziemeļeiropiešus. Tā izpaužas kā laktozi šķeloša enzīma laktāzes izdalīšanās pakāpeniska samazināšanās pieaugušajiem. Nesagremotā laktoze palielina zarnu satura osmomolaritāti, kas veicina ūdens izdalīšanos zarnās un to satura sašķidrināšanos. Nesagremoto laktozi zarnu mikroorganismi sadala par laktātu, oglekļa dioksīdu, ūdeņradi un metānu, kas rada uzpūšanos, kolikas, gāzu uzkrāšanos un caureju. Šo stāvokli var labot ar laktozi nesaturošu diētu vai pievienojot piena produktiem laktāzi, kas laktozi sašķeļ. Arī raudzētos piena produktos ir samazināts laktozes saturs, jo notikusi tās daļēja pārvēršana pienskābē, tāpēc rekomendē uzturā lietot šādus produktus.

Laktozes konformāciju kristāliskā stāvoklī un šķīdumos stabilizē ūdeņraža saite starp galaktozīda daļas cikla skābekļa atomu un glikozes C-3 hidroksilgrupu.

### 5.6.4. Saharoze

Saharozī [4-O-( $\alpha$ -D-glikopiranozil- $\beta$ -D-fruktofuranozīdo)  $\beta$ -D-fruktofuranozīdo] gandrīz tīrā veidā satur galda cukurs, un to iegūst no cukurbietēm vai cukurniedrēm. Dabīgais medus ir bišu siekalu enzīmu hidrolizēta nektāra saharoze ar glikozes fruktozes attiecību 1:1. Konditorejas rūpniecībā izmantotais invertcukurs arī ir saharozes hidrolīzes (ar enzīmu vai skābes palīdzību) produkts. Saharozē glikozes C-1 oglekļa atoms ar glikozīdisko saiti saistīts ar fruktozes C-2 atomu. Saharozē glikozei ir  $\alpha$ -anomērā un fruktozei  $\beta$ -anomērā forma, un tai nav brīvu glikozīdisko hidroksilgrupu. Saharoze ir visizplatītākais nereducējošais cukurs. Saharozes nereducējošās īpašības izmanto dzīvā daba. Augu lapās fotosintēzē veidojas glikoze, un tā ir jānogādā uz bumbuliem vai sēklām uzkrāšanai cietes formā. Lielī brīvās glikozes daudzumi var izraisīt nevēlamu tās karbonilgrupas reakciju ar pirmējām aminogrupām proteīnu lizīna atlikumos un ar citiem amīniem Majāra reakcijā, tāpēc glikozi pārvērš nereducējošā saharozē. Vienlaicīgi uz pusi samazinās arī transportējamās glikozes osmolaritāte.

Saharozes konformāciju stabilizē divas ūdeņraža saites: pirmā – starp fruktozes C-1 un glikozes C-2 hidroksilgrupām, otrā – starp fruktozes C-6 hidroksilgrupu un skābekli glikozes piranozes ciklā.

## 5.7. Polisaharīdi

Daudziem monosaharīdiem savienojoties ar glikozīdām saitēm, veidojas polisaharīdi. Parasti viena monosaharīda vienības anomērais oglekļa atoms veido glikozīdisko saiti ar nākošā monosaharīda vienības ceturto vai sesto oglekļa atomu, kā rezultātā polisaharīda ķēdes abi gali nav identiski. Vienā tās galā ir monosaharīds ar brīvu glikozīdisko hidroksilgrupu – reducējošais gals, bet otrs ir nereducējošais gals. Ja veidojas sazarots polisaharīds, tad tas satur vienu reducējošo un vairākus nereducējošos galus – pa vienam katra atzarojuma galā.

Polisaharīdi var veidoties no viena monosaharīda homopolisaharīdos vai dažādiem monosaharīdiem heteropolisaharīdos. Heteropolisaharīdos atšķirīgo monosaharīdu sakārtojums var būt periodisks

vai neperiodisks. Skābā vidē polisaharīdi pakāpeniski hidrolizējas līdz monosaharīdiem. Enzīmi ir specifiski attiecībā pret glikozīdisko saiti un monosaharīda atlikumu. Polisaharīdu nozīme dabā ir:

- struktūras veidotājas vielas (celuloze, hemicelulozes, pektīni augos un hitīns un glikozaminoglikāni dzīvniekos);
- uzkrātās enerģijas rezerves vielas (ciete, dekstrīni augos un glikogēns dzīvniekos);
- ūdeni saistošās vielas (agars, pektīns, algināts augos un glikozaminoglikāni dzīvniekos).

Polisaharīdu īpašības ietekmē gan to sastāvs, gan monomēru saistības veids un polimēra telpiskā struktūra. Lai gan individuālie polisaharīdi atšķiras, tomēr eksistē vairākas kopīgas iezīmes.

**Stingri lineāri polisaharīdi** (celuloze, amiloze) ir nešķīstoši vai grūti šķīstoši. Tie veido regulāri sakārtotas molekulu paketes ar izteiktu starpmolekulāru mijiedarbību daļēji kristāliskās struktūrās – kristalītos, tāpēc tos var izšķīdināt tikai bargos apstākļos, noārdot ūdeņraža saites ar sārmiem vai speciāliem šķīdinātājiem. Šādu struktūru nosaka tikai vienas optimālas struktūras veidošanās nosacījumi un polisaharīdu ķēžu hidroksilgrupu mijiedarbība.

**Sazarotie polisaharīdi** (amilopektīns, glikogēns) labāk šķīst ūdenī, un vienas un tās pašas koncentrācijas un molekulmasas šķīdumiem ir mazāka viskozitāte nekā to lineāriem pārstāvjiem. Sazarotā struktūra neļauj izveidoties izteiktai mijiedarbībai starp molekulām. Ja sazaroto polisaharīdu šķīdumus ietvaicē, tad tos viegli var rehidratēt. To šķīdumiem ir mazāka viskozitāte nekā lineāriem analogiem ar tādu pašu molekulmasu, jo garām diegveida molekulām, slīdot vienam šķīduma slānim gar otru, ir vairāk iespēju mijiedarboties, kamēr sazarotām molekulām to ir mazāk. Sazarotie polisaharīdi lielā koncentrācijā veido ķepīgas pastas, ar sānķēdēm savstarpējie iespīezoties citam citā, un tiem ir maza tieksme kristalizēties (izgulsnēties).

**Lineāri sazaroti polisaharīdi** ar garu centrālo ķēdi, kurai pievienoti īsi sānu atzarojumi (alkilceluloze). Garā ķēde izraisa lielu viskozitāti, kamēr īsās sānķēdes to vājina. Tas veicina labu šķīdību un ātru rehidratāciju, kā arī šķīdumu stabilitāti pret kristalizēšanos pat lielā koncentrācijā.

**Polisaharīdi ar karboksilgrupām** (pektīns, algināts, karboksimetilceluloze) ir ar ļoti labu šķīdību bāziskā vidē, kurā tie veido sāļus. Negatīvi lādētās karboksilgrupas veicina molekulu savstarpējo atgrūšanos. Šķīdumiem ir liela viskozitāte, kas atkarīga no pH. Izgulsnēšanās vai gela veidošanās notiek pie  $\text{pH} \leq 3$  sakarā ar elektrostatiskās atgrūšanās izbeigšanos anjonu protonēšanās dēļ un karboksilgrupu dimerizēšanos ar ūdeņraža tiltiņiem.

**Polisaharīdi ar stipri skābām grupām** (sērskābes, fosforskābes) furcellarānos, karagenānā labi šķīst ūdenī un veido ļoti viskozus gelus, un līdzīgi polisaharīdiem ar karboksilgrupām tie stabilizējas stipri skābā vidē.

**Modificētie polisaharīdi.** Lineāriem polisaharīdiem, pievienojot neitrālus sāna atzarojumus, pieaug šķīdība ūdenī, šķīdumu stabilitāte un viskozitāte, piemēram, metilceluložu, etilceluložu vai karboksietilceluložu gadījumā. Alkilgrupu neliels skaits samazina mijiedarbību starp polisaharīdu ķēdēm, kas veicina nemodificēto daļu atvieglotu hidratāciju. Palielinoties alkilgrupu skaitam, pastiprinās to hidrofobais efekts, tāpēc palielinās šķīdība organiskos šķīdinātājos. Skābo grupu pievienošana izraisa skābiem polisaharīdiem raksturīgos iepriekš apskatītos efektus. Modificētie polisaharīdi, kas satur jonizētas grupas, ļoti viegli šķīst ūdenī un veido viskozus šķīdumus. Viskozitāte ir atkarīga no pH, ja skābes grupa ir karboksilgrupa.

### 5.7.1. Ciete un glikogēns

Ciete augos veidojas amiloplastos granulu veidā. Granulu diametrs ir 2–150  $\mu\text{m}$  ar dažādu diametra un formas sadalījumu. Augu rezerves polisaharīdu cieti veido amiloze, kurā glikozes vienības saistītas ar 1-4- $\alpha$ -glikozīdiskām saitēm, un amilopektīns, kura sazaroto struktūras lineāro posmu veido glikozes vienības, kas saistītas ar 1-4- $\alpha$ -glikozīdiskām saitēm, un atzarojumi, kurus ar pamatķēdi vieno 1-6- $\alpha$ -glikozīdiskā saite. Katram atzarojumam savukārt var būt citi atzarojumi, kā rezultātā veidojas sazarota struktūra ar lielu molekulmasu. Katrs nākamais atzarojums vidēji ir ik

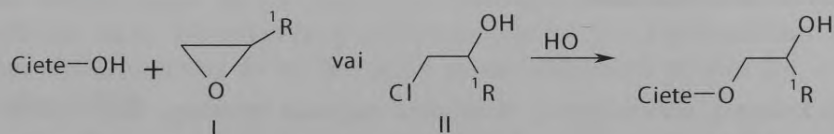
pēc 18 glikozes atlikumiem. Sazarotai struktūrai ir būtiska fizioloģiska nozīme, jo polisaharīda ķēdes augšana un pakāpeniska noārdīšanās sākas no nereducējošā gala, kas sazarotam polimēram nodrošina ātru molekulas lieluma izmaiņu atbildē uz auga biokīmiskajām vajadzībām. Cietes granula bez amilozes un amilopektīna nelielos daudzumos satur proteīnus un lipīdus. Cietes granulā polisaharīdi ir ar salīdzinoši augstu sakārtoības pakāpi. Apmēram 30% cietes granulu ir kristāliskā, bet pārējās – amorfā stāvoklī, par ko liecina rentgenstaru difrakcijas aina. Amorfā daļa satur lielākoties amilozi, bet kristāliskajos iecirkņos galvenokārt izvietots amilopektīns. Cietes granulas suspendējot aukstā ūdenī, tās piebriest par 30–40%. Ja šo suspensiju uzkaršē, noteiktā temperatūrā 50–70 °C robežās notiek neatgriezeniskas izmaiņas, kuras raksturīgas katram cietes tipam. Šo temperatūru sauc par želatinēšanās temperatūru. Želatinējoties cietes granula spēj absorbēt 20...40 reizi lielāku ūdens masu un piebriest, kā rezultātā palielinās suspensijas viskozitāte. Želatinēšanās gaitā daļa amilozes difundē no granulas ūdenī. Želatinēšanās sākuma fāzē cietes kristalīti kūst un veido polimēru tīklu, kurš sabrūk augstākā temperatūrā (ap 100 °C), veidojot amilozes un amilopektīna šķīdumu. Želatinēšanās norise ir atkarīga no cietes botāniskās izcelsmes, temperatūras un ūdens satura suspensijā. Ja cietes ūdens suspensiju ilgāk iztur temperatūrā, kura ir zem želatinēšanās temperatūras, tad želatinēšanās temperatūra palielinās sakarā ar granulas struktūras pārstrukturizēšanos.

Amilozes gēliem raksturīga neatgriezeniska pāreja no stipri uzbrieduša stāvokļa nešķīstošā, sarukušā, mikrokristāliskā stāvoklī. To var panākt arī, lēni atdzesējot cietes pastu.

Cieti plaši izmanto par biezinātāju un saistītāju pārtikas tehnoloģijā, par izejvielu cietes un glikozes sīrupa ražošanai, par aizsargslāni žāvētiem augļiem, aizsardzībai no oksidēšanās, cietes plēves izmanto iepakojumam.

Amilozes un amilopektīna īpašības var mērķtiecīgi izmainīt ar fizikālu vai ķīmisku iedarbību, lai iegūtu konkrētam lietojumam vēlamas īpašības. Šajā nolūkā izmanto mehānisku malšanu vai spiediena iedarbību uz cieti ar dažādu ūdens saturu, lai palielinātu cietes amorfo daļu, uzbriešanu ūdenī, fermentējamību un samazinātu želatinēšanās temperatūru.

Cieti ar nelielu ūdens saturu (<15%) neliela daudzuma skābes vai bāzes katalizatora klātienē karsējot 100–200 °C temperatūrā, notiek tās intensīva sadalīšanās, veidojot dekstrīnus (daļējas hidrolīzes produktus), kurus izmanto par līmvielu saldumos vai par tauku aizstājējiem. Cietes suspensijas reakcijā ar etilēna vai propilēna oksīdu, vai epihlorhidrīnu var iegūt cietes ēterus ar dažādu aizvietošanās pakāpi no 0,1 līdz 1 mol (glikozes mols)<sup>-1</sup>. Hidroksilgrupas aizvietošana palielina cietes uzbriešanu, šķīdību, viskozu šķīdumu stabilitāti sasaldētā stāvoklī un samazina želatinēšanās temperatūru.

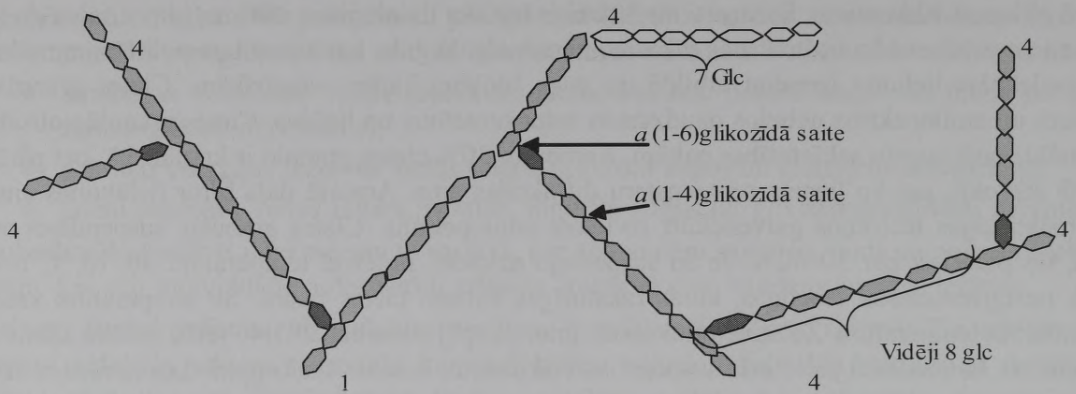


#### 5.25. att. Cietes ēteru veidošanās reakcijā ar epoksīdiem (I) vai epihlorhidrīniem (II)

Cietes reakcijā ar monohloretilskābi bāzes klātienē veidojas karboksimetilciete, kas ļoti labi šķīst pat aukstā ūdenī.

Cietes hidroksilgrupas esterificējot ar reaģētspējīgiem karbonskābes vai fosforskābes atvasinājumiem, iegūst produktus ar labākām želatinēšanās spējām. Cietes reakcijā ar polifunkcionāliem savienojumiem tās molēkulās izveidojas šķērseniskās saites, kas palielina cietes želatinēšanās temperatūru, stabilitāti pret skābu vidi un berzi, bet samazina uzbriešanu. Cietes oksidēšana ar hipohlorītu samazina tās gelu duļķošanu.

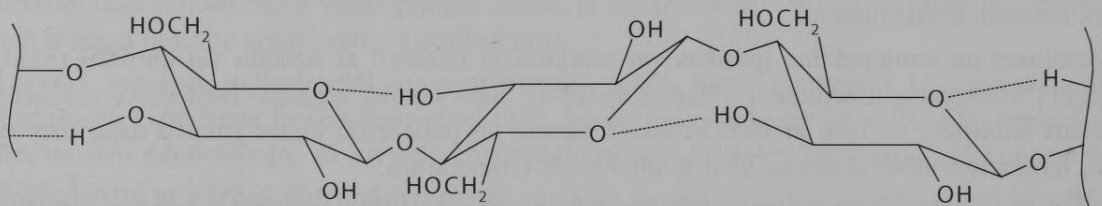
Amilopektīna analogs – glikogēns atrodams dzīvnieku organismā, kur tas izpilda analogas funkcijas. Glikogēns ir vēl vairāk sazarota molekula. Amilozes molekulas augšana vai pakāpeniska noārdīšanās sākas tikai no viena gala, tāpēc ir par vairākām kārtām lēnāka. Visvairāk glikogēna (līdz 5%) ir aknās, mazāk tā ir muskuļos – līdz 1%.



5.26. att. Glikogēna fragmenta struktūra

## 5.7.2. Celuloze

Celuloze ir visvairāk izplatītais polisaharīds. Augos tai ir struktūras veidotāja nozīme, kas nodrošina lielu mehānisko izturību. Koksnē atkarībā no sugas tās saturs ir 50–70%. Gandrīz tīra celuloze ir kokvilna. Celulozi veido  $\beta$ -Dp-glikopiranoze, kurā 2500–12000 glikozes atlikumi saistīti ar  $\beta$ -glikozīdiskām saitēm, sasniedzot 400 000–1 000 000 daltonu molekulasmasu.  $\beta$ -konformācija nodrošina celulozes molekulas gandrīz pilnīgi lineāru struktūru.

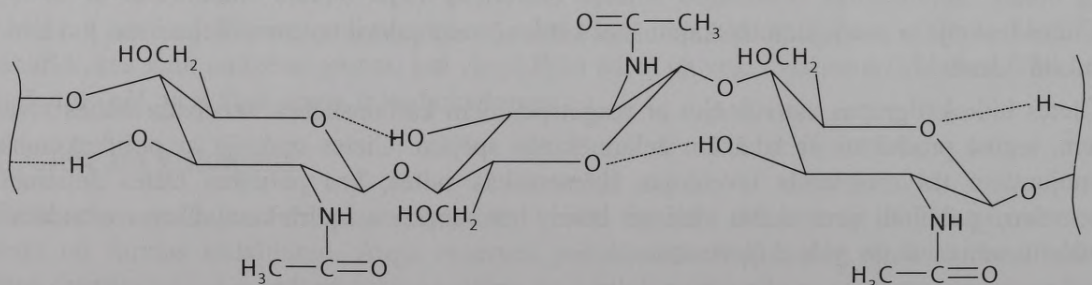


5.27. att. Celulozes fragments

Celulozes molekulas sapakotas kūļos, veidojot celulozes šķiedras, kurās atsevišķas molekulas saista ūdeņraža saites. Šāds sakārtojums nodrošina lielu mehānisko izturību, nešķīšanu ūdenī un ķīmisko inertumu. Celulozi nespēj šķelt dzīvnieku fermenti. Atgremotāju priekškuņģa mikroflora izdala celulāzi, kura pakāpeniski noārda celulozi. Celuloze cilvēkam ir vajadzīga kā balastviela normālas gremošanas nodrošināšanai.

## 5.7.3. Hitīns

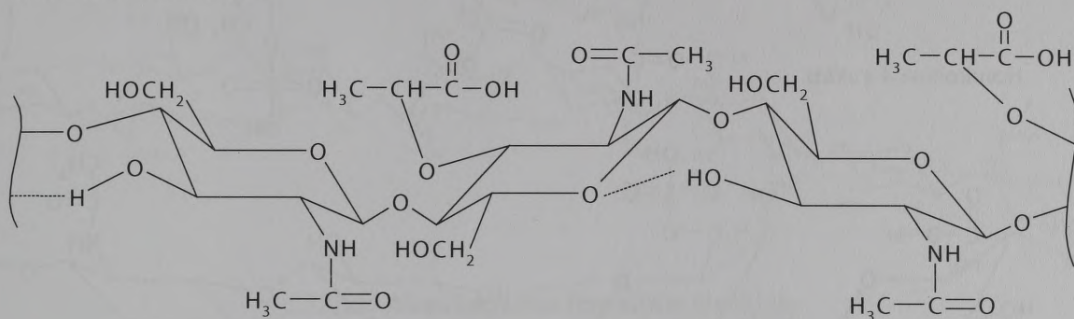
Hitīns veido kukaiņu, vēžveidīgo un dažu sēņu ragveida apvalkus. Tas veidots no N-acetil- $\beta$ -D-glikozamīna un izpilda atbalsta un mehāniskās funkcijas kukaiņos un vēžveidīgajos. Arī hitīna molekula līdzīgi celulozei veido garas un lineāras ķēdes.



5.28. att. Hitīna fragments

### 5.7.4. Muramīns

Muramīns ir baktēriju šūnas sienīgas polisaharīds. Tā nosaukums veidojies no latīniskā *murus* 'siena'. Nesazaroto muramīna ķēdi veido secīgi sakārtoti N-acetilglikozamīna un N-acetilmurāmskābes atlikumi. Pēdējo veido glikozamīns, kuram 3. oglekļa atoms ar ētera saiti saistīts ar pienskābi. Muramīna funkcionālā un strukturālā organizācija analoga celulozei un hiīnam, ko nodrošina  $\beta$ -(1-4)-glikozīdiskā saite.



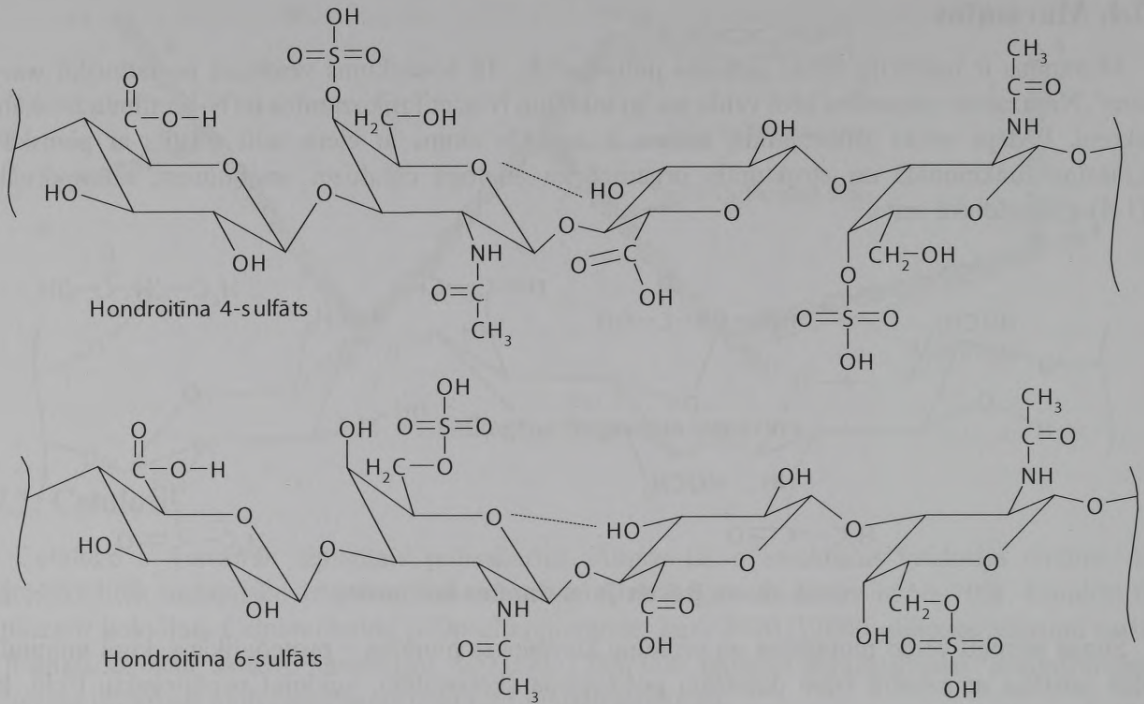
5.29. att. Baktēriju muramīna fragments

Šūnas sienīgu veido muramīna un proteīnu komplekss mureīns – proteoglikāns, kurā muramīna ķēdes saistītas ar samērā īsām daudzām polipeptīda šķērssaitēm, veidojot nepārtrauktu tīklu, kas noklāj baktēriju.

### 5.7.5. Saistaudu polisaharīdi

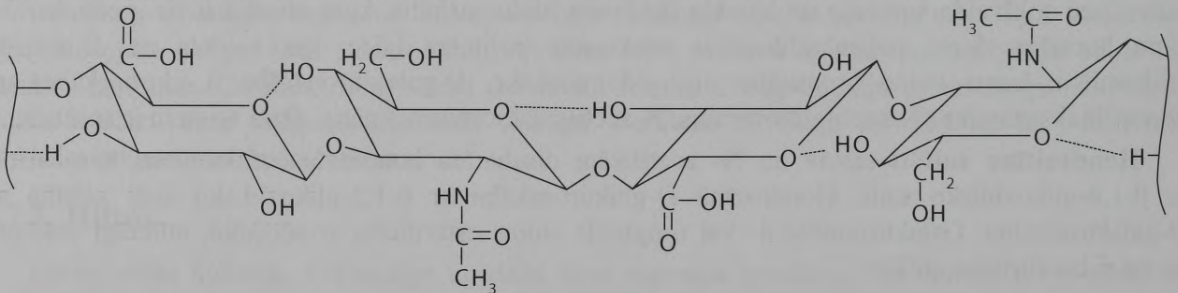
Saistaudi satopami visos dzīvnieka ķermeņa audos (ādā, skrimšļos, kaulos, cīpslās, locekļu šķidrums, radzenē, lielo asinsvadu sienīgās u. c.), nodrošinot izturību, elastību, saistību un nepieļauj svešas dzīvības iekļūšanu. Saistaudu polisaharīdi jeb skābie glikozaminoglikāni (mukopolisaharīdi) ar glikozīdisko saiti saistīti ar proteīniem, veidojot proteoglikānus, kuru lielāko daļu veido ogļhidrāti. Vairāk izpētītie saistaudu polisaharīdi ir: ādas, skrimšļu un cīpslu hondroitīna sulfāti; skrimšļu, nabas saites, acu stiklveida ķermeņa un locekļu šķidrums hialuronskābe, kura vienīgā ir tīrs polisaharīds; aknu heparīns. Šiem polisaharīdiem ir nesazarota polimēra ķēde, kas veidota no disaharīdu atlikumiem, kurus veido uronskābes: (D-glikuronskābe, D-galakturonskābe, L-iduronskābe) un N-acetilheksozamīna (N-acetilglikozamīns, N-acetilgalaktozamīns) pāris. Daži no tiem ir sulfurēti.

**Hondroitīna sulfāti** sastāv no N-acetilētām disaharīda hondrozīna atlikumiem, kas saistīti ar  $\beta$ -1,4-glikozīdisko saiti. Hondrozīnā D-glukuronskābe ar  $\beta$ -1,3-glikozīdisko saiti saistīta ar D-galaktozamīnu. Galaktozamīna 4- vai 6-oglekļa atoms esterificēts ar sērskābi, attiecīgi veidojot 4- vai 6-hondroitīna sulfātu.



Polimēra molekulmasa ir 10000–60000 daltonu. Hondroitīna sulfāti audos vienmēr ir kompleksā ar olbaltumvielām. Hondroitīna sulfāta reducējošajā galā ir tetrasaharīds GlcUA-Gal-Gal-Ksi-, kas saistīts ar polipeptīda ķēdes serīna vai treonīna atlikuma hidroksilgrupu, veidojot proteoglikānu, jo polipeptīda ķēdē serīns atkārtojas daudzkārt.

**Hialuronāti** (hialuronskābe) veidoti no disaharīdiem, kas savstarpēji savienoti ar  $\beta$ -1,4-saitēm. Disaharīdā D-glukuronskābe ar  $\beta$ -1,3-glikozīdisko saiti saistīta ar D-glikozamīnu.

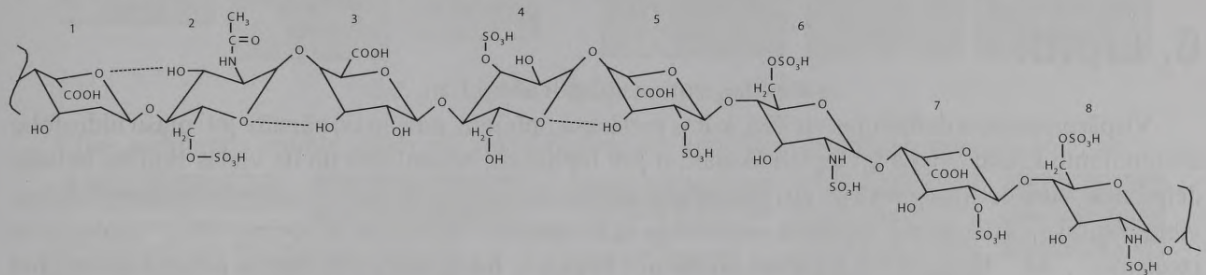


Hialuronskābei ir ļoti liela molekulmasa  $2-7 \times 10^6$ , tās ūdens šķīdumiem raksturīga liela viskozitāte, kas nodrošina barjerfunkciju pret svešu mikroorganismu nonākšanu organismā. Hialuronskābe kopā ar hondroitīna sulfātu proteoglikāniem veido augstāk organizētus proteoglikānu kompleksus. Pēc ārējās līdzības tie atgādina egles zaru, kura centrālo daļu veido hialuronskābe, pie kuras kā skuju adatas perpendikulāri ik pēc 10 monosaharīda atlikumiem novietotas hondroitīna sulfāta proteoglikāna subdaļiņas. Gan hondroitīna sulfāti, gan hialuronskābe satur jonizēties spējīgās karboksilgrupas un hondroitīna sērskābes grupas, kas saista kālija un nātrija katjonus. Gan anjonās, gan katjonās grupas adsorbē ūdens molekulas, veidojot hidratācijas apvalku, kā rezultātā organismā veidojas ūdens rezerves.

**Heparīns** (grieķu *hepar* – aknas) ir saistaudu proteoglikāns, kam piemīt antikoagulanta un hipolipidēmiska iedarbība. Dabīgā heparīnā garas polisaharīda ķēdes saistītas pie olbaltumvielas ar

trisaharīda fragmentu – Gal→Gal→Ksi→, kurā ksiloze ar glikozīdisko saiti saistīta pie serīna vai treonīna hidroksilgrupas.

Heparīna polisaharīda ķēdes veidotas no secīgi sakārtotām  $\alpha$ -D-glikozamīna un ar 1→4 glikozīdisko saiti saistītām uronskābes molekulām. Lielākajā daļā glikozamīna molekulu amīna grupa un hidroksilgrupa 6-stāvoklī ir sulfurētas, un tikai neliela daļa aminogrupu ir acetilētas. Uronskābes sastāvā ir  $\alpha$ -L-iduronskābe, lielākoties 2-sulfāta formā.



5.32. att. Aknu heparīna fragmenta struktūra

Heparīna bioloģisko aktivitāti nodrošina tā spēja specifiski saistīties ar antitrombīnu III, kas ievērojami palielina tā inhibējošo ietekmi uz asinis sarecinošo trombīnu un citām proteāzēm. Lai notiktu specifiskā heparīna saistīšanās ar antitrombīnu III, nepieciešama noteikta monosaharīdu kombinācija pietiekami garos polisaharīda posmos. Aktīvam antikoagulācijas centram atbilst secība posmā 2-6, kurā 3, 4 un 5 ir minorie molekulas komponenti. Heparīns audos veidojas specializētās, tā sauktajās taukajās šūnās. Heparīna preparātus izmanto ķirurģijā ilgstošās operācijās ar mākslīgo asins cirkulāciju, pēcoperācijas trombožu novēršanai, miokarda infarkta un aterosklerozes ārstēšanā u. c.

5.1. tabula

#### Monosaharīdi un to veidotās glikozīdās saites dabīgos disaharīdos un polisaharīdos

Ogļhidrāta nosaukums	Monosaharīdu struktūrvienības		Glikozīdās saites veids			
	D-glikopiranoze vai tās analogi	Citi monosaharīdi vai to atvasinājumi				
Disaharīdi						
Maltoze	Glikoze	Nav	$\alpha$ -1,4			
Celobioze	Glikoze	Nav	$\beta$ -1,4			
Laktoze	Glikoze	Galaktoze	$\beta$ -1,4			
Saharoze	Glikoze	Fruktoze	$\alpha,\beta$ -1,2			
Polisaharīdi						
Ciete:						
Amiloze	Glikoze	Nav	$\alpha$ -1,4			
Amilopektīns	Glikoze	Nav	$\alpha$ -1,4	$\alpha$ -1,6		
Glikogēns	Glikoze	Nav	$\alpha$ -1,4	$\alpha$ -1,6		
Dekstrāni	Glikoze	Nav	$\alpha$ -1,4	$\alpha$ -1,6	$\alpha$ -1,3	$\alpha$ -1,2
Celuloze	Glikoze	Nav	$\beta$ -1,4			
Hitīns	N-acetilglikozamīns	Nav	$\beta$ -1,4			
Muramīns	N-acetilglikozamīns, N-acetilglikozamīna pienskābes ēteris	Nav	$\beta$ -1,4			
Hialuronāts	N-acetilglikozamīns, glukouronskābe	Nav	$\beta$ -1,4	$\beta$ -1,3		
Hondroitīna sulfāti	Glukuronskābe	N-acetilgalaktozamīns	$\beta$ -1,4	$\beta$ -1,3		
Heparīns	Glikozamīna sulfāts, glukouronskābe	L-iduronskābe	$\alpha$ -1,3	$\beta$ -1,4		

#### 5.7.6. Asinsgrupu noteicošo vielu oligosaharīdi

Uz eritrocītu virsmas esošie glikoproteīni piešķir grupas specifiskumu, kas jāņem vērā, pārlejot asinis. Tajos 15% no sastāva ir aminoskābes un 85% – ogļhidrāti. Proteīnu daļa bagāta

ar hidroksiaminoskābēm: serīnu, treonīnu un hidroksiprolīnu. Asinsgrupas vielu ogļhidrāti satur monosaharīdus un to atvasinājumus, un tie atšķiras pēc kvantitatīvās attiecības. Visbiežāk sastopami N-acetil-D-glikozamīns, D-galaktoze, L-fukoze. Asinsgrupas vielu specifiskums saistīts ar polisaharīda nereducējošā gala beigu monosaharīda atlikumiem. Pie garas polipeptīdu ķēdes ir pievienotas līdz 55 ogļhidrātu ķēdēm, kuras vidēji satur 21–23 monosaharīda atlikumus.

## 6. Lipīdi

Vispārpieņemtas definīcijas vielām, kuras pieskaita lipīdiem, nav, jo tie pārstāv ļoti plašu hidrofobu savienojumu klāstu. Viena no izplatītākajām ir ļoti izplūdušī, nekonkrētā un uz vielas šķīdību balstītā definīcija, kurā ietilpst gandrīz visi šai grupai atbilstošie savienojumi: “Lipīdi ir taukiem līdzīgas vielas, kuras nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskos šķīdinātājos.” Ja definīcijā ievieto frāzi: “bioloģiskas izcelsmes”, tad: “**lipīdi ir bioloģiskas izcelsmes taukiem līdzīgas vielas, kuras nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskos šķīdinātājos**”. P. D. Gunstons iesaka par lipīdiem uzskatīt “savienojumus, kurus veido taukskābes vai tām radniecīgas vielas, kā atbilstošie spirti uz sfingozīna bāzes”, bet šī lipīdu definīcija neaptver visus savienojumus.

Lipīdi izpilda vairākas svarīgas cilvēka organisma funkcijas: membrānu struktūrelementu funkcijas, aizsargfunkcijas, enerģijas rezerves, bioķīmisko regulatoru, koenzīmu u. c. funkcijas.

### 6.1. Lipīdu klasifikācija

Eksistē dažādas lipīdu klasifikācijas shēmas. Ilustrācijai 6.1.–6.3. att. dotas trīs no tām. 6.1. att. klasifikācija pamatojas uz lipīdu spēju hidrolizēties.

#### Lipīdu iedalījums

##### Hidrolizējamie

###### Nepolārie (neamfipātiskie)

1. Holesterīna esteri
2. Vaski
3. Poliolu esteri  
[Glicerīna (glicerola) esteri]
- Cietie tauki
- Augu eļļas

###### Polārie (amfipātiskie)

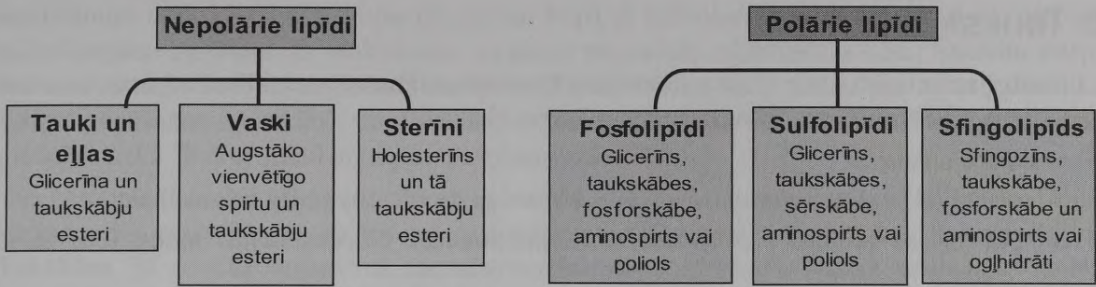
1. Diacilglicerīna glikozīdi
2. Fosfolipīdi  
Anjonie  
Ilīda tipa  
Plazmogēni
3. Sfingolipīdi  
Ceramīdi  
Sfingomielīni  
Cerebrozīdi  
Gangliozīdi
4. Sulfolipīdi

##### Nehidrolizējamie

1. **Taukos šķīstošie vitamīni**  
A, D, E,  
F (neaiztājamās taukskābes),  
Q
2. **Taukos šķīstošo vitamīnu provitamīni**  
Karatīni A vitamīnam  
Ergosterīns D<sub>2</sub> vitamīnam  
7-dehidrokalciferols D<sub>3</sub> vit.
3. **Holesterīns**
4. **Holesterīna atvasinājumi**  
Žultsskābes  
Steroīdie hormoni
5. **Terpēni**  
Ēteriskās eļļas  
Sveķskābes
6. **(Taukskābes)**

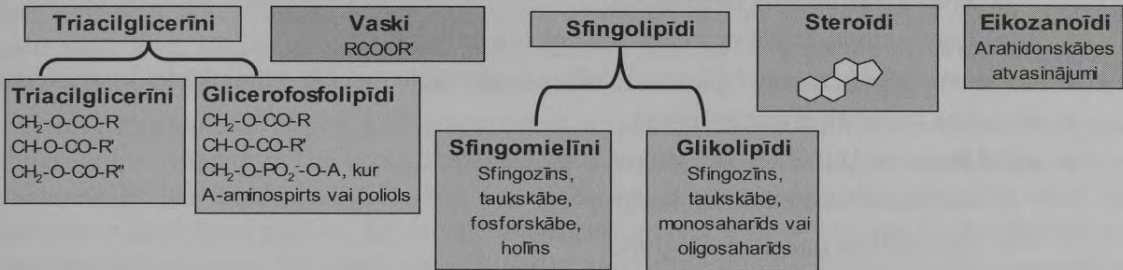
#### 6.1. att. Lipīdu klasifikācija

Viens no iedalījumu veidiem ir iedalīt lipīdus pēc polaritātes (6.2. att).



6.2. att. Lipīdu iedalījums pēc polaritātes

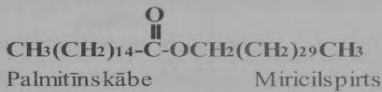
Citos gadījumos lipīdus iedala pēc raksturīgākajiem kopējiem struktūrelementiem (6.3. att.).



6.3. att. Lipīdu iedalījums pēc raksturīgiem struktūrelementiem

No organiskās ķīmijas viedokļa lipīdus var uzskatīt par karbonskābju (taukskābju) esteriem vai amīdiem:

- **Vaski** ir taukskābju un spirtu esteri, kuriem ir nesazarotas, garas oglekļa atomu ķēdes saturoši radikāļi.



- **Triacilglicerīni** (tauki un eļļas) ir glicerīna un taukskābju triesteri. Organismā tie ir svarīgi enerģijas avotiem.
- **Glicerofosfolipīdi** ir glicerīna triesteri, kuros ar glicerīnu saistīti divi taukskābju atlikumi, bet trešā glicerīna hidroksilgrupa fosforilēta, un fosfāta grupa esterificēta ar aminospirtu vai poliolu.
- **Sfingomielīni** ir 18 oglekļa atomus saturoša aminospirta – **sfingozīna** un taukskābes amīdi, kuros sfingozīna galējā spirta hidroksilgrupa ir fosforilēta, fosfāta grupa savukārt veido esteri ar aminospirtu – holīnu.
- **Glikolipīdi** ir 18 oglekļa atomus saturoša aminospirta – **sfingozīna** un taukskābes amīdi, kuros sfingozīna galējai spirta hidroksilgrupai ar glikozīdisko saiti pievienoti ogļhidrāti (monosaharīdi vai sarežģītas struktūras oligosaharīdi, kuru sastāvā ietilpst arī sialskābe).
- **Holesterīna esteri** ir stereoīdu un taukskābju esteri, parasti veido holesterīna transporta formu.


Lipīdu grupas, kas nav ne esteri, ne amīdi:

- Stereoīdi ir **holesterīns** un daži tā atvasinājumi.
- **Eikozanoīdi** ir 20 oglekļa atomus un četras divkāršās saites saturošas taukskābes – arahidonskābes specifiskas oksidācijas un ciklizācijas produkti ar ļoti izteiktu fizioloģisko aktivitāti – hormonoīdi: **prostoglandīni**, **tromboksāni** un **leikotriēni**, kas atšķirībā no hormoniem sintezējas visās šūnās no fosfolipīdu sastāvā esošās arahidonskābes.
- **Taukos šķīstošie vitamīni** – A, D, E, Q vitamīni un neaizstājamās taukskābes.

## 6.2. Taukskābes

Hidrolizējamie lipīdi satur vienu vai vairākas taukskābes. Parasti taukskābes ir garas, nesazarotas un pāra skaita oglekļa atomu virknes saturošas karbonskābes.

Taukskābes iedala:

- pēc oglekļa atomu skaita: īsās (C4–C10) un garās (C>10) ķēdes taukskābes;
- pēc piesātinājuma: piesātinātās un nepiesātinātās. Nepiesātinātās taukskābes savukārt iedala:
  - mononepiesātinātās jeb monoēnu taukskābes;
  - ar metilēngrupu atdalītas polinepiesātinātās jeb poliēnu taukskābes;
  - konjugētās poliēnu taukskābes;
  - transkonfigurācijas monoēnu vai poliēnu taukskābes;
- sazarotas oglekļa atomu ķēdes taukskābes (taukskābju oglekļa atomu ķēdei ir atzarojumi);
- cikliskās taukskābes (satur ciklus);
- oglekļa atomu ķēdē skābekli saturošas taukskābes:
  - hidroksilētās (satur hidroksilgrupu);
  - epoksidētās (satur epoksigrupu  $\begin{matrix} -\text{CH}-\text{CH}- \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{matrix}$ );
  - furanizētās (satur furāna  nepiesātinātu vai piesātinātu ciklu);
- sēru saturošas (satur sēra atomu dažādās oksidācijas pakāpēs).

6.1. tabula

### Izplatītākās taukskābes

Apzīmējums	Formula	Triviālais nosaukums	Divkāršās saites vieta
4:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Sviestskābe	Nav
6:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Kaprnskābe	Nav
16:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	Palmitīnskābe	Nav
18:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	Stearīnskābe	Nav
18:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Oleīnskābe	9
18:2	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Linolskābe	9,12
18:3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Linolēnskābe	9,12,15
20:4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Arahidonskābe	5,8,11,14

Piesātinātajām taukskābēm 14:0–24:0 visbiežāk ir pāra skaits oglekļa atomu. Mikroorganismi satur arī ievērojamus daudzumus taukskābju ar nepāra oglekļa atomu skaitu, kā arī ar sazarotu oglekļa atomu virkni. Atzarojumu lielākoties veido metilgrupa.

Oglekļa atomu numerāciju taukskābēs izdara secībā no karboksilgrupas gala. Lai izvairītos no pārpratumiem, dažreiz pirms oglekļa atomu numuriem novieto Δ, piemēram, linolskābe – 18:2 Δ9,12. Lieto arī pretēju numerācijas secību, kad numerāciju sāk no beigu CH<sub>3</sub> grupas, tad pirms oglekļa atomu numuriem obligāti jāuzrāda ω, piemēram, linolskābe 18:2 ω6, 9. Šī numerācijas kārtība saistīta ar polinepiesātināto taukskābju bioķīmisko lomu.

### 6.2.1. Taukskābju fizikālās īpašības

Taukskābes veido dimērus to kristāliskajā režģī. Istabas temperatūrā piesātinātu taukskābju ķēžu oglekļa atomi viens pret otru izvietoti zigzaga veidā atbilstoši *trans* stāvoklim, un tikai līdz vienai ceturtdaļai molekulu ir enerģētiski mazāk izdevīgā skrūves veida konformācijā. Nepiesātināto taukskābju *cis* konfigurācijas divkāršās saites nosaka stingru locījumu divkāršās saites vietā.

Kristalizējoties taukskābes novietojas pa pāriem kopā ar karboksilgrupām. Savukārt šie pāri saistās ar hidrofobajiem ogļūdeņraža atlikumiem, veidojot periodiski atkārtotošos ķēdi. Saistību starp šīm ķēdēm nodrošina hidrofobās mijiedarbības spēki. Tāpēc kušanas temperatūra pieaug ar oglekļa atomu skaita palielināšanos taukskābē. Taukskābēm ar pāra skaita oglekļa atomiem ir augstāka kušanas temperatūra nekā "lieku" metilēngrupu saturošām taukskābēm.

Nepiesātinātās taukskābes satur vienu vai vairākas divkāršās saites ar *cis* konfigurāciju. Vairākas divkāršās saites saturošās taukskābes sauc par **polinepiesātinātām taukskābēm** jeb **neaizstājamām taukskābēm**, jo cilvēka organismā tās nesintezējas, tāpēc jāuzņem gatavā veidā. Tās sintezējas augos. Nepiesātinātām karbonskābēm ir zemāka kušana temperatūra nekā attiecīgām piesātinātām karbonskābēm, un tā pazeminās līdz ar divkāršo saišu skaita palielināšanos. Divkāršā saite, kas atrodas tuvāk taukskābes vidum, ietekmē kušanas temperatūras pazemināšanos vairāk, nekā tuvāk galam novietotā saite. Taisnas ķēdes taukskābes veido aduktus ar urīnvielu, kas veido kristālus ar kanālu vidū, kurā ievietojas taukskābes ķēde. Jebkura novirze no nesazarotas struktūras samazina adukta stabilitāti  $18:0 > 18:1 > 18:2$ . Tas ļauj atdalīt sazarotas ķēdes taukskābes no nesazarotām.

Garas ķēdes taukskābes praktiski nešķīst ūdenī, un kausējums veido plēvi virs ūdens, kurā polārās karboksilgrupas vērstas uz ūdens pusi. Šķīdība ūdenī pieaug ar oglekļa atomu skaita samazināšanos, un sviestskābe jau ir ūdenī šķīstoša (ap 6 g 1000 mL ūdens). Taukskābes labi šķīst ēterī, jo tā molekulas ir pietiekami polāras, lai solvatētu karboksilgrupas. Pilnīgi nepolāri šķīdinātāji neder par taukskābju šķīdinātājiem. Divkāršās saites palielina taukskābju šķīdību, ko var izmantot nepiesātināto taukskābju atdalīšanai no piesātinātām.

## 6.2.2. Taukskābju ķīmiskās īpašības

Taukskābju gāzu hromatogrāfijas analīzei nozīmīga ir taukskābju esteru iegūšana. Metilesterus no taukskābēm iegūst to reakcijā ar diazometānu vai metiljodīdu. Lipīdu analīzē taukskābju metilesterus iegūst triacilglicerīnu transesterifikācijā ar metilspirtu bāziska katalizatora klātienē.

Nepiesātinātām taukskābēm raksturīgas pievienošanas reakcijas. Nepiesātināto saišu satura noteikšanai izmanto joda bromīda reakciju ar taukskābēm vai to glicerīna esteriem.

Polinepiesātinātās taukskābes divkāršās saites viena pret otru novietotas labilā alilstāvoklī, kas viegli pārvēršas konjugētā sistēmā bāzu klātienē, ko var izmantot polinepiesātināto taukskābju identifikācijā, jo konjugētiem diēniem, triēniem vai tetraēniem ir atšķirīgi maksimālās absorbcijas viļņu garumi.

Šķidrums hromatogrāfijā izmanto divkāršo saišu  $\pi$ -elektronu sistēmas spēju veidot  $\pi$ -kompleksus ar sudraba joniem.

Niķeļa un citu katalizatoru klātienē notiek divkāršo saišu hidrogenēšana. Šie katalizatori izraisa arī konjugēto divkāršo saišu viedošanos polinepiesātinātās taukskābēs.

## 6.2.3. Dabīgie taukskābju esteri

Taukskābju esteri ar garu nesazarotu, piesātinātos oglekļa atomus saturošu spirtu ir **vaski**. Tie pasargā organismus no nevēlamas ūdens iedarbības. Īpatnējāka nozīme ir bišu vaskam, no kura bites veido šūnas medus glabāšanai un peru audzēšanai.

No visiem organisma lipīdiem galveno masu, ~95%, veido glicerīna un taukskābju esteri – **triacilglicerīdi**. Triacilglicerīdus bieži sauc arī par **triglicerīdiem**. Istabas temperatūrā dzīvnieku valsts triglicerīdi ir cieti (tauki), bet augu valsts triglicerīdi – šķidri (eļļas). To kušanas temperatūras atšķirības nosaka piesātināto un nepiesātināto taukskābju attiecība – jo vairāk nepiesātināto taukskābju, jo zemāka triglicerīda kušanas temperatūra. Tauki un eļļas nav individuālas vielas, bet gan dažādu taukskābju esteru maisījums. Tauku kušanas temperatūru ietekmē taukskābju sastāvs un izvietojums triacilglicerīda molekulā. Glicerīna mono-, di- un triacilatvasinājumiem piemīt kristālais polimorfisms – tie kristalizējas dažādās modifikācijās, kuras atšķiras ar kušanas temperatūru.

## Dažu tauku un eļļu taukskābju saturs

Avots	Piesātinātās taukskābes, %				Nepiesātinātās taukskābes, %	
	C12 Laurīnskābe	C14 Miristīnskābe	C16 Palmitīnskābe	C18 Stearīnskābe	C18:1 Oleīnskābe	C18:2 Linolskābe
<b>Dzīvnieku tauki</b>						
Cūku tauki	-	1	25	15	50	6
Sviests	2	10	25	10	25	5
Cilvēka tauki	1	3	25	8	46	10
Vaļu trāns	-	8	12	3	35	10
<b>Augu eļļas</b>						
Kukurūzas	-	1	8	4	46	42
Olīvu	-	1	5	5	83	7
Zemesriekstu	-	-	7	5	60	20
Sojas	-	-	7	4	34	53

Piesātināto taukskābju ogļūdeņražu atlikumu lokanās ķēdes ar vienādiem valences leņķiem starp oglekļa atomiem ļauj tām sakārtoties cita citai cieši blakus, veidojot kristāliskas struktūras. Nepiesātinātās taukskābes pazemina tiacilglicerīnu kušanas temperatūru, jo tām ir zemāka kušanas temperatūra, piemēram, stearīnskābei (C18:0) tā ir +70 °C, bet oleīnskābei – tikai 4 °C, bet divas divkārsās saites saturošai linolskābei –5 °C, kas izskaidrojams ar divkārsās saites stingo *cis*-struktūru, kas neļauj taukskābes molekulai iegūt taisnu formu un veidot regulārus kristālus, jo divkārsās saites vietā veidojas izliekums.

Dzīvnieku tauki satur galvenokārt dažādu 40–60% piesātināto un 30–50% mononepiesātināto taukskābju maisījumu ar nelielu daudzumu polinepiesātināto taukskābju. Nepiesātinātām taukskābēm raksturīga *cis* jeb *Z* diastereomērā forma. Šķeltnadžu piens satur ievērojamu daudzumu nepiesātināto taukskābju ar *trans* struktūru. Izomerizēšanās no mazāk stabilās *cis* formas uz *trans* formu var notikt dažādu katalizatoru, UV starojuma vai radikāļu ietekmē. Pārtikā *trans* formas taukskābes uzskatāmas par kaitīgām, ja to saturs lipīdos ir vairāk par 10%.

Augu eļļas (tauki) mazāk satur dažādu piesātināto (10–20%) un vairāk nepiesātināto taukskābju. To saturs atkarīgs no augu sugas un augšanas apstākļiem. Olīveļļā no visām taukskābēm 79% ir oleīnskābe, bet saulespuķu eļļā 75% veido linolskābe.

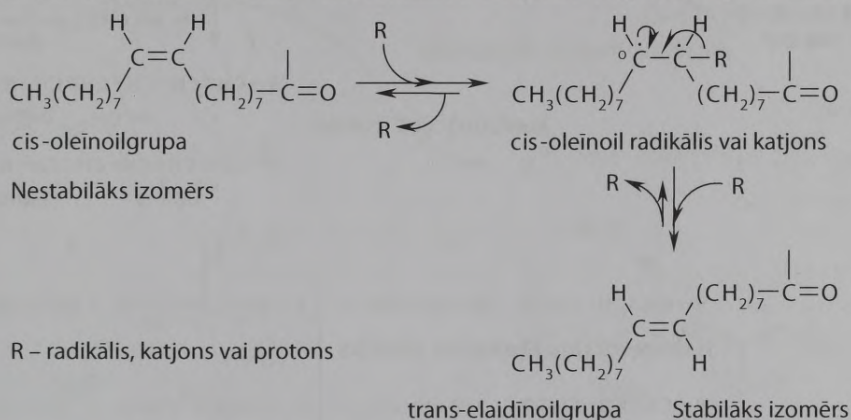
Tauku un eļļas hidrolīzē bāziskā vidē veidojas taukskābju sāļi – ziepes. Sārnu metālu ziepes ir ūdenī šķīstošas, bet vairākvērtīgo metālu ziepes nešķīst, piemēram, kalcija ziepes, kas veidojas arī apmaiņas reakcijā, mazgājot ar ziepēm cietā ūdenī. Ziepju mazgāšanas īpašības izskaidrojamas ar to molekulu abu galu ļoti atšķirīgām īpašībām, proti, negatīvi lādētā karboksilgupa cenšas mijiedarboties ar polārām ūdens molekulām, t. i., izšķīst tajā, kamēr hidrofobais ogļūdeņraža atlikums tiecas mijiedarboties ar nepolāru vai mazpolāru vidi. Šo divu pretējo īpašību dēļ ziepju molekulas pievelk abas vides. Ja ziepes izšķīdina ūdenī, to hidrofobās grupas cenšas sakļauties kopā, izveidojot molekulu kopu, kuras centru veido hidrofobās grupas, radot nepolāru vidi, bet negatīvi lādētie karboksilānioni vērsti uz ārpusi – ūdeni. Izveidojušos sfēriskos ziepju molekulu kopojumus sauc par **micellām**. Ja uz auduma, ko veido polāras celulozes vai proteīna šķiedras, ir ūdenī nešķīstoši traipi – tauki vai eļļa –, tad ziepju nepolārie ogļūdeņraža atlikumi izšķīst tajos, bet karboksilāta anioni nokļāj virsmu, padarot to polāru, un tauku daļiņa ar tajā izšķīdušajām ziepju molekulām atdalās no šķiedras.

Elektrofilī reagenti, kuri satur tukšu orbitāli, var pievienoties taukskābju divkārsšajai saitei. Izveidojies karbkatjons pievieno reagenta nukleofilo komponenti. Tā notiek ūdens pievienošana taukskābju bioķīmiskajā oksidācijā ar hidroksitaukskābju veidošanos, halogēnu un ūdeņraža pievienošana.

Ūdeņraža pievienošanu izmanto cieto tauku iegūšanā no augu eļļām, jo piesātinātām taukskābēm ir augstāka kušanas temperatūra. Margarīna un cieto cepamo augu tauku ražošanā izmanto augu eļļas, kuras ar ūdeņradi metāla katalizatora klātbūtnē hidrogenē (piesātina divkārsšās saites). Parasti

hidrogenē aptuveni 1/3 divkāršo saišu, tāpēc margarīnu var uzsmērēt pat tūlīt pēc izņemšanas no ledusskapja. Kontrolējot eļļu hidrogenēšanas pakāpi, iespējams iegūt hidrogenēto tauku vēlamu konsistenci. Izvēloties katalizatoru un citus reakcijas apstākļus, jāņem vērā izomerizēšanās iespējamība atlikušajās divkāršajās saitēs.

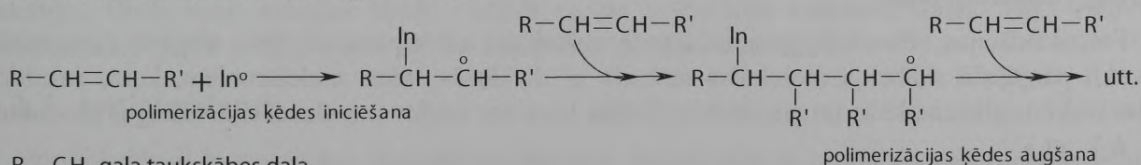
Tauku hidrogenēšana rada arī iespējamus draudus cilvēka organismam. Hidrogenēšanā izmantotie katalizatori ne tikai veicina ūdeņraža pievienošanas taukskābes dubultsaitei, bet arī katalizē mazāk stabilās dubultsaites *cis* struktūras pārvērtību stabilākā, tāpēc enerģētiski izdevīgākajā *trans* struktūrā (sk. 6.4. att.). *Trans* taukskābes “vaino” sirds slimību un ļaundabīgo audzēju izraisīšanā.



#### 6.4. att. Oleīnskābes acilgrupas izomerizēšanās par elaidīnskābi eļļu hidrogenēšanā

Halogēna pievienošanu izmanto analītiskiem mērķiem, nosakot joda skaitli, kas raksturo divkāršo saišu daudzumu taukos. Joda skaitlis ir joda daudzums g, ko pievieno 100 g tauku. Jo lielāks joda skaitlis, jo tauki satur vairāk neizstājamo taukskābju.

Augstas enerģijas starojums, radikāļi vai joni (gan katjoni, gan anjoni) var izraisīt taukskābju divkāršo saišu polimerizāciju. Jo lielāks joda skaitlis, jo lielāka polimerizācijas iespējamība. Polinepiesātinātās taukskābes var veidot telpisku polimēra režģi. Notiek eļļu cietēšana, ko izmanto laku un krāsu rūpniecībā. Polimerizācija notiek pēc ķēžu reakciju mehānisma (6.5. att.). Polimerizācija pārtikā ir nevēlama, jo polimerizējušies eļļa slikti asimilējas un tās starpprodukti, kas satur aktīvās daļiņas, var izraisīt nevēlamas pārvērtības šūnās.



R – CH<sub>3</sub> gala taukskābes daļa

R' – karboksilgrupas gala taukskābes daļa

° – aktīvais centrs (radikālis vai jons)

#### 6.5. att. Taukskābju polimerizācija

Polimerizācijas ķēdes apraušanos izraisa vai nu radikāļu rekombinācija vai pretjona pievienošana.

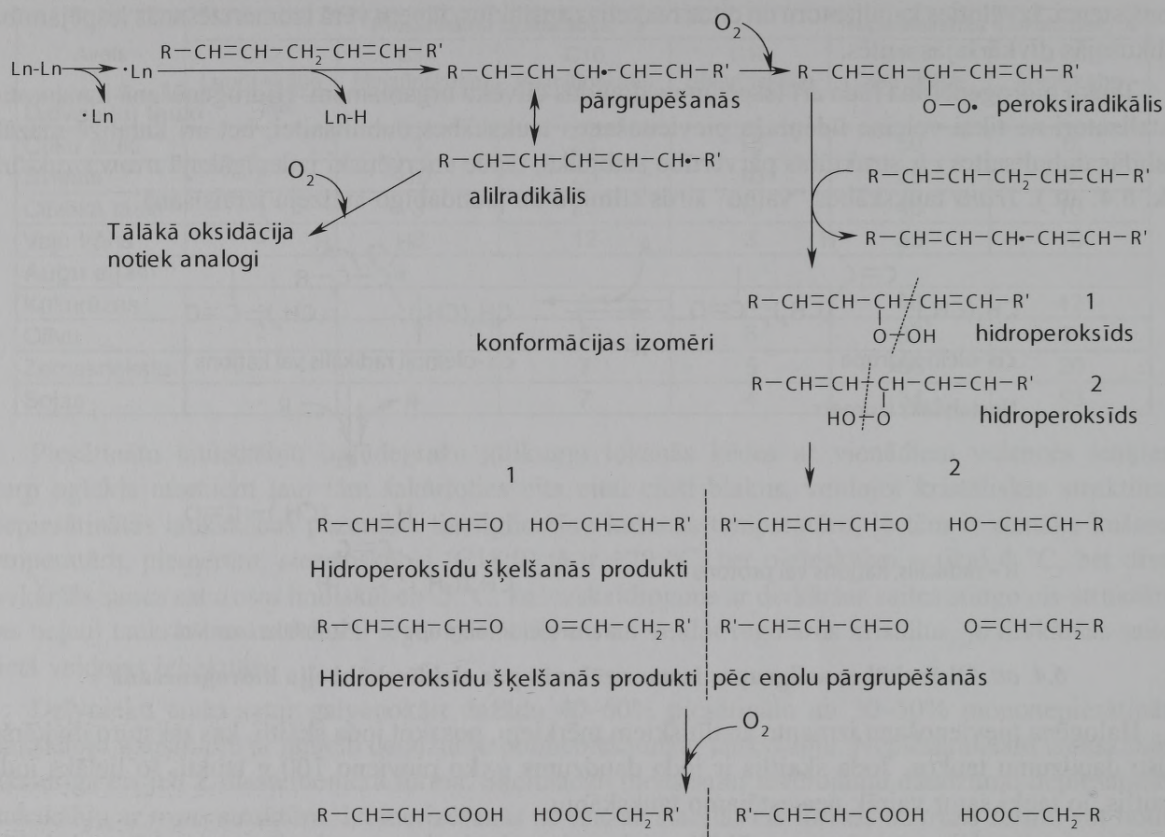
### 6.2.4. Taukskābju auto un fotooksidācija

**Taukskābju autooksidācija** ir nepiesātināto taukskābju, galvenokārt polinepiesātināto taukskābju, oksidācija ar gaisa skābekli.

#### 6.2.4.1. Autooksidācija

Autooksidācijas iemesls ir polinepiesātinātās taukskābes starp divām divkāršajām saitēm novietotās aktivētās metilēngrupas lielā reaģētspēja ar skābekli. Par oksidēšanās iniciatoru (In-In) kalpo metāla

jonu izraisīta peroksīdu un hidroperoksīdu sadalīšanās vai fotooksidēšanās. Autooksidēšanās ātrums pieaug līdz ar divkāršo saišu skaita palielināšanos rindā  $18:1 < 18:2 < 18:3$  kā  $1: 27: 77$ .



R – CH<sub>3</sub> gala taukskābe daļa

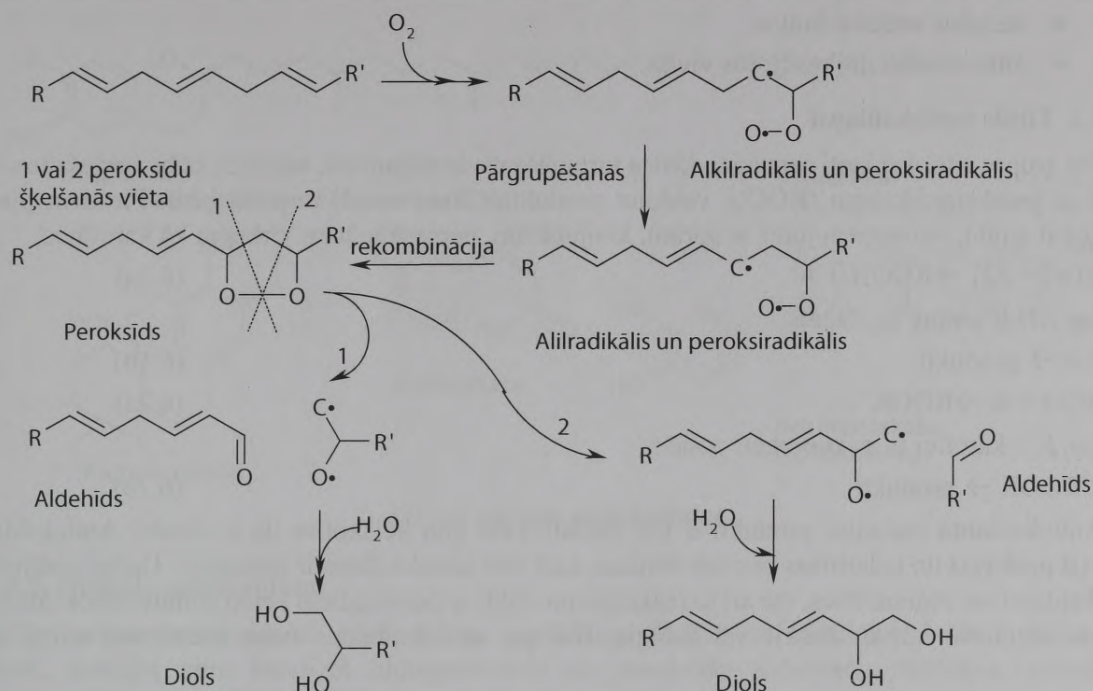
R' – karboksilgrupas gala taukskābes daļa

· – aktīvais centrs (radikālis)

#### 6.6. att. Linolskābes diēna grupas autooksidācijas shēma

##### 6.2.4.2. Fotooksidēšanās

Fotooksidācijas cēlonis ir gaismas fotona absorbcijā no tripleta stāvokļa singleta (ierosinātā) stāvoklī pārgājušā skābekļa molekulas reakcija ar divkāršās saites  $\pi$ -elektroniem, kuras rezultātā rodas jauktais alkilradikālis un peroksibiradikālis, kurš var veidot autooksidācijai līdzīgus produktus (sk. 6.7. att.)



6.7. att. Linolēnskābes triēna grupas fotooksidēšanās shēma

Tālākā fotooksidēšanās produktu (aldehīdu un diolu) oksidācija 6.7. attēlā nav apskatīta, jo iespējamā pirmējo oksidācijas produktu mijiedarbība ar tālākas oksidācijas starpproduktiem izraisa ļoti daudzu un dažādu produktu veidošanos. Fotooksidācija ir ļoti ātra, tai nav raksturīgs iniciācijas periods kā autooksidācijai. To neietekmē antioksidētāji, bet ietekmē singletā skābekļa ķērāji, piemēram, karotīns. Tā ir atkarīga no kopējā divkārsšo saišu skaita, bet ne no to skaita katras skābes molekulā, kā autooksidācijas gadījumā.

Gan autooksidācijas, gan fotooksidācijas gaitā radušies radikāļi izsauc divkārsšo saišu polimerizācijas reakcijas un pārgrupēšanās reakcijas, kas vēl vairāk sarežģī oksidācijas ainu.

Oksidācijas reakcijas skābes atlikumā var notikt gan ar brīvām taukskābēm, gan taukskābju esteriem. Bieži vien reakcijas lipīdu sastāvā esošās taukskābes atlikumā notiek lēnāk difūzijas ierobežojumu dēļ, it sevišķi cietos lipīdos ar izteikti kristālisku struktūru.

### 6.2.5. Antioksidanti

Antioksidanti ir vielas, kas aizkavē oksidēšanos. Aizsardzība ar antioksidantiem nepieciešama, lai aizkavētu to vielu oksidāciju, kuras ļoti viegli oksidējas ar skābekli. Dabīgie antioksidanti ir C un E vitamīni, A vitamīna provitamīns –  $\beta$  karotīns un selēna savienojumi. Šie savienojumi reaģē ar brīvajiem radikāļiem, starp kuriem ir ļoti reaģētspējīgs gais superoksīdjons  $\cdot\text{O}_2^-$  (skābekļa jonradikālis, kas satur negatīvo lādiņu un nesapāroto elektronu, tāpēc tam ir gan jona, gan radikāļa īpašības un ļoti liela reaģētspēja). Brīvie radikāļi ātri reaģē ar blakus esošiem savienojumiem, atraujot tiem elektronu, kas rada jaunu brīvo radikāli.

Antioksidants, atdodot elektronu, veido stabilu brīvo radikāli, kurš vairs nespēj turpināt radikālās reakcijas un rekombinējas ar citu radikāli, veidojot attiecībā pret oksidēšanos neitrālu molekulu.

Antioksidanti uzrāda arī pretvēža aktivitāti, jo, reaģējot ar brīvajiem radikāļiem, tie aizsargā gēnus no bojājumiem, kas varētu rasties brīvo radikāļu iedarbībā. Tāpēc vitamīni C, E un A provitamīns, kā arī selēns samazina ļaundabīgo audzēju un sirds slimību attīstības riskus.

Antioksidantus pēc to iedarbības rakstura uz oksidēšanās reakcijas mehānismu var iedalīt:

- tiešos antioksidantus, kas aprauj reakciju ķēdes;

- netiešos antioksidantos;
- citās oksidāciju kavējošās vielās.

### 6.2.5.1. Tiešie antioksidanti

Šīs grupas antioksidanti samazina ķēdes turpināšanās iespējamību, veicinot ķēžu apraušanos. Tie reaģē ar peroksiradikāļiem (ROO<sup>•</sup>), veidojot produktus, kuri nespēj turpināt ķēdi. Pie tiem pieder fenoli vai amīni, vai savienojumi ar garām, konjugētām, nepiesātinātām virknēm kā karotīnos.



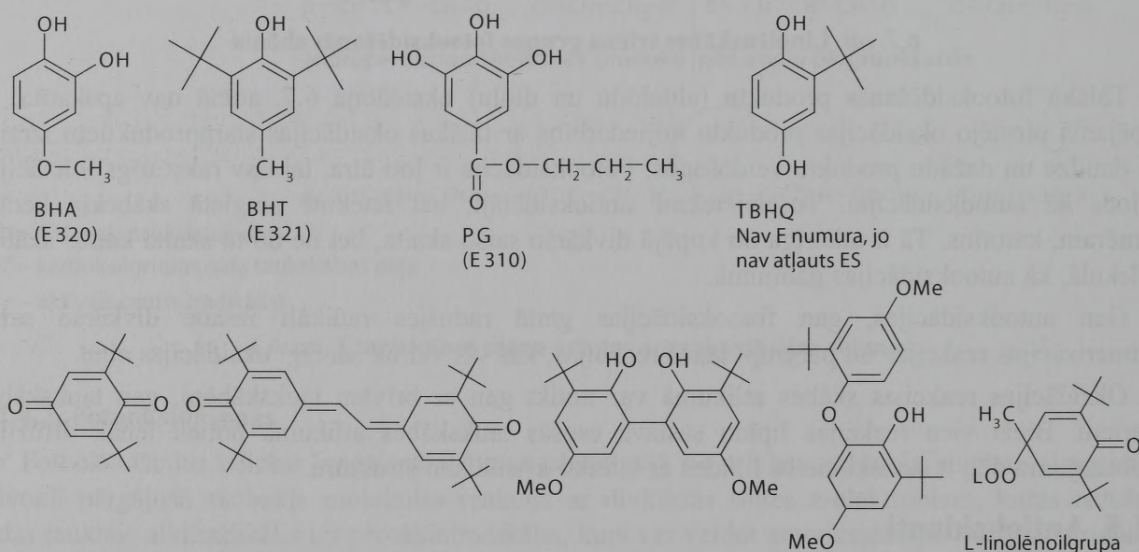
kur *AH* ir amīns vai fenols;



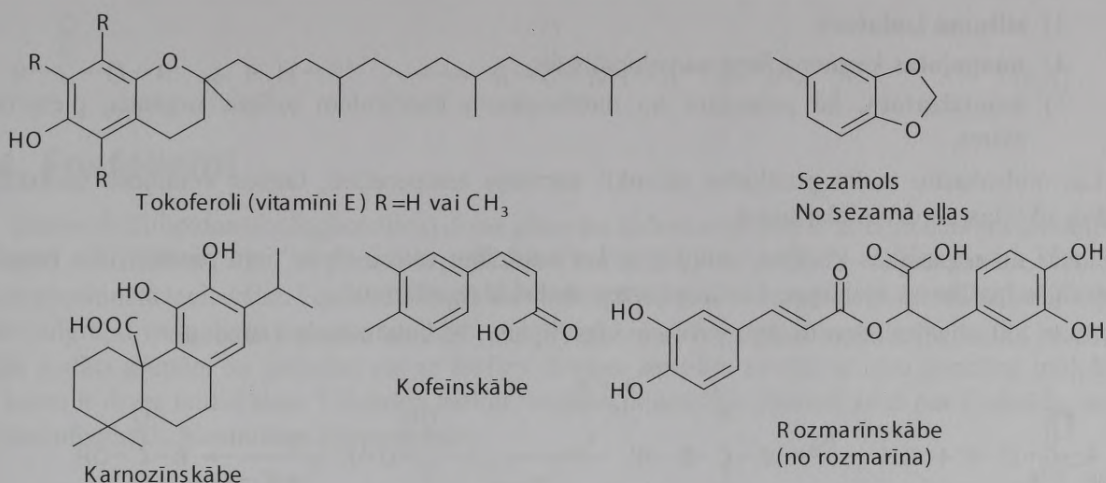
kur *K* – karotīni u. c. konjugēti poliēni;



Antioksidantu reakcijas produkti ir ļoti dažādi, kaut gan lielākoties tie ir dimēri. Antioksidanti reakcijā patērējas un iedarbības periods beidzas, kad viss antioksidants ir izreaģējis. Dažos gadījumos antioksidanti var reģenerēties, vai arī to reakcijas produkti ar peroksīdiem veido jaunus antioksidantus. Antioksidanti var būt sintētiskie vai dabīgie. Dabīgos antioksidantus satur, piemēram, mirte, tēja, auzas.



### 6.8. att. Sintētiskie antioksidanti un antioksidanta *tert*-butilēta hidroksianizola oksidācijas produkti



6.9. att. Dabīgie antioksidanti

### 6.2.5.2. Netiešie antioksidanti

Šīs grupas antioksidanti kavē ķēdes iniciēšanu, lielākoties, veidojot helātus ar metālu joniem, neļaujot tiem katalizēt hidroperoksīdu un peroksīdu sadalīšanu radikāļos, piemēram, etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA), citronskābe, fosforskābe, dažas aminoskābes.

### 6.2.5.2. Citas oksidāciju kavējošas vielas

Vitamīns C, reaģējot ar inhibēšanas reakcijā patērēto tokoferolu, to reģenerē. Lai pasargātu taukus, izmanto askorbīnskābes esterus ar taukskābēm, jo C vitamīns nešķīst taukos. Antioksidatīva darbība piemīt arī fosfolipīdiem.

Iepriekš apskatītie antioksidanti nespēj kavēt fotooksidāciju. To spēj kavēt poliēni, kas absorbē singletu (aktivēto) skābekli, piemēram, karotīni.

Neviens no antioksidantiem nespēj novērst oksidāciju un reģenerēt oksidētus lipīdus, tie tikai paildzina oksidācijas indukcijas periodu. Visefektīvāk antioksidanti darbojas oksidēšanas sākuma stadijā, tāpēc tie jāpievieno pēc iespējas agrāk.

Oksidāciju jācenšas aizkavēt, izslēdzot skābekļa klātieni (slāpekļa atmosfēra), uzglabājot tumsā un zemā temperatūrā, jāizslēdz kontakts ar dzelzi un vara joniem (5–10 mg/kg un pat mazāk) vai citiem metāliem.

## 6.3. Tauki un eļļas

Triacilglicerīni ir hidrofobas, nepolāras molekulas, kas nesatur lādētas grupas, tāpēc to molekulas ūdenī saplūst, veidojot tauku lodīti, kāda veidojas taukaudu šūnās zem ādas un vēdera dobumā. Tauki organismā veido enerģijas ieguvei nepieciešamās degvielas rezervi, pasargā iekšējos audus no zemas temperatūras iedarbības un mehāniskiem triecieniem, kā arī piedod organismam noapaļotākas formas, piemēram, sievietēm zemādas tauku kārtā labāk attīstīta, tāpēc salīdzinājumā ar vīriešiem tām ir mazāk stūrainu formu.

Tīri tauki un eļļas ir bezkrāsas vielas bez smakas un garšas. No augiem izdalītās eļļas satur piemaisījumus, kas piedod tām krāsu, garšu un smaržu.

Zīdītājiem 95% no kopējās lipīdu masas veido glicerīna un taukskābju esteri. To funkcijas ir:

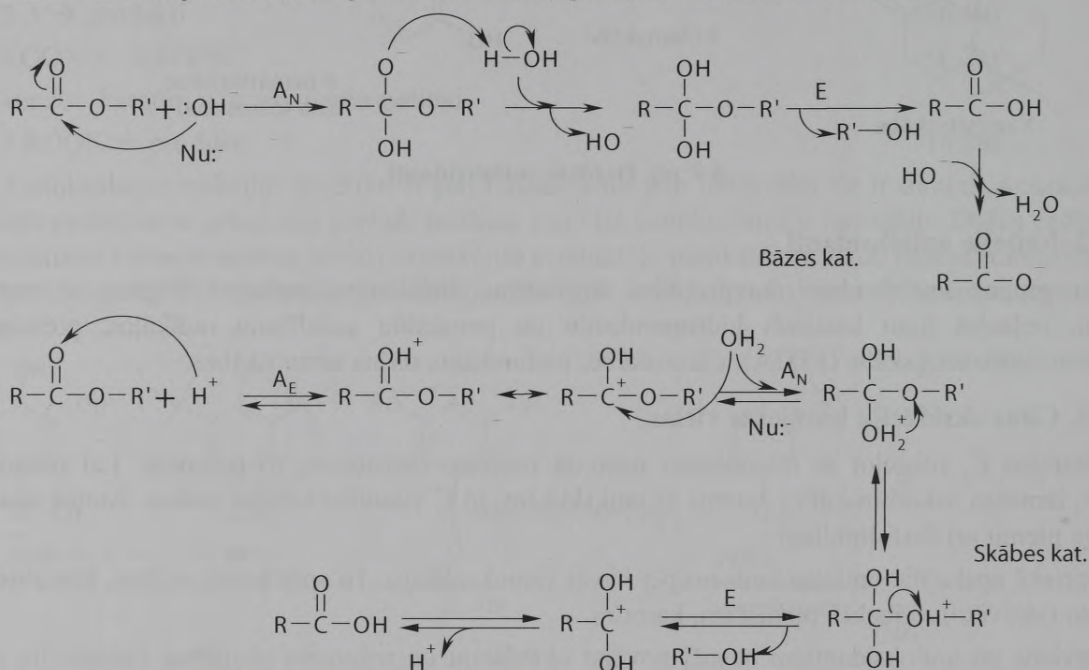
- 1) **enerģijas rezerve**, jo, taukiem bioķīmiski oksidējoties, rodas divas reizes vairāk lietderīgās enerģijas, nekā oksidējot ogļhidrātus vai olbaltumvielas;
- 2) **endogenā** (organismā izveidojušā) **ūdens avots**;

- 3) **siltuma izolators**;
- 4) **noapaļotas ķermeņa formas** veidotājs un
- 5) **amortizators**, lai pasargātu no mehāniskiem triecieniem jutīgus orgānus, piemēram, nieres.

Lai nodrošinātu tauku pusšķidru stāvokli ķermeņa temperatūrā, taukus veidojošo taukskābju sastāvs atkarīgs no dzīvnieka sugas.

Tauki no organiskās ķīmijas viedokļa ir karbonskābju esteri, tāpēc tiem piemīt visas esteriem raksturīgās īpašības + reakcijas, kas iespējamas taukskābes atlikumā.

Tauki hidrolizējas bāzu, skābju vai fermentu (lipāžu) kā katalizatoru klātbūtnē.



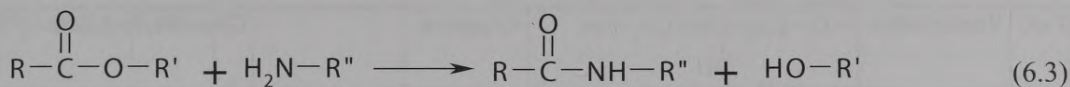
6.10. att. Lipīdu hidrolīze bāziskā un skābā vidē

Skābes katalizēta esteri (tauku) hidrolīze ir atgriezenisks process, kura virzību pa labi nodrošina entropijas palielinājums. Atkarībā no aktīvo centru veidojošām aminoskābēm ferments esteri hidrolīzi var katalizēt gan kā bāze, gan kā skābe.

Taukus hidrolizējot bāziskā vidē, rūpniecībā ražo ziepes. Tauku hidrolīzi ar sārmu izmanto pārziapošanās skaitļa noteikšanai. Tas ir KOH masa mg, kas nepieciešama 1 g tauku hidrolīzei. Jo garākas taukskābju ķēdes, jo zemāks pārziapošanās skaitlis.

Glicerīnu estera grupā var nomainīt ar kādu citu spirtu. Šo reakciju sauc par esteri alkoholīzi vai transesterifikāciju. Reakcija notiek analogi esteri hidrolīzei. Reakciju katalizē bāzes, skābes un lipāzes. Atšķirība tikai tā, ka ar karbonilgrupas oglekļa atomu reaģējošais nukleofila reāģents ir alkoholāta anjons bāzes katalīzes gadījumā vai spirts skābes katalīzes gadījumā. Lai nodrošinātu reakcijas vēlamu virzību, spirtam jābūt ievērojamā pārākumā. Šo reakciju rūpniecībā izmanto neitrālu mazgāšanas līdzekļu ražošanā un biodīzeļdegvielas ieguvei no augu eļļas, tauku ar specifiskām īpašībām ieguvei u. c. Līdzīga reakciju norise iespējama organismā un pārtikas taukos vai eļļās tajos esošo lipāžu ietekmē.

Organismā šo reakciju rezultātā var notikt patvaļīga brīvo aminogrupu acilēšana ar taukskābēm, reakcijas varbūtība palielinās, organismam novecojot. Pārtikas rūpniecībā to izmanto gan taukskābju amīdu, gan ar taukskābēm acilētu aminoskābju un polipeptīdu iegūšanai.



## 6.4. Fosfolipīdi

Glicerofosfolipīdos (fosfoglicerīdos) divas glicerīna hidroksilgrupas ir esterificētas ar taukskābēm, bet trešā – fosforilēta. Pie C-1 parasti ir piesātinātā taukskābe, bet pie C-2 – nepiesātinātā, visbiežāk polinepiesātinātā taukskābe. Fosforskābe glicerofosfolipīdos veido diesteri ar glicerīna un aminospirta hidroksilgrupu vai poliola (*mio*-inozitola vai glicerīna) hidroksilgrupu. Inozitols var veidot esterus ar citām fosfāta grupām un glicerīns var ar fosfāta diestera saiti būt saistīts ar otru glicerīna molekulu, pie kuras ir divas taukskābes. Glicerīna fosfāta un divu taukskābju diesteri sauc par fosfatīdu, un tas ir glicerofosfatīdu biosintēzes starpprodukts.

6.3. tabula

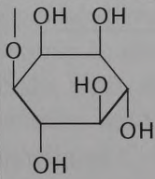
Fosfatīda esteru sastāvs

Aminospirts vai poliols	Glicerofosfatīda nosaukums	Funkcijas
Etanolamīns	Fosfatidiletanolamīns (kefalīns)	Membrānu lipīds
Holīns	Fosfatidilholīns (lecitīns)	Membrānu lipīds
Serīns	Fosfatidilserīns	Lielākoties membrānu lipīds, piedalās hormona signāla pārnese mehānismā šūnas membrānā, bagātīgi satopams smadzenēs
<i>mio</i> -inozitols	Fosfatidilinozitols	Membrānu lipīds, veido ar membrānas virsmu saistīto proteīnu "enkuru"
<i>mio</i> -inozitola 3,4-difosfāts	Fosfatidilinozitola difosfāts	<i>mio</i> -inozitola 1,3,4-trifosfāta veidotājs, kurš pārnes hormona signālu citoplazmā
Glicerīns	Fosfatidilglicerīns	Membrānu lipīds
Glicerīna fosfatīds	Bis-fosfatidilglicerīns	Membrānu lipīds, daudz sirdī, antigēna aktivitāte

Glicerofosfatīdi kopā ar proteīnu kazeīnu veido arī piena tauku lodīšu apvalkus, neļaujot tām saplūst. Glicerofosfatīdus izmanto par emulgētājiem daudzos pārtikas produktos, lai uzlabotu lipīdu uzsūkšanu. Lecitīni piedod olas dzeltenumam mazgājošas īpašības.

6.4. tabula

Uz glicerīna bāzēti lipīdi

$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \end{array}$	Ar fosfātu saistītā grupa	Šīs grupas nosaukums	Lipīda nosaukums
T.sk. T.sk. T.sk.			Tauki un eļļas
T.sk. T.sk.	Fosforskābe		Fosfatīds (lipīdu sintēzes starpprodukts)
T.sk. T.sk.	Fosforskābe	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Etanolamīns Etanolamīna fosfatīds (kefalīns)
T.sk. T.sk.	Fosforskābe	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Holīns (2-N,N,N-trimetilamonija etanols) Holīna fosfatīds (lecitīns)
T.sk. T.sk.	Fosforskābe	$-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}}-\text{COO}^-$	Serīns Serīna fosfatīds
T.sk. T.sk.	Fosforskābe		Inozitols Inozitola fosfatīds

T.sk.	T.sk.	Fosforskābe	$\text{—O—CH}_2\text{—}\underset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{—CH}_2\text{—OH}$	Glicerīns	Glicerīna fosfatīds
T.sk.	T.sk.	Fosforskābe	$\text{—O—CH}_2\text{—}\underset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{—CH}_2\text{—O—}\underset{\text{O}=\text{P—O}^-}{\text{O}}$ $\text{CH}_2\text{—}\underset{\text{O}}{\text{CH}}\text{—CH}_2\text{—O—}\underset{\text{O}}{\text{CH}_2}$ T.sk. T.sk.	Glicerīna fosfatīds	Glicerīna bisfosfatīds
$\begin{array}{c}   \\ \text{CH} \\    \\ \text{CH} \\   \\ \text{R} \end{array}$	T.sk.	Fosforskābe	$\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_3^+$	Etanolamīns	Etanolamīna plazmogēns
	T.sk.	Fosforskābe	$\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$	Holīns	Holīna plazmogēns

## 6.5. Sfingolipīdi

Sfingolipīdos alifātiskā sfingozīna daļa veido vienu no abām hidrofobajām grupām. Otru grupu veido ar amīda saiti pie sfingozīna saistītā taukskābe. Šo savienojumu sauc par **ceramīdu**, un tas veido visu sfingolipīdu pamatu. Ceramīdā sfingozīna hidroksilgrupa pie C-3 ir neesterificēta. Ceramīda galējā hidroksilgrupa veido estera saiti ar fosfātu, kas savukārt esterificē holīnu. Sfingomielīni organismā veidojas, pārnesot holīna fosfātu no lecitīna uz ceramīdu. Sfingomielīni veido nervu šķiedru apvalkus, tāpēc daudz to ir smadzenēs. Sfingomielīnu vielmaiņas traucējumus uzskata par vienu no iespējamiem izkaisītās sklerozes cēloņiem.

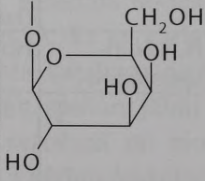
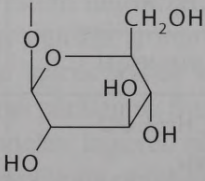
Arī glikolipīdi veidojas uz ceramīda bāzes, bet atšķirībā no sfingomielīniem tie pie sfingozīna C-1 atoma satur ogļhidrāta komponenti, kura var būt monosaharīds vai sarežģīta sastāva oligosaharīds. Glikolipīda komponente atrodas uz šūnas membrānas ārējās virsmas, tā kalpo par dažādu vielu receptoru, lai šūna varētu saistīt šīs vielas un tad endocitozes ceļā ievadīt šūnā.

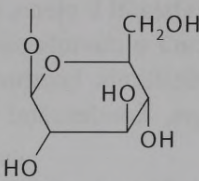
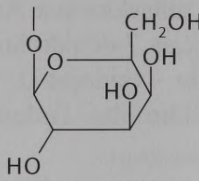
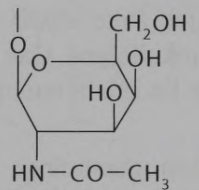
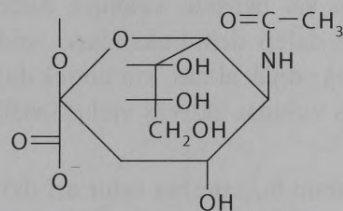
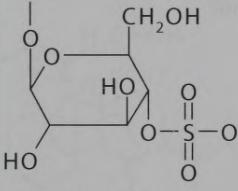
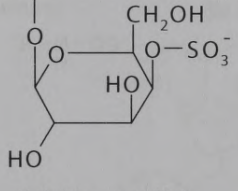
**Cerebrozīdi** ir glikolipīdi, kuru ogļhidrāta komponente ir monosaharīds. Tie bagātīgi izplatīti smadzenēs, kur monosaharīds ir galaktoze. Citu šūnu membrānās monosaharīds ir glikoze.

**Gangliozīdos** ogļhidrāta komponenti veido oligosaharīds ar sazarotu struktūru un sastāvu. Ir zināmi vairāk nekā pussimts dažādu gangliozīdu.

6.5. tabula

### Sfingolipīdi

Ceramīdi	T.sk.	H
Sfingomielīni	T.sk.	$\text{O}=\underset{\text{O}}{\text{P}}\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$
Cerebrozīdi	T.sk.	$\begin{array}{c} \text{O} \\   \\ \text{O} \end{array}$  Galaktoze vai  Glikoze

Ganglioziīdi	T.sk.	<p style="text-align: center;">2-NANA</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">B      3      B      B</p> <p style="text-align: center;">↑ B</p> <p style="text-align: center;">1-Glc-4 ← 1-Glc-4 ← 1-GalNAc-3      1 ← Gal</p> <p style="text-align: center;">Ganglioziīds G<sub>M1</sub></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Glikoze (B-Glc<sub>p</sub>)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Galaktoze (B-Gal<sub>p</sub>)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Galaktoze (B-GalNA<sub>cp</sub>)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>N-acilneiraminskābe (NANA) (Sialskābe)</p> </div> </div>
Sulfolipīdi	T.sk.	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Glikozes sulfāts</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Galaktozes sulfāts</p> </div> </div>

## 6.6. Nehidrolizējamie lipīdi

Nehidrolizējamie lipīdi nehidrolizējas ne skābā, ne bāziskā vidē, un galveno to masu veido steroīdi un terpēni, pirmie no tiem izplatīti dzīvniekos, otrie – augos. Abu kopēja iezīme ir veidošanās no izoprēna atvasinājumiem. Tie veidoti no izoprēna atlikumiem, tāpēc tos sauc arī par izoprenoīdiem. Viens no izplatītākajiem izoprenoīdiem ir dabīgais kaučuks.

### 6.6.1. Steroīdi

Steroīdi plaši izplatīti dabā (vairāk nekā divdesmit tūkstošu savienojumu), un daudzi no tiem cilvēka organismā izpilda dažādas funkcijas. Ļoti daudzi steroīdi ir arī sintezēti ķīmiski, kaut vai, piemēram, dopings sportistiem.

Steroīdu pamatā ir cikliska struktūra – perhidrociklopenta[α]fenantrēns, kuru veido trīs sešlocekļu un viens pieclocekļu cikls. Dabā sastopamajiem steroīdiem raksturīgi šādi aizvietotāji perhidrociklopenta[α]fenantrēnā: pie C-3 (hidroksilgrupa (OH), aizvietota OH grupa (OR')), oksogrūpa (=O); metilgrupas pie C-10 un C-13 un alifātiska grupa pie C-17.

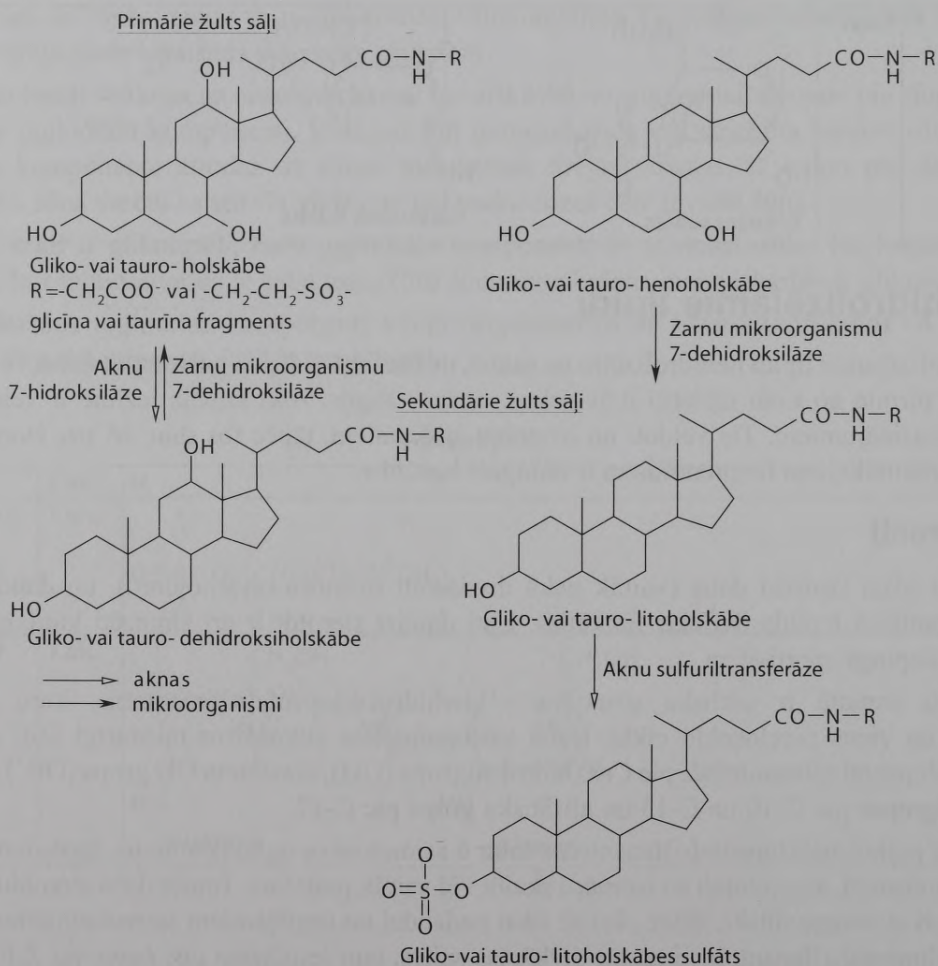
Jau pats perhidrociklopenta[α]fenantrēns satur 6 asimetriskos oglekļa atomus, tāpēc tam iespējami  $2^6 = 64$  enantiomēri, aizvietotāji šo izomēru skaitu vēl vairāk palielina. Tomēr dabā steroīdu biosintēze notiek stingri stereospecifiski, tāpēc eksistē tikai nedaudzi no iespējamiem stereoizomēriem. Kaut arī perhidrociklopenta[α]fenantrēns nesatur divkāršas saites, tam iespējama *cis*, *trans* vai *Z,E*-izomērija, jo nav iespējama brīva rotācija ap C–C saiti sešlocekļu ciklos. Steroīdu konformācijas izomērija šeit netiks aplūkots.

Dzīvos organismos steroīdi ir plaši izplatīti: zoosterīni (dzīvniekos), fitosterīni (augos), mikosterīni (sēnēs un mikroorganismos).

Holesterīns sastopams visos dzīvnieku audos gan brīvā veidā, gan esterificēts ar taukskābēm. Cilvēks normāli aptuveni 20% holesterīna saņem ar uzturu, bet lielākā tā daļa sintezējas organismā. Cilvēka organismā ir tuvu 200 g holesterīna, un dienā cilvēks sintezē aptuveni 0,8 g holesterīna. Holesterīna vielmaiņas traucējumi izraisa tā nogulsņēšanos asinsvados, kas samazina to elastību (aterosklerozi). Holesterīns ir arī žultsakmeņos. Ar holesterīnu bagāti ir piens, sviests, olas dzeltenums. No holesterīna organismā sintezējas 7-dehidroholesterīns, kurā ultravioletais starojums pārrauj saitī starp C-9 un C-10, atverot B ciklu – veidojas D<sub>3</sub> vitamīns kalciferols. Izņemot hidroksilgrupu, pārējā holesterīna molekulas daļa ir hidrofoba. Holesterīna stingie, kondensētie cikli palīdz nodrošināt membrānas struktūru.

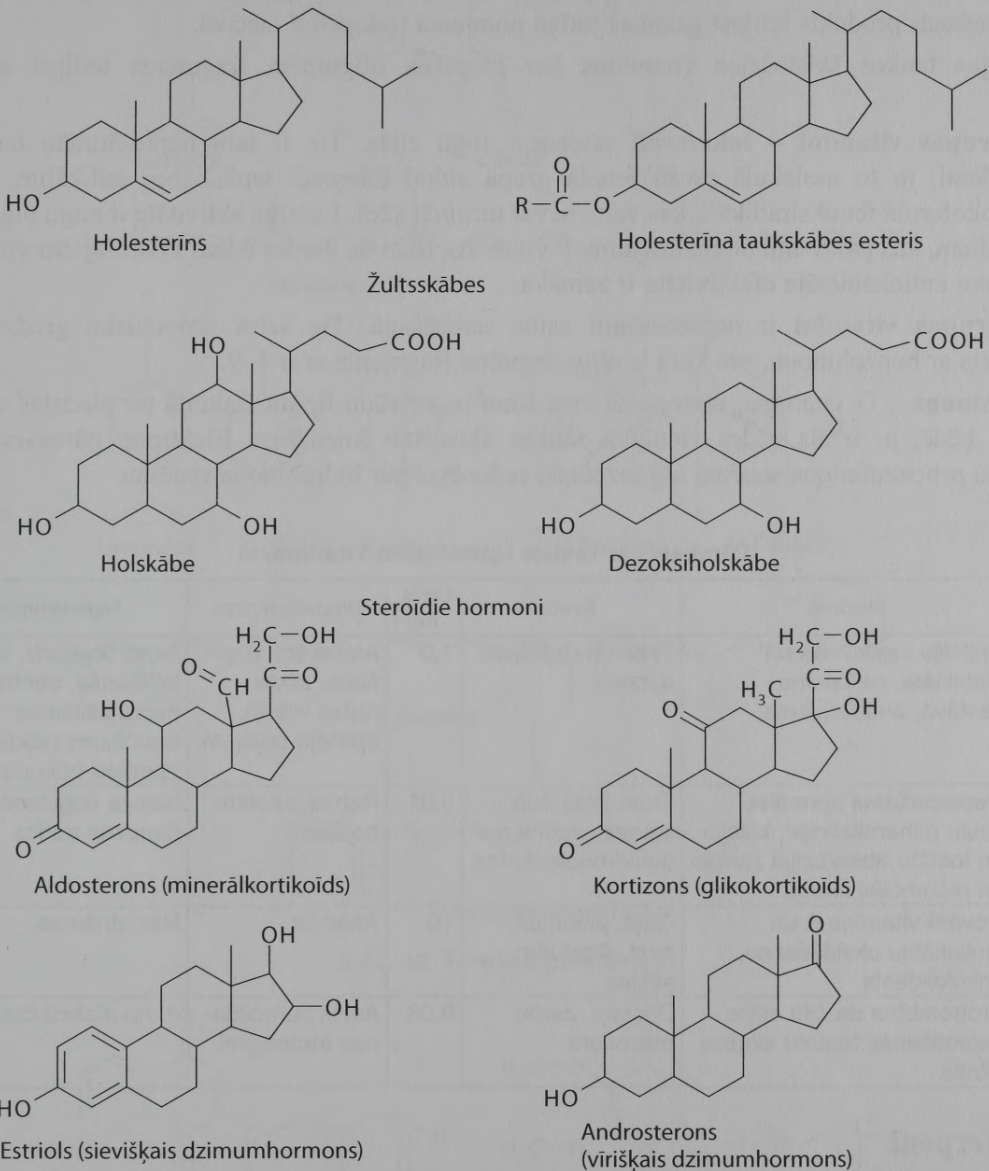
Lielākā daļa holesterīna organismā pārvēršas žultsskābēs, kuras polaritātes palielināšanai kondensējas ar glicīnu vai taurīnu, veidojot žults sāļus – barības lipīdu emulgētājus zarnās. Pēc izdalīšanās ar žulti tie daļēji dehidroksilējas, veidojot otrējos žults sāļus. Ap 95% žults sāļu tiek uzsūkta atpakaļ asinīs un nonāk aknās, kur notiek daļēja rehidroksilēšana. Gan pirmējiem, gan otrējiem žults sāļiem ir izteiktas virsmas aktīvās vielas īpašības, tāpēc tie ir labi tauku un citu hidrofobo vielu emulgētāji.

Ievērojamu daudzumu holesterīna satur arī dzīvnieka šūnu membrānas. No holesterīna veidojas arī hormoni. Ap 85% visa holesterīna pārvēršas žults skābēs, kuras kondensējoties kopā ar glicīnu vai taurīnu veido žults sāļus.



6.11. att. Žults sāļi un to pārvērtības zarnās un reģenerācija aknās

Holesterīna pārmērīga uzņemšana un nepareiza vielmaiņa izraisa tā izgulsnēšanos asinsvados un piedod asinsvadu sienām trauslumu. Tāpēc būtiska ir holesterīna normēšana diētā. Augu sterīni ir līdzīgi holesterīnam, tāpēc tie samazina uzsūkšanos zarnās, bet, nonākuši organismā, traucē holesterīna kristalizēšanos un līdz ar to kavē aterosklerozes attīstību.



6.12. att. Holesterīns un daži tā atvasinājumi

**Steroīdos hormonus** producē virsnieru dziedzeris un dzimumorgāni.

Augos sastopami **eksdisteroīdi**, kuriem arī piemīt hormoniem līdzīga aktivitāte, tos izmanto kā tonizējošu līdzekli, adaptogēnus un aizsardzībai pret stresu.

**Sirds glikozīdi** ir augu izcelsmes stereoīdie glikozīdi, kas sastopami, piemēram, uzpirkstītē, maijpuķītēs.

### 6.6.2. Taukos šķīstošie vitamīni

Taukos šķīstošie vitamīni A, D, E, K var uzkrāties organismā tauku rezervēs. Lai gan šo vitamīnu trūkuma pazīmes jau sen ir pazīstamas, tomēr molekulārās darbības mehānismi joprojām ir nezināmi vai neskaidri. Tie neietilpst koenzīmu sastāvā. Šo vitamīnu pārdozēšanas sekas ir bīstamākas nekā

ūdenī šķīstošajiem vitamīniem sakarā ar to spēju uzkrāties organismā, kamēr ūdenī šķīstošo vitamīnu pārākums izdalās ar urīnu.

**Retinols** jeb  $A_1$  vitamīns organismā veidojas no  $\beta$ -karotīna. Tā trūkums izsauc notievēšanu, acs radzenes izžūšanu (vistas aklumu), samazina izturību pret infekcijām. Tā oksidācijas un *cis-trans* izomerizēšanās produkts ietilpst gaismas jutīga pigmenta rodopsīna sastāvā.

Pārējos taukos šķīstošajos vitamīnos bez izoprēna oligomēra fragmenta ietilpst arī arēnu sistēma.

**E grupas vitamīni – tokoferoli** satopami augu eļļās. Tie ir labi nepiesātināto taukskābju antioksidanti, jo to molekulā esošā fenola grupa atdod ūdeņradi taukskābes radikālim, veidojot stabilu tokoferola fenoksiradikāli, kas vairs nevar turpināt ķēdi. Līdzīga aktivitāte ir augu pigmentiem flavonoīdiem, kas pazīstami ar apzīmējumu P vitamīns, tikai tie pieder ūdenī šķīstošajiem vitamīniem un to tauku antioksidētāja efektivitāte ir zemāka.

**K grupas vitamīni** ir nepieciešami asins sarecēšanā. Tie satur aromātisko gredzenu, kas kondensēts ar benzohinonu, pie kura ir oligoizoprēna fragments ar  $n$  4–9.

**Ubihinons** – Q vitamīns, sastopams visu šūnu membrānu lipīdu frakcijā un piedalās elektronu pārnesei ķēdē, jo ir šīs ķēdes vienīgais taukos šķīstošais koenzīms. Elektronu pārnesei procesā ubihinona *p*-benzofenona sistēma atgriezeniski reducējas par hidrohinona sistēmu.

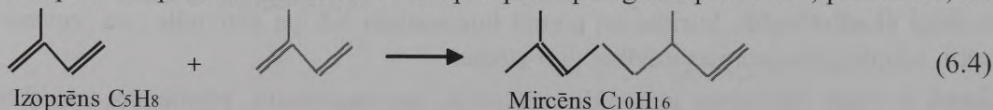
6.6. tabula

Pārskats par taukos šķīstošajiem vitamīniem

Vitamīns	Nozīme	Avoti	Deva, mg	Hipovitaminoze	Hipervitaminoze
A	Epitēlija veidošana un stabilitāte, rodopsīna sastāvā, antioksidants	Zaļie un dzeltenie dārzeņi	1,0	Aizkavēta augšana, slikta redze krēslā, epitēlija bojājumi	Aknu bojājumi, ādas lobīšanās, centrālās nervu sistēmas traucējumi (slikta dūša, apetītes trūkums)
D	Nepieciešams normālai kaulu mineralizācijai, kalcija un fosfātu absorbcijai zarnās un resorbcijai nierēs	Sintezējas ādā saules gaismā no dehidroholesterīna	0,01	Rahīts, skeleta bojājumi	Kalcija nogulsņēšanās daudzos audos
E	Novērš vitamīna A un taukskābju oksidēšanos, antioksidants	Gaļa, piens dārzeņi, dīgstošas sēklas	10	Anēmija	Nav zināmas
K	Protrombīna un citu asins sarecēšanas faktoru sintēze aknās	Dārzeņi, zarnu mikroflora	0,08	Asins sarecēšanas traucējumi	Aknu disfunkcija, dzelte

### 6.6.3. Terpēni

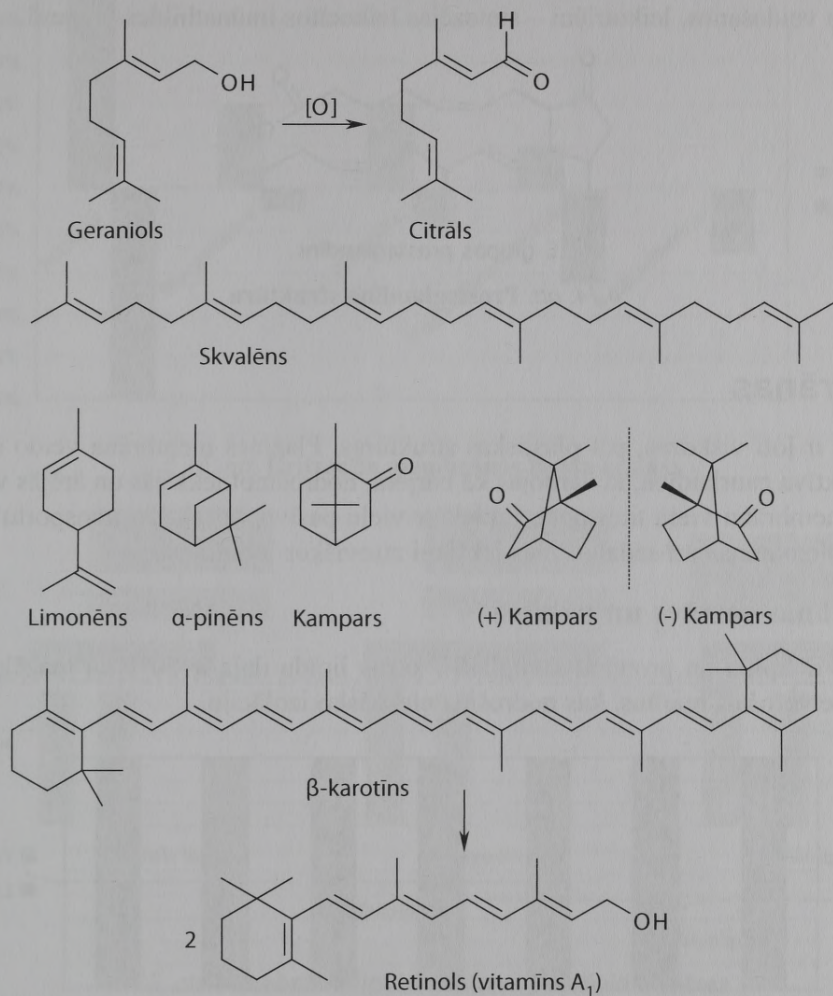
Šis nosaukums apvieno rindu ogļūdeņražu un to atvasinājumu: spirtus, aldehīdus un ketonus. Daudzi terpēni ir ēterisko eļļu sastāvdaļas, augu krāsvielas un taukos šķīstošie vitamīni. Lielākai daļai terpēnu izoprēna atlikumi savienoti pēc principa “galva pie astes”, piemēram, mircēnā.



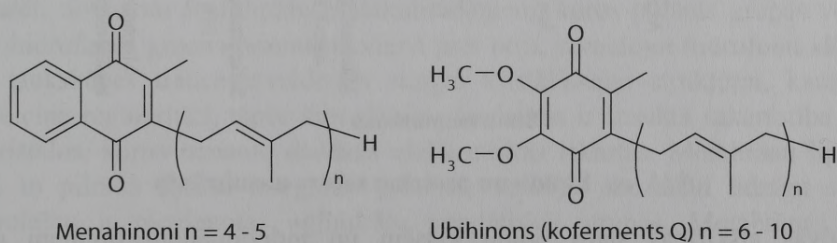
Lielākajai daļai terpēnu sastāvs atbilst  $(C_5H_8)_n$ . Tie var būt necikliski (mono-, bi-, tri-) un policikliski. Ja  $n = 2$ , tad tie ir terpēni,  $n = 3$  seskviterpēni,  $n = 4$  diterpēni,  $n = 6$  triterpēni,  $n = 8$  tetraterpēni utt.

Pie terpēniem pieder vai to fragmentus satur lielākā daļa taukos šķīstošo vitamīnu. Tie ir 6.12. un 6.13. attēlā parādītais vitamīns A (retinols), vitamīns E (tokoferols), K [filohinoni (augos) un

manahinoni (dzīvniekos)], Q (ubihinoni). Terpēni veido ēteriskās eļļas, kuras izmanto pārtikas aromatizācijā. Būdamas pārtikas sastāvā, tās nodrošina raksturīgo aromātu.



6.12. att. Terpēnu pārstāvji



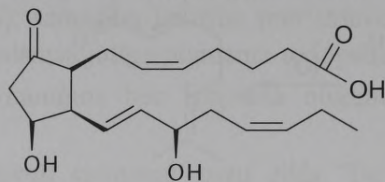
6.13. att. K un Q vitamīni

#### 6.6.4. Prostaglandīni

No organiskās ķīmijas viedokļa prostoglandīni ir arahidonskābes atvasinājumi, tikai ar ļoti izteiktu bioloģisko aktivitāti. Tie ir līdzīgi hormoniem, bet atšķirībā no hormoniem tos izstrādā organisma šūnas, nevis speciāli iekšējās sekrēcijas dziedzeri. Tāpēc tos var uzskatīt par audu hormoniem. Prostoglandīni jau koncentrācijā  $10^{-9}$  M var izraisīt muskuļu saraušanos.

Prostoglandīnos var būt dažāds skaits divkāršo saišu, hidroksilgrupu vai ketogrupu.

Prostaglandīniem ir radniecīgi un no arahidonskābes veidojas prostaciklīni – vielas, kas aizkavē trombu veidošanos, tromboksāni – ļoti nestabilas, bet arī ļoti aktīvas vielas, kas veidojas trombocītos un iniciē tromba veidošanos, leikotriēni – sintezējas leikocītos imūnatbildes procesā.



E grupas prostaglandīns

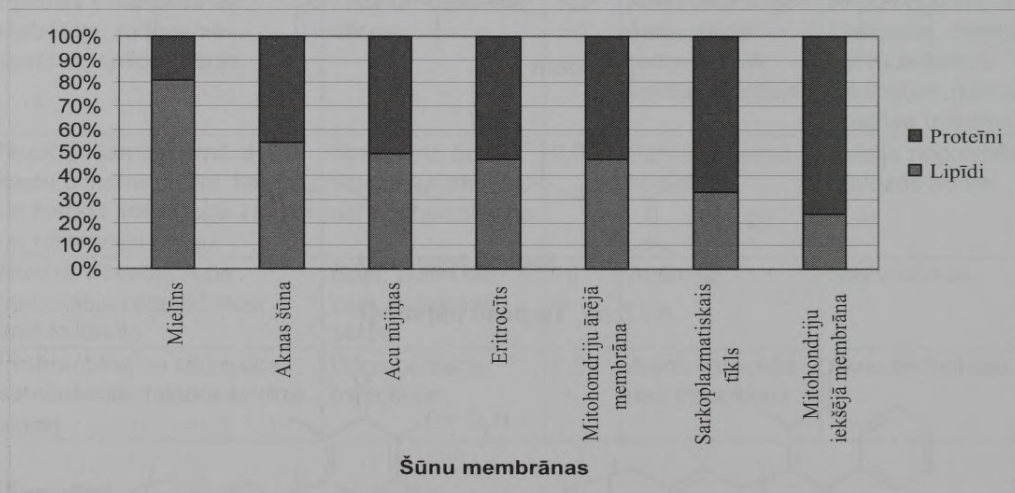
6.14. att. Prostaglandīna struktūra

## 6.7. Membrānas

Membrānas ir ļoti viskozas, pat plastiskas struktūras. Plazmas membrāna veido šūnas noslēgtu telpu, tai ir selektīva caurlaidība, tā darbojas kā barjera, nodrošinot iekšējās un ārējās vides atšķirību. Caur plazmas membrānu vielu transports notiek ar vielu pasīvo vai aktīvo transportu vai eksocitozi un endocitozi. Membrānas arī sadala šūnas iekšieni atsevišķos iecirkņos.

### 6.7.1. Membrānas sastāvs un uzbūve

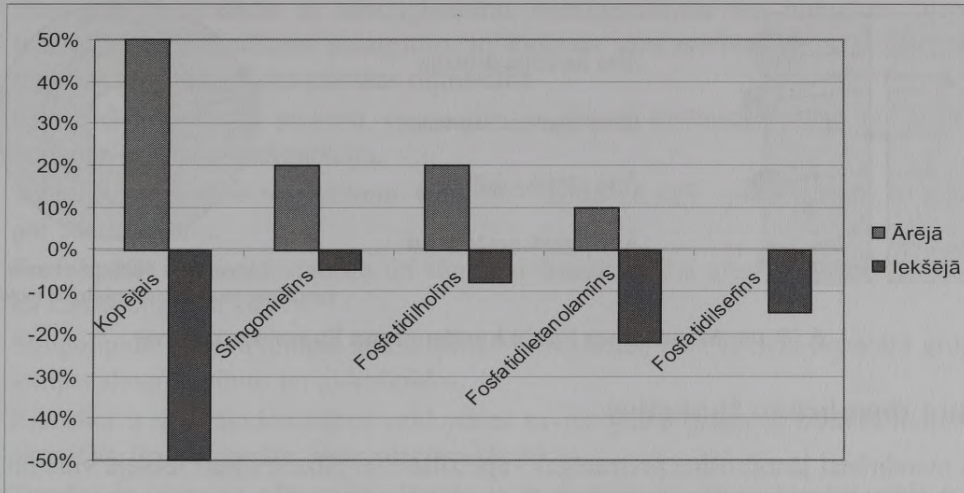
Membrānas ir lipīdu un proteīnu kompleksi, kuros lipīdu daļa ir 50% un mazāk. Izņēmums ir nervu šķiedras ietverošais mielīns, kas nodrošina elektrisko izolāciju.



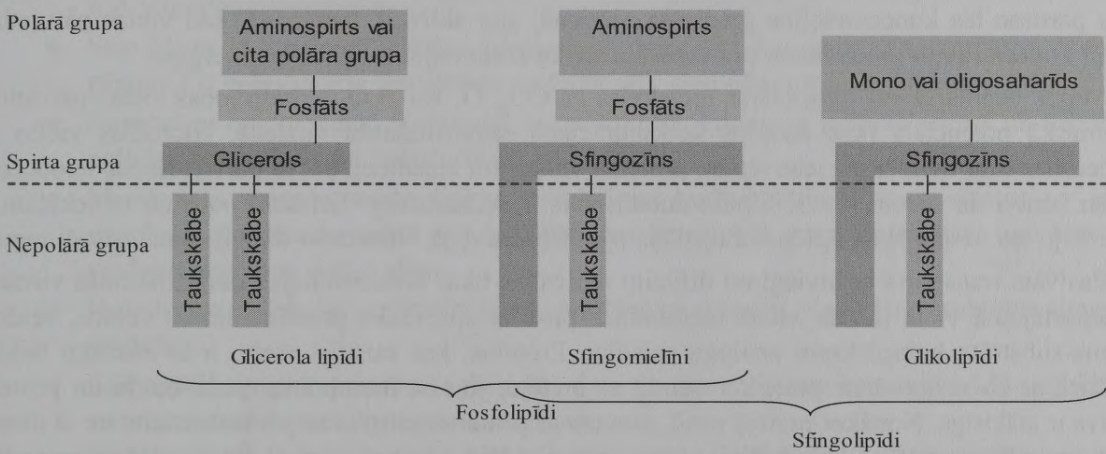
6.15. att. Lipīdu un proteīnu saturs membrānās

Ir kvantitatīvas atšķirības starp lipīdu klasēm un individuāliem lipīdiem dažādās šūnas membrānās. Plazmas membrānai raksturīga vislielākā dažādība, tajā ir visvairāk neitrālo lipīdu un sfingolipīdu. Aksonu mielīnos ir sevišķi liels sfingolipīdu saturs. Mitohondriju, kodola un graudainā endoplazmatiskā tīkla membrānu lipīdu sastāvs ir ar ļoti lielu glicerolipīdu pārkumu un mazu citu lipīdu daļu. Lipīdu sastāvs biomolekulārā slāņa abās pusēs ir atšķirīgs.

Membrānās galvenokārt pārstāvēti trīs lipīdu veidi: fosfolipīdi, glikolipīdi un holesterīns.



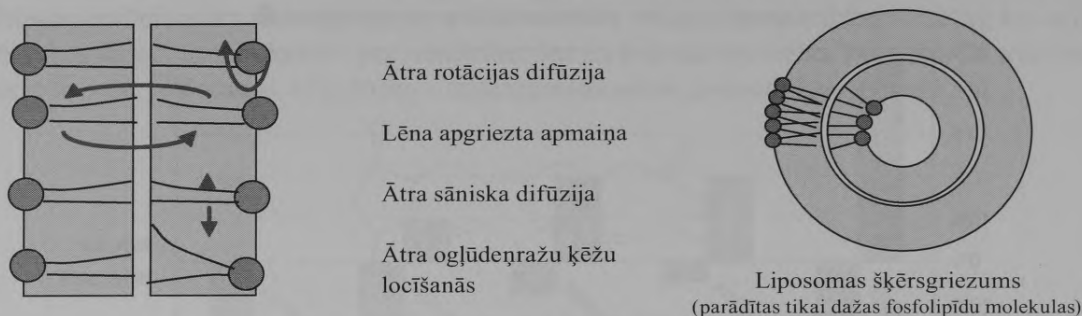
6.16. att. Eritrocīta membrānas lipīdu sastāvs



6.17. att. Membrānu lipīdu uzbūves principiālā shēma

Lielāko daļu šūnas membrānu lipīdu veido fosfolipīdi. To molekulas veido lipīdu dubultslāni no diviem paralēli novietotu fosfolipīdu molekulu slāņiem, kuros polārās grupas vērstas uz ūdens fāzes pusi, bet hidrofobās grupas orientētas viena pret otru, izveidojot hidrofobu slāni. Fosfolipīdu nepiesātinātās taukskābes traucē izveidoties stingai kristāliskajai struktūrai, kamēr polāro daļu mijiedarbība veicina regularitāti, tāpēc šim slānim vienlaikus ir izteikta sakārtotība un plūstamība, kā šķidrājos kristālos, kurus izmanto daudzās elektroniskās iekārtās. Membrānu lipīdu dubultslānī iegremdēti vai to pilnībā šķērso integrētie proteīni, veidojot mozaīkai līdzīgu struktūru. Daļai membrānas proteīnu ir pievienotas ogļhidrātu prostētiskās grupas. Membrānas abas puses ir asimetriskas gan pēc fosfolipīdu, gan proteīnu sastāva.

Membrānas plūstamība pasargā pret caurumu veidošanos, jo radies caurums membrānas plūstamības dēļ pats aizvelkas.



6.18. att. Membrānas lipīdu kustīgums un liposomas uzbūve

## 6.7.2. Šūnu membrānu funkcijas

Šūnas membrānai jānodrošina pretrunīgas vajadzības: tai jāizolē šūnas iekšējā vide no apkārtnes un vienlaicīgi jānodrošina šūna ar barības vielām un vielmaiņas atkritumu izvadīšana.

Šo pretrunu atrisina vielu transports caur membrānām gan ar pasīvo transportu, kuru nodrošina vielu pārnese tās koncentrācijas gradienta virzienā, gan aktīvais transports, kad vielas pārvietojas pretēji koncentrāciju gradientam, par virzītāju spēku izmantojot bioķīmisko enerģiju.

Mazas nepolāras vai mazpolāras molekulas kā  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  vai  $\text{H}_2\text{O}$  un hidrofobas vielas pārvietojas to ķīmiskā potenciāla (kas atkarīgs koncentrācijas) samazināšanās virzienā. Hidrofilas vielas var pārvietoties caur membrānā iebūvētiem proteīnu veidotiem kanāliem, bet to pārvietošanos ierobežo šo kanālu izmēri un specifiskums. Lipīdu dubultslānis ir necaurļaidīgs lielākām polārām molekulām un joniem, jo tās nespēj šķīst lipīdu dubultslāņa ogļūdeņraža daļā. Vienkāršo difūziju šūna nespēj regulēt.

Pasīvais transports ar atviegloto difūziju realizējas tikai koncentrācijas samazināšanās virzienā. Transportējamā viela saistās vienā membrānas pusē ar specifiska proteīna aktīvo centru, veidojot enzīma-substrāta kompleksam analoģu saistību. Proteīns, kas saistījis vielu, ir ar mazāku tieksmi saistīties ar šo membrānas pusi, bet vairāk ar pretējo, jo abu membrānas pušu lipīdu un proteīnu sastāvs ir atšķirīgs. Nonākot pretējā pusē, samazinās proteīna saistība ar pārnesto vielu, un tā disociē no transportētāja proteīna, bet pēdējais atgriežas iepriekšējā membrānas pusē. Šādā veidā transportējas, piemēram, liela daļa glikozes.

Visbiežāk dažu vielu koncentrācija šūnas abās pusēs ir ļoti atšķirīga. Šādu praktiski nemainīgu vairākkārtēju koncentrāciju atšķirību nodrošina aktīvais transports. Tipisks piemērs ir  $\text{Na}^+$  un  $\text{K}^+$  jonu koncentrācijas gradienta veidošanās. Transportu nodrošina nātrija-kālija ATF-āze, kas, hidrolizējot ATF par ADF un fosfātu, vienlaicīgi pārnēs no citoplazmas uz šūnas ārpusi trīs nātrija jonus apmaiņā pret diviem kālija joniem pretējā virzienā, un to sauc par **tiešo aktīvo transportu**. **Netiešā aktīvā transportā** vielas transportējas caur membrānām, izmantojot jonu gradientu, kas izveidots aktīvajā transportā. Trešais aktīvā transporta veids ir **grupu translokācija jeb modifikācija**, kurā vielu gradients tiek veidots, pārveidojot pārnēsamās vielas grupas, piemēram, fosforilējot ar ATF, kā rezultātā samazinās transportējamās vielas koncentrācija šūnas iekšienē (veidojas transportu veicinošs gradients).

## 6.8. Apkopojums

- Taukskābes ir monokarbonskābes ar nesazarotu piesātinātu vai *cis* struktūras nepiesātinātu oglekļa atomu ķēdi.
- Vaski ir taukskābju un augstāko spirtu esteri.
- Tauki un eļļas ir glicerīna un taukskābju esteri. Taukos pārākumā ir piesātinātās, bet eļļā – nepiesātinātās taukskābes. Tauki ir cietas vielas, jo to piesātinātās taukskābes var sakārtoties cieši blakus, kamēr eļļās nepiesātināto taukskābju stingā, izlocītā struktūra to nepieļauj.

- Bioloģiski būtiskākās ir triacilglicerīnu hidrogenēšanās un hidrolīze. Nepiesātināto taukskābju piesātināšana paaugstina to kušanas temperatūru, ko izmanto cieto tauku iegūšanai no augu eļļām pārtikas rūpniecībā.
- Eļļu hidrogenēšanās procesā var notikt nevēlama divkāršās saites *cis* konfigurācijas nomaiņa ar *trans* konfigurāciju.
- Tauku reakcijā ar sārma šķīdumu veidojas taukskābju sāļi – ziepes, tāpēc šo reakciju sauc par pārziepošanu.
- Fosfolipīdos (glicerofosfatīdos un sfingomielīnos) fosfāta grupa ir negatīvi lādēta, līdzīgi kā karboksilgrupa ziepēs.
- Sfingolipīdu sastāvā ietilpst aminospirts – sfingozīns, kam ir liela nepolārā grupa un kas ietilpst sfingomielīnos un glikolipīdos.
- Eikozāni ir no arahidonskābes veidojusies savienojumu grupa ar izteiktu lielu bioloģisko aktivitāti. Prostoglandīni satur pieclocekļa ciklu.
- Terpēni ir izoprēna oligomēri. Daudz to ir ēteriskajās eļļās. Terpēniem ir fizioloģiska iedarbība uz cilvēka organismu. Tos izmanto arī pārtikas produktu aromatizācijai. Karotīni ir A vitamīna provitamīni.
- Steroīdiem ir terpēniem līdzīga biosintēzes gaita, bet nav aciklisku struktūru. Steroīdu pārstāvji ir holesteroīns, žultskābes un žults sāļi, steroīdie hormoni, sirds glikozīdi.
- Membrānu lipīdus veido fosfolipīdi un glikolipīdi, kuriem ir polāras grupas un nepolāras ogļūdeņraža grupas, un holesterīns.
- Membrānas pamatu veido lipīdu dubultlānis, kurā polārās grupas vērstas uz abām membrānas pusēm kontaktā ar ūdens fāzi, bet hidrofobās grupas orientētas cita pret citu, veidojot nepolāro vidējo slāni.
- Holesterīna molekulas novietotas starp nepolārajām grupām, piedodot membrānai stingrāku struktūru.
- Glikolipīdi un glikoproteīnu ogļhidrātu daļa uz membrānas virsmas izveido ogļhidrātus saturošus dažādu vielu receptoru iecirkņus.
- Proteīni membrānā izkārtoti mozaīkas veidā, un tie var šķērsot membrānu, būt tikai daļēji iegremdēti vai arī tikai noenkuroti kādā no membrānas pusēm.
- Membrānas ir asimetriskas gan pēc lipīdu, gan proteīnu sastāva un izkārtojuma.
- Vielu transports caur membrānu var realizēties vienkāršas difūzijas ceļā, atvieglotas difūzijas ar transporta proteīnu ceļā vai aktīvā transportā ar integrēto proteīnu līdzdalību.

## 7. Aromātvielas

### 7.1. Vispārēji jēdzieni par aromātvielām

Pārtikas aromāta sajūtu nosaka garšas, smaržas un taktilo sajūtu mijiedarbība, kam var pievienoties redzes uztvere, jo aromāta sajūta veidojas, centrālajā nervu sistēmā summējoties signāliem no augstāk minētajiem receptoriem un iepriekšējās pieredzes. Receptoru jutība ir atkarīga no to uzbūves, ko nosaka ģenētiski faktori. Noteicošie šajās sajūtās ir garšas un ožas receptoru veidotie signāli. Tāpēc aromātvielas pieņemts iedalīt divās lielās grupās: garšu noteicošajās un smaržu noteicošajās aromātvielās. Pēdējās šaurākā nozīmē sauc arī par aromātvielām.

Ēdiena garšu veidojošās vielas pārsvarā ir istabas temperatūrā negaistoši savienojumi, kas, mijiedarbojoties ar mēles kārpiņu garšas receptoriem, veido četras pamatgaršas sajūtas: rūgtu, saldu, sāļu un skābu, kam dažreiz pievieno piekto – glutamāta veidoto “buljona” garšu.

Smaržu veidojošās vielas ir gaistoši savienojumi, kas mijiedarbojas ar ožas receptoriem deguna dobumā un tajā nonāk ar ieelpoto gaisu caur nāsīm vai no mutes dobuma ēdiena sakošļāšanas laikā. Tās var piedalīties arī garšas veidošanā.

Aromātu veidojošās vielas ēdienā ir ļoti zemā koncentrācijā (10–15 mg/kg), un aromāta veidošanā piedalās liels skaits individuālu vielu. Sevišķi tas raksturīgs fermentētiem un termiski apstrādātiem produktiem, piemēram, maizei, alum, kafijai, kakao, tējai, kuru aromātu veido vairāku simtu savienojumu “bukete”.

Apzināti ap 10 tūkstošiem savienojumu, kuri piedalās gandrīz pustūkstoša produktu garšas un smaržas veidošanā.

Lai viela būtu aromātu noteicošā, tai produktā jābūt koncentrācijā, kas pārsniedz garšas vai smaržas sliekšni – mazāko koncentrāciju, kuru var konstatēt ar maņu receptoriem. Koncentrācijas vērtība var mainīties par daudzām kārtām (sk. 7.1. tabulu)

7.1. tabula

Dažu aromātu veidojošo vielu smaržas sliekšņa vērtības ūdens šķīdumam pie 293 K  
(Belitz et al., 2004, p. 343)

Savienojums	Sliekšņa vērtība (mg/L)
Etanols	100
Heksanols	2,5
Benzaldehīds	0,35
Vanilīns	0,02
Izobutanāls	0,001
Metiltiols	0,00002
2-izobutil-3-metoksipirazīns	0,000002
1p-mentēna-8-tiols	0,00000002

Aromāta intensitāti  $A_x$  aprēķina pēc formulas:

$$A_x = \frac{C_x}{a_x} \quad (7.1)$$

kur:  $C_x$  – aromātvielas  $X$  koncentrācija pārtikas produktā,  $a_x$  – smaržas sliekšņa koncentrācija vielai  $X$ .

Jāņem vērā arī koncentrācijas ietekme uz smaržas intensitāti. Atbilstoši psiholoģisko stimulu vērtības likumam, sajūtas intensitāte  $E$ :

$$E = k \cdot (S - S_0)^n \quad (7.2)$$

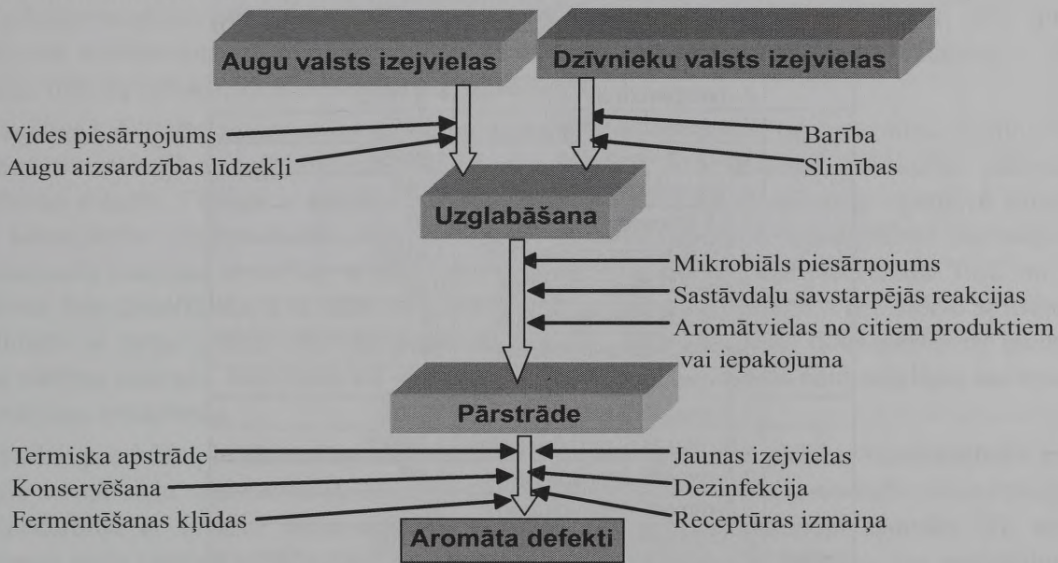
kur:  $k$  – konstante,  $S$  – stimulanta koncentrācija,  $S_0$  – stimulanta sliekšņa koncentrācija.

Jāievēro arī aditīvie efekti, kurus ir grūti iepriekš novērtēt. Pētījumi ar maisījumiem dod ievirzes informāciju šajā jautājumā. Līdzīgu aromātu smarža palielinās līdz ar komponentu skaita pieaugumu, bet tā ir mazāka par individuālu vielu smaržas intensitātes summu. Individuālo vielu smaržas profili veido izteiktu dažāda aromāta savienojumu maisījuma smaržas profilu tikai tad, ja to intensitātes ir apmēram vienādas. Ja viena komponenta intensitāte dominē, tad šis komponents lielākoties vai pilnīgi noteiks smaržas profilu.

Pārtikas produktiem, kas satur vienas un tās pašas aromātvielas, var būt pilnīgi atšķirīgi smaržas profili sakarā ar intensitāšu kvantitatīvām atšķirībām. Izmaiņas receptūrā vai tehnoloģiskajā procesā izmaina aromātvielu koncentrācijas, kas var ietekmēt aromātvielu bilanci tā, ka veidojas neparasta rakstura aromāta profils.

## 7.2. Nevēlams aromāts, tā cēloņi

Nevēlama aromāta varbūtīgākā izcelsme parādīta 7.1. att.



7.1. att. Nevēlama aromāta veidošanās

## 7.3. Aromātvielu analīze

Aromātvielas pārtikā pārstāv ļoti dažādu klašu savienojumi, kas sastopami mazā un ļoti mazā koncentrācijā, turklāt daudzi no tiem ir ļoti reaģētspējīgi un nestabili. Analīze notiek vairākās secīgās stadijās:

- 1) gaistošo savienojumu izdalīšana;
- 2) aromātvielu izdalīšana no gaistošo savienojumu frakcijas;
- 3) koncentrēšana un identifikācija;
- 4) koncentrāciju noteikšana;
- 5) aromāta molekulārā modelēšana pēc analīžu rezultātiem;
- 6) atlases eksperimenti būtisko aromātvielu noteikšanai.

No gandrīz 10 000 apzināto gaistošo savienojumu pārtikas aromāta veidošanā būtiska nozīme ir tikai aptuveni 5%, jo to ievērojami ietekmē ožas specifiskums, kas arī pakļaujas tām pašām specifiskuma likumībām kā enzīmu gadījumā.

## 7.4. Ķīmiskās struktūras un aromāta saistība

Perifēro receptoru kairinājums atkarīgs no stimulantu kvalitātes un intensitātes. Intensitāte ir kvantējams lielums, ko var raksturot ar smaržas jutības sliekšņa vērtību, bet kvalitāti var aprakstīt tikai ar salīdzināšanu, sagrupējot vielas ar līdzīgu, piemēram, karameļu vai grauzdēta produkta, smaržu.

Struktūras ietekmei uz smaržas sliekšņa vērtību ir ļoti būtiska nozīme, jo specifiskums nosaka gaistošās vielas smaržas sajūtu. Ožas specifiskumu var novērtēt, izmantojot divu klašu savienojumus. Mainoties savienojumu struktūrai šajās klasēs, mainās arī sliekšņa vērtība, piemēram, alifātisko aldehīdu homologu rindā jutības sliekšņa minimālā vērtībā ir oktanālam. Ar karbonilgrupu konjugēta E-konfigurācijas divkārsā saite alkenālos palielina sliekšņa vērtību salīdzinājumā ar piesātinātajiem alkanāliem. Vēl sarežģītākas rindas veidojas alkilpirazīnu gadījumā, kad ļoti liela nozīme ir alkilgrupas raksturam, novietojumam un hidrofobitātei (sk. 7.2. tabulu).

7.2. tabula

Alkilpirazīnu smaržas sliekšņi (Belitz et al., 2004, p. 405)

N.p.k.	Savienojums	Ožas sliekšnis pmol/L
	2-metilpirazīns	> 21000
	2,5-dimetilpirazīns	16850
	2,6-dimetilpirazīns	15925
	2,3-dimetilpirazīns	8150
	2,3,5-trimetilpirazīns	410
	2,3,5,6-tetrametilpirazīns	15000
	2-etil-3,5-dimetilpirazīns	0,07
	3-etil-2,5-dimetilpirazīns	18
	5-etil-2,3-dimetilpirazīns	1470
	3,5-dimetil-2-propilpirazīns	153
	2,5-dimetil-3-propilpirazīns	13000
	2,3-dimetil-5-propilpirazīns	> 8000
	3,5-dimetil-2-vinilpirazīns	0,07
	3,5-dimetil-3-vinilpirazīns	27
	2,3-dimetil-5-vinilpirazīns	> 3700
	2,3-dietil-5-metilpirazīns	0,07
	3-etil-5-metil-2-vinilpirazīns	0,07
	2-etil-5-metil-3-vinilpirazīns	641
	3-etil-2-metil-5-vinilpirazīns	> 5400
	2-etil-3-metil-2-vinilpirazīns	> 5400

No tabulas datiem varam secināt, ka lielas jutības nodrošināšanai nepieciešama aromātvienas atbilstība receptora aktīvajam centram.

## 7.5. Individuālu aromātvienas grupas

Nozīmīgākās aromātvienas varam iedalīt divās grupās pēc to izcelsmes:

- neenzimātisku reakciju (bez enzīmu līdzdalības) izcelsmes aromātvienas;
- enzimatiskās reakcijās veidojušās aromātvienas.

Lielas daļas neenzimātiskā ceļā veidojušās aromātvienas dažas starpstadijas var būt katalizējuši enzīmi.

### 7.5.1. Aromātvielu veidošanās bez enzīmu līdzdalības

Aromātvielu veidošanās neenzimātiskās reakcijās parasti atkarīga no priekšteča ķīmiskās uzbūves, tā koncentrācijas, temperatūras, ilguma un vides, piemēram, pH, skābekļa pieejamības un mitruma saturs, kā arī no mijiedarbības ar citām aromātvielām.

Aromāta izmaiņas istabas temperatūrā rodas pēc ilgstošas glabāšanas, lipīdu taukskābju autooksidācijas, karbonilsavienojumu mijiedarbības ar aminogrupu saturošiem savienojumiem un to tālāko pārvērtību rezultātā.

Aromātvielu savienojumu veidošanās ātrums un daudzveidība vairākkārt palielinās augstākā temperatūrā, piemēram, cepot vai grauzdējot izveidotajā sausajā pārtikas produkta virsmā notiek ogļhidrātu, proteīnu, lipīdu un citu komponentu daļēja pirolīze. Neenzimātiskām reakcijām raksturīgi, ka no viena vai diviem savienojumiem sadalīšanās procesā rodas ļoti daudzi gaistoši savienojumi, piemēram, karsējot cisteīna un ksilozes maisījumu butiroilglicerīnā pie 200 °C konstatēts 41 sēru saturošs gaistošs savienojums.

Karbilsavienojumi veidojas lipīdu autooksidācijā, aminoskābju noārdīšanā pēc Strekera sadalīšanās mehānisma un karotinoīdu noārdīšanā. No ogļhidrātiem veidojas furanoni – Majāra reakcijas blakusprodukti, kam piemīt laba šķīdība ūdenī.

Bagātīgs klāsts sēru saturošo savienojumu veidojas no cisteīna, cistīna, metionīna, tiamīna un citu savienojumu reakcijā ar ogļhidrātiem. Daudziem no tiem ir ļoti patīkama, bet dažiem uzbudinoša, nepatīkama smarža. Tioliem ir sevišķa nozīme aromāta veidošanā sakarā ar to intensīvo smaržu un plašo sastopamību starpproduktos, kas var reaģēt ar citiem aromātu veidojošiem savienojumiem pievienošanās reakcijās aktivētām  $\pi$ -elektronu sistēmām, piemēram, karbonilgupām. Tioli var viegli oksidēties līdz disulfīdiem, kas tālāk termiski var disproporcionēties par organiskiem sulfīdiem un trisulfīdiem ar zemu jutības sliekšni. Tioli var būt gan alifātiskie, gan heterocikliskie, piemēram, furāna sistēmu saturoši. Iespējama arī sēru vai sēru un slāpekli saturošo heterociklisko savienojumu atvasinājumu veidošanās.

Pārtikas produktu pirolītiskajām reakcijām raksturīga arī pirola un piridīna heterociklisko sistēmu saturošo aromātvielu veidošanās. Pirola ciklu saturoši savienojumi veidojas no karbonilsavienojumiem to mijiedarbībā ar brīvām aminoskābēm, piedodot produktam karamelu aromātu. To aromāta veidošanās spēja (jutības sliekšņa lielums) atkarīgs gan no aizvietotāju rakstura, gan novietojuma.

Pirazīna rindas gaistošie savienojumus, kas piedod pārtikai zemei līdzīgu vai grauzdēta produkta aromātu, var saturēt alkilgrupas (sk. 7.2. tabulu) vai oksigrupas un oksogrupas saturošus aizvietotājus.

Fenoli veidojas no fenilgrupu saturošām skābēm un lignīna termiskā vai mikroorganismu ierosinātā degradācijā, piemēram, gaļas produktu un zivju aukstai un karstai kūpināšanai izmanto dūmus, kas veidojas koksnes sadedzināšanā. Fenoli izdalās arī no koka mucām, kurās uzglabā alkoholiskos dzērienus.

### 7.5.2. Enzimātiskās reakcijas

Liela daļa aromātvielu veidojas enzimatiskās reakcijās, kas ir dzīvnieku, augu un mikroorganismu normālā metabolisma daļa. Sevišķā nozīme ir enzimatiskām reakcijām, kuras ierosina audu bojājumi sasmalcināšanas vai sagriešanas rezultātā, atbrīvojoties normāli audu šūnu organellās ar membrānām iekapsulētiem enzīmiem, piemēram, lizosomās, peroksisomās, esošiem enzīmiem. Enzimātiskās reakcijas var ierosināt aminoskābju veidošanos no proteīniem, kas var būt priekšteči tālākām enzimatiskām vai neenzimātiskām pārvērtībām aromātvielās.

Karbonilsavienojumu un spirtu priekšteči ir taukskābes un aminoskābes. No ogļhidrātiem veidojas etenols un etanāls, pēdējam ir būtiska nozīme sulu un vīnu aromāta veidošanā. Taukskābju oksidācijā ar lipooksigenāzi vai kombinācijā ar hidroperoksīdu liāzi veidojas oksoskābes, aldehīdi un allilspirti. Aldehīdi veidojas arī aminoskābju transaminēšanā vai oksidatīvā deaminēšanā ar

sekojošu izveidojušos  $\alpha$ -oksoskābju dekarboksilāciju, kas notiek atbilstošu enzīmu ietekmē. Alkohola dehidrogenāze var reducēt iepriekšminētos aldehīdus par spirtiem, ko veicina NADH pārākums pār NAD<sup>+</sup>.

Vienpadsmit oglekļa atomus saturoši diēni un triēni ar zemiem jutības sliekšņiem veidojas nepiesātināto taukskābju  $\beta$ -oksidācijas un lipooksidāzes katalizētajās enzimatiskajās pārvērtībās augļos un dārzeņos.

Esteri sintezējas nebojātās šūnās, acilējoties spirtiem ar acilkoenzīmu A, kas veidojies taukskābju  $\beta$ -oksidācijā vai aminoskābju pārvērtībās. No sazarotas ķēdes aminoskābēm veidojas arī esteriem nepieciešamie alkoholi, kā minēts augstāk. Ja augļus sasmalcina, tad esteru ātri hidrolizējas ar atbrīvotajām hidrolāzēm (esterāzēm vai peptidāzēm).

Nepiesātināto taukskābju stereospecifiskā enzimatiskā oksidācijā veidojas hidroksiskābes un to laktoni, kuriem daudziem ir ļoti patīkams aromāts.

Terpēnu biosintēze raksturīga gan augiem, gan dzīvniekiem (pēdējiem tie ir holesterīna biosintēzes starpprodukti). Hidroksilgrupu saturoši monoterpēni (piemēram, linalols, geraniols) sastopami augos glikozīdu sastāvā. Šie glikozīdi viegli hidrolizējas pārstrādes laikā ar atbrīvotajām hidrolāzēm vai zema pH ietekmē. Radušies brīvie terpēni var ātri piedalīties daudzveidīgās tālākās pārvērtībās. Lielākajai daļai terpēnu ir viens vai vairāki asimetriskie centri. To enantiomēriem un diastereomēriem ir atšķirīgas aromāta spējas.

Gaistoši sēru saturoši savienojumi veidojas S-glikozilātu enzimatiskās sadalīšanās rezultātā. Arī metionīna specifisku mikroorganismu enzīmu ierosinātu pārvērtību rezultātā var veidoties spēcīga aromāta sēru saturoši gaistošie savienojumi.

Sarkanie pipari satur lielu daudzumu 2-izobutil-3-metoksipirazīna, kas, iespējams, veidojies leicīna enzimatiskās pārvērtībās. Pirazīnu veidošanos var veicināt arī mikroorganismu enzīmi, radot olu, piena un zivju produktu aromātu.

Triptofāns un tirozīns mikroorganismu ierosinātos noārdīšanas procesos ir priekštecis attiecīgi skatolam un p-krezolam, kas ir cēlonis aromāta bojājumiem.

## 7.6. Aromātvielu mijiedarbība ar citām pārtikas sastāvdaļām

Liela nozīme produkta aromāta veidošanā ir matricas efektiem, kas ietekmē gaistošo savienojumu izdalīšanos (*Malone, M.E et al., 2003*). Aromātvielu mijiedarbība ar lipīdiem, proteīniem un ogļhidrātiem ir atšķirīga. Mainoties to attiecībai, mainās arī dažādu gaistošo savienojumu koncentrācija gāzes fāzē. Lipīdu daļas samazināšana krasi palielina hidrofobo aromāta komponentu, bet samazina hidrofilo komponentu saturu, tādējādi mainās aromāta profils. Zināšanām par aromātvielu saistīšanās spēju ar cieto frakciju ir liela nozīme pārtikas aromatizācijā, tehnoloģijā un uzglabāšanā.

Vielu šķīdība tauku vai eļļas fāzē palielinās līdz ar hidrofobās oglekļa atomu ķēdes pagarināšanos, un tādējādi proporcionāli samazinās aromāta koncentrācija gāzes fāzē.

Dažādu gaistošo vielu sorbcijas spēja uz proteīniem atkarīga no tādu hidroksilgrupu esamības, kas var veidot ūdeņraža saites ar proteīna polārajām grupām. Nepolāro vielu saistīšanā galveno ieguldījumu dod nepolāro aminoskābju radikāļi. Ar polimēru saistīto aromātvielu koncentrācija ir proporcionāla to brīvo molekulu koncentrācijai. Ar biopolimēru saistīto molekulu vidējā daudzuma aprēķināšanai izmanto specifisko saistīšanas spēju ( $r$ ).

$$r = \frac{n \cdot K \cdot C_f}{1 + K \cdot C_f}$$

kur:  $n$  – saistīšanas centru skaits polimēra molekulā,  $K$  – viena centra saistīšanas konstante,  $C_f$  – brīvo aromātvielu koncentrācija.

Būtiska nozīme ir ne tikai aktīvo saistīšanas centru skaitam, bet arī molekulas telpiskajai uzbūvei. Tā, piemēram, cietes amilozes molekulas spirāle var ietvert aromātvielu, tāpēc tās izdalīšanās nav iespējama, un aromātvielu saistīšanās būs atkarīga no amilozes un amilopektīna attiecības un molekulmasas. Tas attiecas gan uz ogļhidrātiem, gan proteīniem.

## 7.7. Pārtikas aromatizācija

Arvien vairāk pārtikas produktu tiek aromatizēti, kas izskaidrojams ar gatavo ēdienu rūpniecisku ražošanu, izejvielu ar maz izteiktu aromātu izmantošanu, aromāta zudumu izejvielas sagatavošanas un uzglabāšanas laikā, jaunu izejvielu, piemēram, proteīna izolātu arvien plašāku izmantošanu u. c. Aromatizācijai izmanto koncentrātus, esences, ekstraktus un individuālus savienojumus parasti specifisku proporciju maisījumā, ko atrod, balstoties uz tehnologa iepriekšējo pieredzi, personīgo sensoro novērtējumu, kā arī fizikāli ķīmiskās analīzes rezultātiem.

### 7.7.1. Pārtikas aromatizācijai izmantojamie preparāti no dabīgām izejvielām

**Esenču** iegūšanai vairāk nekā pusi veido ēteriskās eļļas no dabīgām izejvielām, pārējo daļu gandrīz pilnībā sedz sintezētas vielas, kuras gandrīz simtprocentīgi atbilst dabīgām. Mazāk par 1% no visām aromātvielām veido dabā neesošas sintētiskās aromātvielas. Ēteriskās eļļas lielākoties iegūst augu **destilācijā ar ūdens tvaiku**. Pēc ūdens fāzes atdalīšanas, ja nepieciešams, atdala komponentus, piemēram, terpēnus, kuri neveido aromātu, bet oksidējoties un polimerizējoties veido nevēlamus blakusproduktus. Atsevišķu komponentu satura palielināšanai papildus var veikt frakcionētu destilāciju, piemēram, 1(-)mentola destilāciju no piparmētrām.

Ja ēteriskās eļļas saturs ir mazs un destilācijā ar tvaiku tas var sadalīties vai izšķīst ūdenī, tad lieto ekstrakciju ar organiskiem šķīdinātājiem, piemēram, heksānu, acetonu, etanolu vai ūdeni. Labs šķīdinātājs ir arī šķīdurs CO<sub>2</sub>. Pēc ekstrakcijas ekstrakta koncentrēšanai var izmantot kādu no hromatogrāfijas metodēm. Ekstrakcijas produkts bez šķīdinātāja atdalīšanas ir **ekstrakts**. Tā aromatizētāja spēja ir simt līdz tūkstoš reižu mazāka par tīru ēterisko eļļu. Aromātvielu ekstraktus var iegūt arī, koncentrējot augļu sulas, jo aromātvielas ir gaistošākas par ūdeni un koncentrējas atdestilētā ūdenī, no kura tās var ekstrahēt.

### 7.7.2. Sintētiskās aromātvielas

Neskatoties uz lielo pazīstamo aromātvielu klāstu, drošības un ekonomisku apsvērumu dēļ sintētiski iegūst tikai nelielu skaitu aromātvielu, piemēram, vanilīnu no lignīna, to hidrolizējot sārmainā vidē un oksidatīvi sašķeļot. Terpenoīdu sintēzes piemēri atrodami organiskās ķīmijas grāmatās, tāpēc tos šeit neapskatīsim.

### 7.7.3. Aromātvielas no prekursoriem

Aromātvielas var veidoties arī tehnoloģiskajā procesā Majāra reakcijā, ja pārtikas izejvielām pievieno proteīnu un ogļhidrātu hidrolizātus.

### 7.7.4. Aromāta stabilitāte

Aromātvielas pārtikas tehnoloģiskajā procesā un uzglabājot var pārveidoties, piemēram, aldehīdi un tioli oksidējas. Noārdīšanos sekmē polāri šķīdinātāji, jo daudzas pārvērtības notiek pēc jonu mehānismiem. Lai novērstu aromāta zudumus, izmanto iekapsulēšanu, polisaharīda suspensiju aromātvielas šķīdumā žāvējot izsmidzināšanas kaltē vai ekstrudējot, vai veidojot iekļāvuma kompleksus, piemēram, ar ciklodekstrīniem.

## 8. Pārtikas un bioloģiski aktīvas piedevas

Pārtikas piedevas ir savienojumi, kurus piejauc pārtikas produktam, lai iegūtu ķīmiskus, fizikālus vai fizioloģiskus efektus.

### 8.1. Pārtikas piedevu raksturojums un klasifikācija

Pārtikas piedevas atkarībā no to lietošanas mērķa iedala šādās grupās:

- **antioksidanti** – vielas, kas pagarina pārtikas produkta saglabāšanas laiku, aizsargājot to no oksidācijas izraisītas bojāšanās (piemēram, no tauku sasmakšanas, no krāsas maiņas);
- **apjoma palielinātāji** – vielas, kas sekmē pārtikas produkta tilpuma palielināšanu bez enerģētiskās vērtības ievērojamas palielināšanas;
- **biezinātāji** – vielas, kas palielina pārtikas produkta viskozitāti;
- **cietinātāji** – vielas, kas pēc pārstrādes procesa nodrošina stingrus vai kraukšķīgus augļus un dārzeņu audus, kā arī savienojumā ar recinātājiem veido vai nostiprina želeju;
- **emulgatori** – vielas, kas nodrošina divu vai vairāku nesajaucamu pārtikas produkta daļu (piemēram, eļļas un ūdens) sajaukšanos un homogēna maisījuma uzturēšanu;
- **emulģejošie sāļi** – vielas, kas izkliedē sierā esošās olbaltumvielas un tādējādi izraisa tauku un citu siera sastāvdaļu homogēnu izkliedi;
- **garšas pastiprinātāji** – vielas, kas pastiprina pārtikas produktam piemītošo garšu un/vai smaržu;
- **glazētāji** (arī smērvielas) – vielas, ko izmanto pārtikas produkta ārējās virsmas apstrādei, lai padarītu to spīdīgu vai izveidotu aizsargslāni;
- **iesaiņojuma gāzes** – gāzes (izņemot gaisu), kuras iepilda iesaiņojumā pirms vai pēc pārtikas produkta iesaiņošanas vai pārtikas produkta iesaiņošanas laikā;
- **irdinātāji** – vielas vai to maisījumi, kas, izdalot gāzes, palielina mīklas apjomu;
- **konservanti** – vielas, kas pagarina pārtikas produkta saglabāšanās laiku, aizsargājot to no mikroorganismu izraisītās bojāšanās;
- **krāsvielas** – vielas, ko izmanto pārtikas produkta krāsas mainīšanai vai atjaunošanai, tai skaitā pārtikas dabiskās sastāvdaļas un dabiskās izejvielas, kas atsevišķi netiek lietotas kā pārtika un ir iegūtas, fizikāli un/vai ķīmiski ekstrahējot pārtikas un citus dabiskus materiālus, tādējādi selektīvi ir ekstrahēti krāsvielu pigmenti, saglabājot uzturvielas vai aromātiskās sastāvdaļas;
- **miltu apstrādes līdzekļi** – vielas, kas uzlabo miltu vai mīklas cepamās īpašības;
- **mitrumuzturētāji** – vielas, kas darbojas pret sausa gaisa ietekmi un pasargā pārtikas produktu no izžūšanas vai veicina pulvera izšķīšanu ūdeni saturošā vidē;
- **modificētās cietes** – vielas, kas iegūtas, vienu vai vairākas reizes iedarbojoties ar ķīmiskiem reaģentiem uz neapstrādātu vai ar fizikālām vai fermentatīvām metodēm apstrādātu, balinātu vai ar skābi vai sārnu sašķeltu cieti;
- **pretsalipes vielas** – vielas, kas samazina pārtikas produkta daļiņu salipšanu;
- **propelenti** – gāzes (izņemot gaisu), kas izspiež pārtikas produktu no iesaiņojuma;
- **putu dzēsēji** – vielas, kas novērš vai samazina putošanu;
- **putu veidotāji** – vielas, kas nodrošina gāzveida fāzes homogēnu izkliedi cietā vai šķidrā pārtikas produktā;
- **recinātāji** – vielas, kas, veidojot želeju, strukturizē pārtikas produktu;
- **saldinātāji** – pārtikas piedevas, kuras lieto, lai piešķirtu pārtikas produktam saldu garšu, vai kā galda saldīnātājus;

- **sekvestranti** – vielas, kas veido ķīmiskus kompleksus ar metālu joniem;
- **skābes** – vielas, kas palielina pārtikas produkta skābumu un/vai piešķir tam skābu garšu;
- **skābuma regulētāji** – vielas, kas maina vai regulē pārtikas produkta skābumu vai bāziskumu;
- **stabilizētāji** – vielas, kas notur nemainīgu pārtikas produkta fizikālo un ķīmisko stāvokli un spēj noturēt pārtikas produktā savstarpēji nesajaucamu vielu homogēnu izkliedi, kā arī stabilizē, saglabā vai intensificē pārtikas produkta krāsu.

Par pārtikas piedevām neuzskata:

- **garšvielas un pārtikas produktus kaltētā vai koncentrētā veidā**, kuriem piemīt arī sekundāras krāsvielu īpašības (piemēram, paprika, turmeriks un safrāns) un kurus to aromātisko vai garšas īpašību vai uzturvērtības dēļ pievieno, ražojot saliktus pārtikas produktus;
- **krāsvielas, kuras izmanto pārtikas produktu ārējās neēdamās daļas** (piemēram, siera pārklāja un desas apvalka) krāsošanai;
- **pārtikas produktus ar saldinošām īpašībām**;
- **pārtikas apstrādes palīg līdzekļus** (vielas, ko lieto pārtikas apstrādei un kas nemainītā vai atvasinājumu veidā nonāk gatavajā produktā kā tehnoloģiski nenovēršams cilvēka veselībai nekaitīgs atlikums);
- **augu aizsardzībā lietojamās vielas**;
- **pārtikā lietojamus aromatizētājus**, kuri atbilst Ministru kabineta noteikumiem par aromatizētāju lietošanu pārtikā;
- **fermentus** (izņemot Latvijas Republikas Ministru kabineta noteikumu Nr. 86 pielikumos minētos fermentus);
- **vielas, kas tiek pievienotas pārtikai kā uzturvielas** (piemēram, minerālvielas, mikroelementi, vitamīni);
- **vielas, kuras izmanto dzeramā ūdens apstrādē**;
- **pektīnu saturošus produktus, ko iegūst no kaltētām ābolu spiedpaliekām, citrusaugļu mizām vai abu sajaukuma**, iedarbojoties uz tiem ar vāju skābi un pēc tam daļēji neitralizējot ar nātrija vai kālija sāļiem (“šķidrāis pektīns”);
- **košļājamās gumijas pamatsastāvu**;
- **modificētas cietes** (balto vai dzelteno dekstrīnu, apdedzinātu vai dekstrinētu cieti, ar skābi vai sārmu modificētu cieti, balinātu cieti, fizikāli modificētu cieti un ar amilolītiskiem enzīmiem apstrādātu cieti);
- **amonija hlorīdu**;
- **asins plazmu, pārtikas želatīnu, olbaltumvielu hidrolizātus un to sāļus, piena olbaltumvielas un lipekli**;
- **aminoskābes un to sāļus** (izņemot glutamīnskābi, glicīnu, cisteīnu, cistīnu un to sāļus) bez papildu funkcijām;
- **kazeīnu un kazeinātus**;
- **inulīnu**.

## 8.2. Pārtikas piedevu nekaitīgums

Pārtikas piedevas lieto patērētāja interesēs, un lietošanas iemesli ir šādi:

- lai saglabātu pārtikas **uzturvērtību**. Pārtikas uzturvērtības samazināšana ir attaisnojama tikai tad, ja šī pārtika **neveido** ievērojamu normālas **diētas daļu** vai pārtika tiek ražota patērētāju grupām ar **īpašām diētiskām prasībām**;

- lai nodrošinātu ar pārtiku patērētāju grupas ar **īpašām diētiskām prasībām**;
- lai **saglabātu** pārtikas **kvalitāti un stabilitāti** vai **uzlabotu** pārtikas **sensorās īpašības** – ar nosacījumu, ka netiek mainīts pārtikas saturs un īpašības tādā veidā, ka tiek **maldināts** patērētājs;
- lai **nodrošinātu** pārtikas ražošanu, apstrādi, sagatavošanu, iesaiņošanu, transportēšanu un uzglabāšanu, ja piedevu neizmanto, lai **slēptu** bojātu izejmateriālu vai nevēlamu (piemēram, nehigiēnisku) darba paņēmieni izmantošanu jebkurā no minētajiem procesiem.

Pārtikas piedevu lietošana ir atļauta tikai tad, ja:

- ir pamatota to lietošanas **tehnoloģiskā nepieciešamība** un šo mērķi **nevar sasniegt** ar citiem ekonomiski un tehnoloģiski iespējamiem līdzekļiem;
- ir zinātniski pierādījumi, ka pārtikas piedevas daudzumos, kādos tās lieto, **nerada draudus** patērētāja veselībai;
- **netiek maldināts** patērētājs.

Latvijas tirgū izplatāmo pārtikas produktu sastāvā drīkst būt tikai Latvijas Republikas Ministru kabineta noteikumu Nr. 86 “Noteikumi par obligātajām nekaitīguma prasībām pārtikai, kurā izmantotas pārtikas piedevas” pielikumos minētās pārtikas piedevas. Pārtikas piedevu maksimāli pieļaujamās devas un to lietošanas nosacījumi noteikti 1. pielikumā. Ja pārtikas produktam nav noteiktas pārtikas piedevu maksimāli pieļaujamās devas, var izmantot minēto noteikumu 2. pielikumā minētās pārtikas piedevas nereglementētā daudzumā, bet tās **nedrīkst pievienot** šādiem pārtikas produktiem:

- **neapstrādātiem pārtikas produktiem** – pārtikas produktiem, kas nav apstrādāti vai ir apstrādāti tā, ka nav mainījies produkta sākotnējais sastāvs (piemēram, dalīti, griezti, kapāti, mizoti, lobīti, malti, tīrīti, atdzesēti, sasaldēti, iesaiņoti produkti);
- medum;
- neemulģētām augu un dzīvnieku eļļām un taukiem;
- sviestam;
- pasterizētam un sterilizētam (arī ultra augstā temperatūrā sterilizētam) pienam un vājpienam;
- pasterizētam krējumam;
- nearomatizētiem, pēc fermentēšanas nekarsētiem piena produktiem;
- dabīgiem minerālūdeņiem un avotu ūdeņiem, kas atbilst Ministru kabineta noteikumiem par dabīgajiem minerālūdeņiem;
- kafijai (izņemot aromatizētu šķīstošo kafiju);
- kafijas ekstraktam;
- nearomatizētai lapu tējai;
- cukuram;
- makaroniem (izņemot makaronus bez lipekļa un makaronus, kas paredzēti diētām ar pazeminātu olbaltumvielu saturu);
- nearomatizētām paniņām (izņemot sterilizētas paniņas);
- zīdaiņiem un maziem bērniem paredzētiem pārtikas produktiem, kas atbilst noteikumiem par pārtiku zīdaiņiem un maziem bērniem.

Pārtikas piedevas, kas nav paredzētas pārdošanai mazumtirdzniecībā, var izplatīt tikai tad, ja uz pārtikas piedevas, uz pārtikas piedevu maisījuma vai uz pārtikas piedevu maisījuma ar citām vielām (kas pievienotas, lai atvieglotu pārtikas piedevu uzglabāšanu, pārdošanu, standartizēšanu, atšķaidīšanu vai šķīdināšanu) ārējā iesaiņojuma ar ūdensizturīgu krāsu valsts valodā skaidri un salasāmi sniegta informācija par katras pārtikas piedevas nosaukumu un starptautisko (E) numuru vai piedevas apraksts, norāde “lietošanai pārtikā” ar piezīmi par ierobežotu vai specifisku lietošanu, īpaši uzglabāšanas un lietošanas noteikumi, ja tādi ir nepieciešami; katra komponenta saturs procentos

vai adekvāta informācija par sastāvu, kas dod iespēju ievērot to lietošanas noteikumus, ja kāda komponenta daudzums pārtikas produktos ir ierobežojams, vai ierobežojamo komponentu saturs procentos, ja ierobežojums attiecas uz komponentu grupu, kurus var lietot atsevišķi vai kopā.

Pārtikas piedevas, kas paredzētas pārdošanai mazumtirdzniecībā, var izplatīt tikai tad, ja uz to iesaiņojuma bez augstāk minētās informācijas ir labi redzama un neizdzēšama norāde par minimālo derīguma termiņu, galda saldinātāja marķējumā jābūt norādei “galda saldinātājs satur...”, norādot sastāvā ietilpstošo saldinātājvielu nosaukumus, polioliem un/vai aspartāmu saturošu galda saldinātāju marķējumā jābūt brīdinājumiem: polioliem – “pārmērīga lietošana var izraisīt caureju”, aspartāmam – “satur fenilalanīnu”.

### 3.3 Toksiskie pigmenti

#### 3.3.1 Kadmija

## 9. Dažādu pārtikas vielu atlikumu ietekme uz produktu drošumu

### 9.1. Svešo vielu iekļūšana pārtikas produktos no apkārtējās vides

Rūpniecība un lauksaimniecība neizbēgami ietekmē apkārtējo vidi gan ar enerģijas, gan ķīmiskiem piesārņojumiem. Kaitīgās vielas no zemes, ūdeņiem un gaisa nokļūst augos, un, tos izbarojot dzīvniekiem, – arī dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos. Barības ķēdēs uzkrājas kaitīgām vielām, to koncentrācija pārtikas produktos var arī palielināties salīdzinājumā ar piesārņojumu vidē.

**Toksikoloģiskais** tādu vielu novērtējums, kuras kā palīgvielas lieto lauksaimniecības produktu ražošanā vai pārtikas pārstrādē, ir līdzīgs pārtikas piedevu nekaitīguma vai toksiskuma novērtēšanai. Pārbaudes jāveic vismaz uz divām dzīvnieku sugām (grauzējs un negrauzējs). Jāpārbauda ne tikai šo vielu īslaicīga iedarbība, bet arī ilgstoši visā dzīvnieka dzīves laikā un pat vairākās paaudzēs. Bez šaubām, ideāli būtu, ja nevēlamu piemaisījumu pārtikā nebūtu, bet šādu “nulles variantu” nav iespējams nodrošināt juridiski, jo ar pietiekami jutīgām metodēm katru vielu var atrast gandrīz ikvienā produktā.

Būtiski ir, cik lielu nevēlamu vielu daudzumu mēs uzņemam. D. Mendeļejevs ir teicis: “Nav kaitīgu vielu, bet ir kaitīgas to koncentrācijas,” kas būtībā ir pārfrazēts Paracelza izteikums pirms 460 gadiem: “Kas ir inde? Inde ir viss, un inde ir visur.”

Organismā eksistē reakcijas, ar kuru palīdzību tam svešas vai kaitīgas vielas tiek izvadītas. Šim nolūkam tās bioķīmiski ir jāpārvērš ūdenī šķīstošā vai ar to savietojamā formā (oksidējot, hidrogenējot, veidojot savienojumu ar polārām vielām vai micellas). Šajās pārvērtībās vielu kaitīgums var samazināties, bet var notikt arī pretējais.

Vielu var uzskatīt par nonākušu organismā, kad tā šķērsojusi kādu barjeru (membrānu) un nonākusi asinīs vai citos organisma šķidrums. Inde zarnās vēl nav inde organismā, ja nenotiek tās uzsūkšanās.

Aknas ir pirmās, kurās notiek iekļuvušo vielu ķīmiskas pārvērtības enzīmu ietekmē. Attiecīgo enzīmu aktivitāte atsevišķiem indivīdiem un vēl jo vairāk atšķirīgu sugu pārstāvjiem ir stipri atšķirīga. Bēdīgi slavenais dioksīns jūras cūciņai ir 5000 reižu kaitīgāks nekā kāminim.

### 9.2. Vielu toksiskuma novērtējums

**Toksiska substance** (inde) ir viela, kas pārsniedz noteiktu daudzumu (dozu) virs organisma spējas tai pretoties bez kaitējuma. Indes iedala:

- a) **kumulatīvās** indēs, kuras viegli absorbējas, bet izdalās lēni un tāpēc uzkrājas organismā;
- b) **nekumulatīvās** indēs, kuras ātri absorbējas un arī ātri izdalās, bet to bojājumi ir kumulatīvi.

Tipisks piemērs ir alkohols, kas bojā centrālo nervu sistēmu, kuņģi un izraisa aknu cirozi. To var pilnībā izdalīt no organisma, bet tā radītie bojājumi ir neatgriezeniski.

**Akūtais toksiskums**, ko izsaka ar lielumu  $LD_{50}$ , ir definēts kā vielas daudzums, kura uzņemšana 50% izmēģinājuma dzīvniekiem beidzas ar nāvi. Šo lielumu izsaka mg/kg ķermeņa svara. Sevišķi toksiskām vielām  $LD_{50}$  ir mazāks par 1 mg/kg, stipri toksiskām –  $1 < LD_{50} < 50$  mg/kg, vidēji toksiskām –  $50 < LD_{50} < 500$  mg/kg un mztoksiskām –  $500 < LD_{50} < 5000$  mg/kg.

**Hroniskais toksiskums** ir ilgstoši atkārtota, neletālu dozu vielu, kas izraisa kumulatīvus bojājumus, ievadīšana, piemēram, silikagoze vai asbestoze. **Sinergisms** ir vienas vielas iedarbības pastiprināšanās otras vielas klātienē.

Jebkurai vielai, lai tā izraisītu bioloģisku darbību, ir jābūt vismaz divām īpašībām:

- a) receptoru afinitātei,
- b) fizikāli ķīmiskai aktivitātei.

Toksiskās vielas darbības vieta (mērķorgāns) un toksicitātes pakāpe atkarīga no:

- a) specifisko receptoru lokalizācijas vietas,
- b) toksiskās vielas koncentrācijas uz receptoriem,
- c) receptoru nozīmības.

Neatkarīgi no toksicitātes mehānisma jāņem vērā:

- a) vai indei ir lokāla darbība (viena orgāna robežās),
- b) vai indei ir sistemātisks raksturs,
- c) vai toksicitāte ir atgriezeniska,
- d) vai indei ir primārs efekts, kas atkarīgs no toksiskās vielas esamības mērķorgānā, vai sekundārs efekts, kas var turpināties pat, ja tajā vairs nav toksiskās vielas.

Toksiskās vielas vispārējo darbību ietekmē:

- darbības raksturs,
- intensitāte,
- ilgums.

## 9.3. Toksiskie elementi

Industrijas attīstība un urbanizācija cilvēku arvien vairāk pakļauj kaitīgu vielu iedarbībai. Visvairāk šādas vielas tiek uzņemtas ar pārtiku, kurā tās nonākušas no augiem vai dzīvniekiem. Par nozīmīgākajiem neorganiskajiem pārtikas piesārņotājiem uzskatāms svins, kadmījs un dzīvsudrabs.

### 9.3.1. Svins

Svins biosfērā nonāk cieta atkritumu, izplūdes gāzu un notekūdeņu sastāvā no keramikajām rūpnīcām, akumulatoru un svinu saturošu izstrādājumu ražošanas, no krāsām, iespieddarbiem. Svina visvairāk ir virszemes dārzeņos un augļos ar negludu virsmu, no kuras to grūti vai neiespējami nomazgāt. Dzīvnieku valsts produktos svina visvairāk ir aknās, nierēs un kaulos. Cilvēka organismā iekšējos orgānos un kaulos akumulējas 5–10% uzņemtā svina, no kurienes tas var atsevišķos gadījumos izdalīties lielā koncentrācijā. Tas saistās ar cisteīna tiola grupām, kurām ir ļoti būtiska nozīme proteīnu telpiskās struktūras veidošanā, oksidēšanās–reducēšanās procesos, un enzīmu aktīvajos centros.

### 9.3.2. Kadmījs

Kadmījs vispirms akumulējas virsnieru dziedzerā garozas slānī, kas izstrādā stereoīdos hormonus, kuri regulē minerālvielu un ogļhidrātu vielmaiņu. Kadmija izvadīšanas pusperiods ir ļoti ilgs 10–30 gadi. Kadmījs ir cinka rūpniecības pavadītājelements. Tā savienojumus izmanto arī par minerālu pigmentu. Kadmiju satur notekūdeņu dūņas, fosfora minerālmēsli, fosilais kurināmais, vecāku liellopu nieres un aknas. Kadmiju ļoti selektīvi saista sēnes, ēdamie gliemji. Praktiski viss kadmījs, kas izdalās no cigaretēs, nonāk organismā.

### 9.3.3. Dzīvsudrabs

Arī dzīvsudrabu selektīvi saista sēnes un zivis. Sevišķi tas attiecas uz dzīvsudrabu saturošiem metālorganiskajiem savienojumiem. Akmeņogles sadedzinot, var izdalīties līdz 1 mg/kg dzīvsudraba.

## 9.4. Toksiskās organiskās vielas

### 9.4.1. Pesticīdi

Ar jēdzienu “pesticīdi” saprot vielas, kuras izmanto lauksaimniecības kaitēkļu (insektu, kāpuru, sēnīšu, grauzēju, gliemežu un nezāļu) apkarošanai. Pārtikas patērētāju aizsardzību realizē ar noteikumiem par augstākajām pieļaujamām koncentrācijām. Jāņem vērā visu iespējamo izomēru, analoģu un ražošanas blakusproduktu esamība, kurus katru atsevišķi novērtē ar toksiskuma ekvivalentu. Pie patērētāja drīkst nonākt tikai tādi produkti, kuros pesticīdu toksiskuma ekvivalentu summa nepārsniedz likumā noteiktās robežas.

### 9.4.2. Antibiotikas

Antibiotikas izmanto lopkopībā dzīvnieku ārstēšanā un daļēji arī kā piedevas pie barības. Normāli tās dzīvnieka organismā noārdās dažu dienu laikā, tomēr bieži antibiotikas konstatē dzīvnieka valsts izcelsmes pārtikas produktos, pienā, gaļā. Mājdzīvnieku nobarošanā atļauts lietot tikai tādus savienojumus, ko neizmanto humānajā medicīnā, lai novērstu pret šādām antibiotikām rezistentu slimību izraisītāju attīstību, kā arī jāievēro starplaiks starp medikamentu lietošanu un lopu kaušanu.

### 9.4.3. Pretstresa preparāti

Produktīvi dzīvnieki parasti ir ļoti uzņēmīgi pret dažāda veida stresiem, piemēram, liesās gaļas šķirnes cūkām ļoti samazinās gaļas kvalitāte, veidojas bāla, mīksta un ūdeņaina jeb PSE gaļa. Lai to novērstu, izmanto tireostatiskos preparātus, kas pazemina vairogdziedzera aktivitāti, vai trankvilizatorus, kuriem no dzīvnieka organisma jābūt izvadītiem līdz kaušanai. Pārvietošana uz kautuvi un atrašanās tajā dzīvniekam ir ļoti lielu stresu izraisoša situācija.

### 9.4.4. Veterinārie preparāti

Farmaceitiskā rūpniecība ražo vairākus tūkstošus dažādu preparātu, kas satur ap 300 bioloģiski aktīvu vielu. Starp tiem atsevišķi jāizdala anabolītiskie preparāti – dzimumhormoni vai to sintētiskie analogi, kurus izmanto dzīvnieku lielāka dzīvsvara sasniegšanai. Tā anabolītiskie preparāti darbojas kā dzimumhormoni, tie nedrīkst nonākt pārtikā. Šo preparātu konstatēšana gaļā ir ļoti sarežģīta, jo to koncentrācija nepārsniedz miljardās daļas.

### 9.4.5. Polihlorogļūdeņraži

Pie polihlorogļūdeņražiem pieder polihlordifenili, kurus agrāk izmantoja par siltumapmainītājiem dažādās iekārtās, polibromdifenili, kurus izmantoja automātiskajās ugunsdzēsšanas iekārtās. No tiem dabā viegli veidojas polihlordibenzo-p-dioksīni un polihlordibenzofurāni. Ar notekūdeņiem vai no dūmgāzēm tie nonāk pārtikas ķēdē, jo ir stabili un labi šķīst taukos. Šie savienojumi ļoti lēni izdalās un uzkrājas barības ķēdē. Baltijas jūras laši, reņģes un brētliņas ir “slaveni” ar lielo polihlorēto oglekļa saturu. 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksīns veidojas kā blakusprodukts 2,4-dihlorfenoksietiķskābes ražošanā. Polihlordibenzodioksīni un polihlordibenzofurāni rodas arī, sadedzinot organiskas vielas, kurās ir hlora savienojumi.

## 9.5. Veselībai kaitīgas vielas augos

### 9.5.1. Zilskābe

Zilskābi glikozīdiski saistītu cianhidrīnu veidā uzkrāj vairāk nekā 1000 augu: bambusa atvases, rūgtās mandeles, dažu augļu kauliņi un kodoli. Šūnas bojājot, specifiskas glikozidāzes atdala zilskābi saturošo aglikonu, kas vārot vai kuņģa sālsskābes ietekmē hidrolizējas, atbrīvojot zilskābi (ūdeņraža

cianīdu – HCN). Jau 1 mg/kg zilskābes var izraisīt cilvēka nāvi, jo tā iedarbojas uz elpošanas ķēdes pēdējo koenzīmu citohromoksidāzi, to inhibējot, tāpēc nevar notikt oksidēšanās un ATF veidošanās, kā arī bloķējas hemoglobīns.

### 9.5.2. Nitrāti

Nitrāti augos nonāk no slāpekļa minerālmēsliem, gumiņbaktērijām, kūtsmēsliem, vircas. Visi augi uzņem nitrātus, un tālāk tie tiek reducēti saules gaismas ietekmē, tāpēc no rītiem nitrātu saturs augu zaļās lapās ir pat divas reizes lielāks nekā pēcpusdienā. Sarkanās bietes, spināti, rutki, redīsi salāti nitrātus akumulē. Nitrāti sevišķi bīstami ir zīdaiņiem, jo to asinīs esošais embrija hemoglobīns oksidējas par methemoglobīnu divas reizes vieglāk nekā pieaugušo organismā, un methemoglobīna reduktāze ir mazāk aktīva. Methemoglobīns, kas  $Fe^{2+}$  vietā satur  $Fe^{3+}$ , nespēj transportēt skābekli.

Organismā nitrātu reducēšanās rezultātā rodas nitrīti, kuri ir vēl toksiskāki, jo reagē ar pirmējām un otrējām aminogrupām.

### 9.5.3. Skābeņskābe un glioksālskābe

Spināti, selerijas, sarkanās bietes skābenes un rabarberi parasti satur ievērojamu daudzumu **oksolātu**. Tie ir sevišķi kaitīgi cilvēkiem ar noslieci uzkrāt kalcija oksolātus nierakmeņos. **Glioksālskābes** daudz ir ērkšķogās, tā organismā oksidējas par skābeņskābi ar visām tai raksturīgajām sekām.

### 9.5.4. Goitrīnu veidojošie savienojumi

Kāpostos un citos krustziežos, kā arī sīpolos atrodami **izotiocianātus saturoši glikozīdi**, kas no bojātām šūnām izdalīto fermentu ietekmē veido brīvus izotiocianātus. Tie ciklizējas par aizvietotu tiooksazolidonu – goitrīnu, kas satur skābekli un slāpekli saturoša piesātināta pieclocēkļa heterocikla tioketona sistēmu. Šis savienojums darbojas kā antitirenoīds, tiroīdo hormonu sintēzes kavētājs un kākšļa attīstības veicinātājs. Minētie savienojumi ir arī to govju pienā, kas barotas ar krustziežus saturošu lopbarību. Arī pārmērīga sīpolu, sojas un valriekstu lietošana var izraisīt līdzīgu efektu.

### 9.5.5. Indīgie savienojumi pupās

Cūku pupas satur pirimidīna atvasinājumu **glikozīdus**, kuri oksidē reducēto glutationu, samazina glikozes 6-fosfāta dehidrogenāzes koncentrāciju, kas izraisa pāragru eritrocītu sabrukšanu. Pēc cūku pupu lietošanas eritrocītu sabrukšana var sākties cilvēkiem, kuriem ir minētā enzīma iedzimts deficīts. Dārza pupas satur lektīnus (fitohemaglutinātus) – proteīnus ar molekulmasu ap 100 000 Da, kas izraisa asins šūnu salipšanu vai leukocītu šūnu kodolu netiešu dalīšanos. Šie proteīni vārot sadalās, bet svaigā veidā var izraisīt nāvi. Pupas satur arī tripsīna un himotripsīna inhibitorus, kurus var inaktivēt ar vārīšanu.

### 9.5.6. Alkaloīdi

Daži augi satur alkaloīdus – bioloģiski aktīvus amīnus. Nozīmīgākie ir **salonīns** kartupeļos, kas pieskaitāms steroīdu glikozīdiem. Tā saturs palielinās gaismā turētos kartupeļos. Salonīna glikozīdi koncentrēti mizā un zemzīdas audos, tāpēc tie, būdami ūdenī šķīstoši, pāriet ūdenī, un palikusī koncentrācija nav bīstama. Salonīns izsauc kuņģa darbības traucējumus, dedzināšanu kaklā, vemšanu, nieru kairinājumu un eritrocītu sairšanu. Letāla doza ir 400 mg. Līdzīgas uzbūves **tomadinīns** sastopams tomātos, **sparteīns** – lupīnu sēklās.

**Pirolizidīna** (divu kondensētu pieclocēkļa ciklu ar kopēju slāpekļa atomu) rindas alkaloīdi sastopami **kurvjziežos**, labības nezālēs. Pārtikā šie alkaloīdi nonāk ar nelielu labības nezāļu graudu piejaukumiem, medu, pienu, neparēzi ievāktām zāļu tējām.

### 9.5.7. Ēdamo sēņu toksīni

Ēdamajās sēnēs ir toksīns **giromitrīns**, kuru var uzskatīt par hidrazīna atvasinājumu, kas tomēr vārot sadalās. Tas rada kuņģa un zarnu darbības traucējumus, plaušu un nieru bojājumus un pat plaušu atrofiju un nāvi, tam piemīt arī kancerogēna aktivitāte. Hidrazīna atvasinājums ir arī **agaritīns**, ko satur svaigi šampinjoni. Šis alkaloīds un tā metabolīti ir kancerogēni.

### 9.5.8. Toksīni burkānos

Burkāni satur **miristicīnu**, kas šķīst organiskos šķīdinātājos. Toksikoloģija nav zināma, bet ir zināmi vairāki desmiti letālu gadījumu cilvēkiem, kuri regulāri lietojuši lielus daudzumus burkānu sulas.

### 9.5.9. Furanokumarīni

Furanokumarīnus satur selerijas, pētersīļi un pastinaki, kas ražas novācējiem var izraisīt inducētus dermatītus. Bojātos augos to koncentrācija palielinās.

### 9.5.10. Medus toksīni

Ja bites ievāc daudz acāliju un rododendru nektāra, tad **grajanotoksīns** no šo augu ziediem nonāk medū. Šim toksīnam ir atropīnam līdzīga toksiska iedarbība, kas izraisa paralīzi un sirdsdarbības paātrināšanos.

### 9.5.11. Ēterisko eļļu toksiskums

Ēteriskajām eļļām ir intensīvs aromāts, tāpēc tās lieto garšas korekcijai, tomēr daži no to sastāvā esošajiem savienojumiem ir toksiski. **Miristicīns** un **elimicīns**, kas sastopami **muskatriekstos**, ir **halucinogēni**. Miristicīns darbojas kā **monooksidāzes** inhibitors, kas palielina epinefrīna un norepinefrīna (adrenalīna un noradrenalīna) daudzumu smadzenēs. Pēc pārmērīgas muskatriekstu lietošanas novēro optiskās halucinācijas, tahikardiju, asinsspiediena svārstības. Līdzīgas darbības **apiolu** satur pētersīļu sēklas. Lauru lapas, fenhelis, anīsa augļi satur **safrolu**, kas pēc uzbūves līdzīgs miristicīnam. Bišu amoliņā esošais **kumarīns** ir inde un asins **antikoagulants**. Vermuta aromatizēšanai izmantotie salviju un vērmeļu laksti satur **tujonu**, kas izraisa smagus nervu bojājumus un pat epilepsiju.

## 9.6. Zivju un gliemju toksīni

Zušu un nēģu asinīs ir stipri toksīni, kas izsauc muskuļu vājumu un elpošanas paralīzi. Karpas un līdakas pieņi un ikri satur caureju un vemšanu izraisošus toksīnus un var radīt elpošanas traucējumus. Dažu zivju indes, iespējams, cēlušās no barībā izmantotām aļģēm vai vienšūņiem. Austeres var saturēt ārkārtīgi toksisko **saksitoksīnu**, kuru tās iegūst no sīkbūtnēm, kas pastiprināti savairojas siltā ūdenī. Saksitoksīns ir spēcīga **nervu inde**, ko izskaidro ar nātrija jonu vadīšanas traucējumiem nervaudu membrānās. Visvairāk toksīnu zivīs ir nārsta laikā.

## 9.7. Baktēriju toksīni

Pārtikas produktu bakteriāla infekcija var izraisīt pārtikas produktu enzimatisku sašķelšanu. Piemēram, laktobaktērijas no laktozes veido pienskābi, bet gaļā tās noārda olbaltumvielas, veidojot toksiskos biogēnos amīnus **kadaverīnu** (no lizīna) un **putrescīnu** (no ornitīna), kuri **kopā ar fenolu, krezolu, saktolu, indolu, amonjaku un sērūdeņradi veido "līķu indes"**. Mikroorganismi izdala arī baktēriju toksīnus, kas ir **proteīni vai to kompleksi** ar ogļhidrātiem un lipīdiem. **Eksotoksīnus**, piemēram, **botulīntoksīnu**, veido grampozitīvās baktērijas, bet **endotoksīnus** – gramnegatīvās baktērijas.

Eksotoksīni no mikroorganismiem izdalās apkārtējā vidē tūlīt pēc to veidošanās, turpretī endotoksīni uzkrājas mikroorganismu šūnās un apkārtējā vidē nonāk tikai pēc baktēriju šūnu noārdīšanas.

**Salmonellas** dzimtas mikroorganismi gandrīz vienmēr nonāk dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos vai nu nokautā dzīvnieka primārā infekcijā, vai nepietiekami ievērojot tīrību. Salmonellas visbiežāk inficē ūdensputnu olas. Lietojot ar tām inficētu pārtiku, novēro nelabumu, vemšanu vai pat tīfu. Salmonellu infekcija cilvēkā var saglabāties ilgi.

**Stafilokoki** izdala termiski izturīgus toksīnus, kas izsauc nelabumu un caureju.

Anaerobā baktērija *Clostridium botulinum* attīstās noslēgtā vidē un izdala **neirotoksīnu**, kura  $LD_{50}$  ir  $0,8 \times 10^{-6}$  mg/kg. Tas ir viens no stiprākajiem toksīniem. Saindēšanās pazīmes ir nelabums, redzes dubultošanās un rīšanas traucējumi, kam seko nāve elpošanas paralīzes dēļ. Visbiežāk ir inficēts vārīts šķiņķis, nepietiekami kūpinātas zivis, olbaltumvielas saturoši konservi, uz ko norāda kārbas uzpūšanās. Ilgstoši karsējot virs  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , toksīns noārdās.

Enteropatogēnā *Escherichia coli* baktērija tiek pārnēsāta ar netīrumiem un izdala termiski izturīgu toksīnu, kas izsauc kuņģa un zarnu darbības traucējumus.

**Listērijas** ir plaši izplatītas normāli nekaitīgas baktērijas, bet personām ar novājinātu imūnsistēmu tās izsauc gripai līdzīgu saslimšanu līdz pat smadzeņu apvalka iekaisumam, kas var izraisīt nāvi. Infekciju var iegūt no mīkstiem un pastveida sieriem, sieru mizas, nepasterizēta siera un maltas gaļas.

## 9.8. Biogēnie amīni

**Biogēnie amīni** ir aminoskābju noārdīšanās produkti, kas veidojas, tām dekarboksilējoties. Sastopami bojātā gaļā. Daļēji tos noārda zarnu mikrofloras monoamino oksidāzes. **Histamīns** bagātīgi veidojas skumbrijās, tunzivīs, jo to muskuļos ir neparasti daudz histidīna. Noārdīšanai pakļautas svaigas zivis. Izveidojies histamīns, pat konservējot kārbās, nenoārdās. Daudz histamīna var būt arī skābētos kāpostos, sarkanvīnā, Čedaras, Rokforas un dažu citu šķirņu sieros. Visiem šiem produktiem kopēja ir mikroorganismu izmantošana produkta ražošanā. Histamīns palielina kapilāru caurlaidību (nātrene) un izraisa asinsspiediena pazemināšanos.

**Melnie graudi – vilka zobi** veidojas galvenokārt uz rudziem sēnīšu iedarbībā. Tie ir ļoti indīgi, ko izraisa tuvu pussimtam savienojumu, kurus var uzskatīt par lizergīnskābes atvasinājumiem. Saindēšanās sākas ar krampjiem un beidzas ar nāvi.

## 9.9. Mikotoksīni

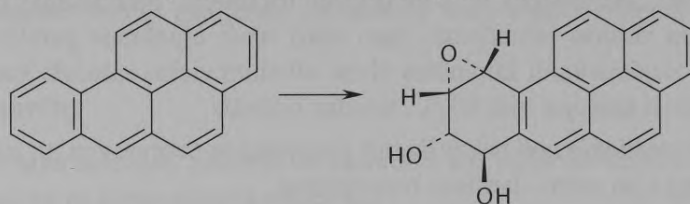
Pelējuma sēnītes var veidot vairākus netipiskus ārkārtīgi toksiskus produktus. Piemēram, **aflatoksīni**, kas satur furokumarīna sistēmu un ir ļoti spēcīga aknu inde (izraisa aknu nekrozi) un ir stipri kancerogēni. Tie pēc metabolizācijas iedarbojas uz DNS un RNS. Sieru ražošanā izmantotie pelējumi aflatoksīnus neizdala. Vairāk nekā 120 pelējuma sēnīšu izdala mikotoksīnus, kas izraisa vēzi, aknu un nieru bojājumus, ir mutagēni, teratogēni, neirotoksiski, hemorāģiski.

## 9.10. Toksīnu veidošanās pārtikas tehnoloģiskajos procesos

### 9.10.1. Policikliskie arēni

Pirmo reizi darvas spēju izraisīt ādas vēzi novēroja 1915. gadā. Pēc dažiem gadiem no tās izdalīja vairākas vielas, kuras bija vainojamas vēža izraisīšanā. Tie izrādījās **policikliskie aromātiskie ogļūdeņraži** ar **kondensētiem** cikliem. Šie savienojumi sastopami visur un veidojas, sadegot oglekli saturošiem savienojumiem pēc radikāļu mehānisma. Tie ir ūdenī nešķīstoši, tomēr tos atrod ūdenī, ko izskaidro ar micellu veidošanos ar virsmas aktīvām vielām. Augi šos savienojumus uzņem no augsnes. Apkārtējā vidē atrasti vairāk par 100 šādu savienojumu, un to klāsts pakāpeniski papildinās,

uzlabojoties analīžu metodēm. Šie savienojumi rodas arī pārtikas termiskajā apstrādē, it sevišķi grilējot uz kokogļēm. Optimālā benzopirēnu veidošanās temperatūra ir 500–700 °C. Policikliskos ogļūdeņražus satur arī gaļas un citu produktu žāvēšanā izmantotie dūmi, tāpēc pēdējā laikā pieaug interese par dūmu preparātiem, kas būtībā ir dūmu kondensāti, kuri pēc tam attīrīti no policikliskajiem arēniem. Par vienu no spēcīgākajiem kancerogēniem uzskata **benzopirēnu**. Būtībā kancerogēna aktivitāte nepiemīt pašam ogļūdeņradim, bet gan tā metabolisma produktiem – tā epoksīdam un dihidrosavienojumiem, kuru plakanās un polāro grupu vai grupas saturošās sistēmas var mijiedarboties ar gēniem, traucējot to pareizu replikāciju un translāciju. Metabolisma produktu veidošanās izskaidrojama ar organisma tieksmi pārvērst hidrofobo savienojumu hidrofilā savienojumā, kuru varētu izdalīt no organisma.



9.1. att. Benzopirēna diola epoksīda veidošanās oksidācijā

### 9.10.2. Nitrozamīni

Nitrozamīni rodas, otrējiem amīniem reaģējot ar slāpekļpaskābes savienojumiem. Tie ir ārkārtīgi indīgi un jau mazās devās var izraisīt vēzi. Pārtika var saturēt gan otrējos amīnus, gan nitrītus, kad nitrozamīnu veidošanos var izsaukt ārēji faktori. Šie savienojumi var veidoties kuņģa zarnu traktā, nitrātiem ar zarnu mikrofloru reducējoties par nitrītiem. Galvenie nitrātu un nitrītu avoti ir dārzeņi un žāvētas un sālītas gaļas izstrādājumi. Nitrītu veidošanos katalizē arī siekalas. Nitrozamīnu kancerogēno iedarbību izskaidro ar alkildiazosavienojumu veidošanos to pārgrupēšanās reakcijā un DNS alkilēšanu.

### 9.10.3. Etilkarbamāts

Etilkarbamātu var pielikt pārtikas produktam kā konservantu, vai tas var veidoties no kauliņaogļu amigdālīna vai karamoilfosfāta reakcijā ar etanolu rūgšanas laikā. Tas ir vēzi izraisošs savienojums.

### 9.10.4. Proteīnu un aminoskābju veidoti mutagēni

Mutagēnas īpašības ir grauzdētai kafijai, gaļas ekstraktiem, maizei, ceptai gaļai un citiem termiski apstrādātiem produktiem, kas satur proteīnus. Mutagēns ir arī ābolu, jāņogu un bumbieru krāsviela flavonoīds – kvartecīns, kas uzrāda mutagenās īpašības pēc atbrīvošanās no glikozīda organismā. Mutagēni savienojumi – heterocikliskie amīni veidojas grilētos produktos, olbaltumvielas saturošiem šķidrumiem, piemēram, marinādei, nopilot uz oglēm vai stipri sakarsētas virsmas. Šajā ziņā kaitīgākas ir **zivis**, kuras kūpinātas pēc karstās kūpināšanas tehnoloģijas. Lielākoties šo savienojumu mutagenitāte parādās vai ievērojami pastiprinās, metabolizējoties organismā.

## 9.11. Pārtikas produktu intolerance

Dažu pārtikas produktu lietošana noteiktiem cilvēkiem var izsaukt pārmērīgi jutīgu reakciju – sāpes kuņģī, caureju, lūpu un rīkles pietūkumu, iesnas, konjunktivītu un bronhiālo astmu vai pat anafilaktisko šoku. Grūti pierādīt konkrētu mehānismu, jo tie var būt dažādi ar vienādām izpausmēm.

## Pārtikas produktu intolerances iedalījums

Saslimšana	Mehānisms	Simptomu izraisītāji
Alerģija	Imūnreakcija	Galvenokārt dažādu pārtikas produktu proteīni vai glikoproteīni
Pseudoalerģiskas reakcijas (PAR)	Citi, izņemot imūnreakciju	Pārtikas produktu un piedevu mzamolekulāras vielas
Intolerances reakcijas	Enzīmu defekti	Laktoze, fruktoze, galaktoze, fenilalanīns
Intoksikācijas	Farmakoloģiska vai toksikoloģiska iedarbība	Biogēnie amīni, alkaloīdi, baktēriju toksīni, mikotoksīni, piesārņojumi

## 9.11.1. Alerģija

Alerģija ir iegūta organisma reakcija uz ārējās vides kairinājumu, kuru izraisa atkārtots kontakts ar alergēnu. Alerģēns – viela, kas izraisa alergisku reakciju.

Alerģiju pret pārtikas produktiem sauc par “pārtikas produktu alerģiju” (PPA). Tās rašanās iespējama mehānisms: B-šūnas (limfocīti) kontaktējas ar patiesībā nekaitīgo alergēnu, ar saviem receptoriem saista to, un tas ar endocitozes mehānismu nonāk šūnā. Notiek šūnas ģenētiskās informācijas pārgrupēšanās ar alergēna līdzdalību, veidojas jaunas sensibilizētas (paaugstinātas jutības) meitas šūnas, kas satur alergēnam specifiskus receptorus. Šo meitas šūnu kontakts ar alergēnu izraisa tālāku šūnas specializēšanos, un rezultātā rodas plazmatiskās šūnas, kas ir specializējušās attiecīgā alergēna imūnglobulīna IgE (antidaļiņas) producēšanai un ievada to asinīs. Antidaļiņas ir glikoproteīni, kas spēj specifiski saistīt antigēnu ar diviem centriem, kurš šajā gadījumā ir alergēns. Tās saistās ar imūnsistēmas šūnām bazofiliem un tuklajām šūnām uz to virsmas. Šajās šūnās, kuru virsmu noklāj antidaļiņas, sintezējas un uzkrājas histamīna, serotonīna un leikotriēnu rezerves. Ir notikusi īstā sensibilizācija.

**Atkārtota kontakta** gadījumā ar alergēnu sākas īstā alergiskā reakcija. Divām antidaļiņām uz tuklās šūnas virsmas ar nekovalentajām saitēm specifiski saistot alergēna molekulu, tiek izsaukta tuklās šūnas granulās uzkrāto mediatoru izdalīšana. Izdalītie mediatori izraisa gludās muskulatūras saraušanos blakus audos, pieaug asins kapilāru caurlaidība, parādās piesarkums, uztūkums un nieze. Imūnreakcijā var iesaistīties imūnsistēmas B- un T-šūnas, kas var izsaukt 9.1. tabulā minētās izpausmes.

Alerģiskas reakcijas nav atkarīgas no dozas, tikai eksistē zems kairinājuma sliekšnis, kas atsevišķos gadījumos var būt pat daži pikogrami. Tendence uz šādām alerģijām ir iedzimta. Tā vēl vairāk pastiprinās, ja mazulis nav saņēmis imūnglobulīnus ar mātes pienu.

**Alerģēni** pārsvarā ir pārtikas produktu parastās sastāvdaļas **proteīni** un **glikoproteīni**, no kuriem daži ir ļoti stabili, piemēram, zemesriekstos un lazdu riekstos. Augļos un dārzeņos šie proteīni ir termiski nestabili. Proteīnu spēja izraisīt alerģiju izskaidrojama ar **endocitozi** (pinocitozi), kad zarnu epitēlija šūna satur receptorus, kuri ir specifiski pret kādu iecirkni alerģiju izsaucošā proteīnā. Saistoties ar šo proteīnu, receptori izsauc membrānas ieliekšanos, pakāpeniski izveidojot iedobumu, kuru tās plūstamības dēļ noslēdz membrāna. Izveidojas mazs pūslītis, kas satur adsorbēto proteīnu. Adsorbētais proteīns šajā pūslītī var tikt transportēts uz lizosomām, kur tas tiek hidrolizēts līdz nekaitīgām aminoskābēm un arī izdalīts no šūnas eksocitozes ceļā asinīs, kur izsauc imūnreakciju. Šāds mehānisms raksturīgs bērna organismam pēc piedzimšanas, lai uzņemtu imūnvielas no mātes, un tas pakāpeniski izzūd.

**Antigēnam jābūt polimēram.** Antigēna daļu, kas saistās ar receptoriem, sauc par **haptēnu**, un tam jābūt polimēra sastāvā vai cieši ar to saistītam. Šī iemesla dēļ PPA reti sastopama attiecībā pret pārtikas piedevām, svešām vielām jeb piesārņojumiem.

Alerģijas izraisa arī pārtikas rūpniecības internacionalizācija, jo nākas sastapties ar jaunām eksotiskām pārtikas komponentēm. Arī termiski neapstrādātu pārtikas sastāvdaļu izmantošana,

piemēram, graudu muslis, palielina alergijas izveidošanos. Alerģijas maziem bērniem bieži izraisa olas un govju piens, pieaugušajiem – ziedputekšņi. Ziedputekšņi var veicināt arī alergijas izveidošanos pret citiem produktiem, piemēram, augļiem un dārzeņiem, jo to sastāvā var būt alergēna IgE haptēni.

### 9.11.2. Pseudoalerģiskas reakcijas

Pseudoalerģiskām reakcijām ir alergiskām reakcijām līdzīga klīniskā aina, bet tās izraisa fizioloģiski aktīvu vielu izdalīšanās, ko neizsauc iepriekš apskatītā imūnreakcija. Pretēji alergijai šīs reakcijas ir **atkarīgas no devas**, un nav nepieciešama specifiska sensibilizācija, tāpēc reakcija ir jau ar pirmo kontaktu. Šo reakciju nevar pārnest uz citu subjektu ar asins antidaļiņu serumu, un tā nav konstatējama ar ādas testiem. Pseudoalerģiju mehānismi ir dažādi, bet tie visi noslēdzas ar mediatoru atbrīvošanos no tuklajām šūnām. Pseudoalerģiju **var izraisīt mazmolekulāras vielas**.

### 9.11.3. Intolerances reakcijas

Intolerances reakciju pamatā ir iedzimti enzīmu defekti, kas saistīti ar atbilstošo gēnu bojājumiem, tādējādi nesintezējas atbilstošais enzīms vai arī tas ir ar izmainītu struktūru un tāpēc neaktīvs. Ja neeksistē bioķīmiskie apkārtceļi, tad metaboliskās pārvērtības ar doto substrātu nevar notikt, un tas uzkrājas audu šūnās, tās bojājot.

**Laktozes intolerance** izpaužas kā laktāzes (kas šķeļ  $\beta$ -glikozīdās saites laktozē) nepietiekamība vai aktivitātes zudums. Laktāze visaktīvākā ir zīdaiņiem, bet pieaugot tās aktivitāte samazinās. Samērā izplatīta tā ir Eiropas ziemeļrietumu tautām, mazaktīva – Āzijas un Āfrikas iedzīvotājiem. Ja laktāze netiek šķelta un tās uzsūkšanās nenotiek, nonākot resnajā zarnā tā veicina pūšanas baktēriju attīstību un to toksīnu izdalīšanos. Laktoze izraisa zarnu satura osmomolaritātes palielināšanos, kas izraisa caureju.

**Fruktozes intolerance** cēlonis ir fruktofosfāta aldolāzes (kas šķeļ fruktozes 1-fosfātu par dihidroksiacetona fosfātu un glicerāldehīdu) deficīts vai defekts. Rezultātā nesašķeltās fruktozes 1-fosfāts uzkrājas šūnā un var izraisīt glikēmisko šoku un pat nāvi, sevišķi maziem bērniem.

**Galaktozes intolerance** ir galaktokināzes, un sevišķi galakto-1-fosfatiltransferāzes deficīts. Pirmā enzīma trūkumu daļēji var kompensēt heksokināze, bet otrais ir specifisks galaktozes-1 fosfātam, un galaktoze nevar pārvērsties glikozē un metabolizēties. Šūnās uzkrājas galaktozes fosfāti, bet asinīs galaktoze, kas samazina glikozes koncentrāciju asinīs, rezultātā tiek traucēta smadzeņu darbība un rodas garīgi traucējumi.

**Fenilketonūrija** ir iedzimta slimība, ko izsauc fenilalanīna hidroksilāzes deficīts, kas neļauj pārvērst fenilalanīnu tirozīnā. Fenilalanīns un tā deaminēšanās produkts fenilpiruvāts uzkrājas asinīs un izdalās ar urīnu. Slimība rada smagus garīgus traucējumus.

**Kļavas sīrupa slimība** ir iedzimts sazarotas ķēdes aminoskābju dekarboksilāzes trūkums, kas palielina leicīna, izoleicīna un valīna uzkrāšanos bioloģiskajos šķidrumos un atbilstošu hidroksiskābju veidošanos.  $\alpha$ -hidroksisviestskābe, izdaloties ar urīnu, piedod tam dedzināta cukura smaržu, no kā radies slimības nosaukums.

**Sulfītu intoleranci** izsauc iedzimts aknu sulfītoksidāzes deficīts.

**Koliakija** rodas, ja tievo zarnu gļotādu šūnās trūkst specifiskas peptidāzes, kas šķeļ labības līpekļa gliadīnu.

### 9.11.4. Toksiskas reakcijas

Dažām toksiskām reakcijām, kas aprakstītas iepriekš, tomēr ir alergiskām un pseudoalerģiskām reakcijām līdzīgi simptomi. Toksiskas reakcijas izsauc vielas **toksiska vai farmakoloģiska iedarbība**, bet tās **neizsauc iekaisumu izraisīto mediatoru izdalīšanos**.

Toksiskas vielas pārtikas produktos var rasties:

- dabīgā biogēnā ceļā, piemēram, alkaloīdi, biogēnie amīni u. c.;
- no bioloģiskas izcelsmes piesārņojuma, mikroorganismu toksīniem;
- no blakusproduktu nepietiekamas atdalīšanas;
- no piesārņojuma apkārtējā vidē;
- no pārtikas piedevām, kas atsevišķiem cilvēkiem izraisa saindēšanos, piemēram, "ķīniešu restorānu sindroms" no glutamāta.

## 10. Neorganisko analītu noteikšanas metodes

Visus analizējamus ķīmiskos parametrus var iedalīt divās lielās grupās – neorganisko un organisko analītu noteikšanai. Organisko savienojumu analīzē mūsdienās pārsvarā dominē hromatogrāfiskās analīzes metodes, turpretī neorganisko analītu noteikšanai lieto vairākas analīzes metodes: optiskās analīzes metodes, elektroķīmiskās metodes, kā arī pēdējā laikā – jonu hromatogrāfiju.

Lai gan testēšanas laboratorijās joprojām lieto klasiskās analīzes metodes, arvien vairāk laboratoriju praksē ienāk modernās instrumentālās analīzes metode. Ir plaši pieejama literatūra angļu valodā par modernām instrumentālām analīzes metodēm, ieskaitot pārtikas analīzes jomu, taču latviešu valodā trūkst mācību līdzekļu. Klasiskās analīzes metodes latviešu valodā ir labi izklāstītas R. Matiseka, F. M. Šnēpela un G. Šteineres grāmatā “Pārtikas analītiskā ķīmija”. Analītisko metožu teorētiskos pamatus var apgūt pēc E. Jansona grāmatas “Analītiskās ķīmijas teorētiskie pamati”. Nelielu ieskatu mūsdienu instrumentālās analīzes metodēs var gūt S. Pastares, R. Gigeles un A. Vīksnas grāmatā “Dzeramais ūdens”. Šīs nodaļas mērķis ir sniegt īsu pārskatu par mūsdienu instrumentālajām metodēm pārtikas analīzes jomā.

Instrumentālās metodes laboratorijās un izvēle neorganisko analītu noteikšanai pārtikas produktos ir atkarīga no vairākiem faktoriem:

- laboratoriju finansiālās iespējas un analīzes izmaksas;
- metodes ražīguma;
- metodes noteikšanas robežas un traucējošiem faktoriem;
- pieejamā parauga daudzuma analīzēm;
- nosakāmiem elementiem, savienojumiem;
- darbinieka iemaņām un pieredzes un vēl citiem faktoriem.

Daži biežāk lietoto metožu raksturlielumi apkopoti 10.1. tabulā.

10.1. tabula

Dažu metožu raksturlielumi

Metode	Veiktspēja	Konc. diapazons	Metodes ātrums	Detektēšanas robežas	Mineralizācijas pakāpe
<b>Foto</b>	mono	+	+	mg/L	++
<b>F-AAS</b>	mono	+	+	< mg/L	++
<b>H-AAS</b>	mono	+	+	≤ μg/L	++
<b>CV-AAS</b>	mono	+	+	ng/L	++
<b>CV-AFS</b>	mono	+	+	pg/L	++
<b>ET-AAS</b>	mono/oligo	+	+	< μg/L	++
<b>ICP-OES</b>	multi	++	+++	< mg/L	++
<b>ICP-MS</b>	multi	+++	+++	< μg/L	++/+++
<b>DPASV</b>	oligo	++	++	< μg/L	+++
<b>SP</b>	oligo	++	++	< μg/L	+ / ++
<b>XRF</b>	multi	+++		mg/kg	nē
<b>TXRF</b>	multi	+++		< μg/L	+++
<b>INAA</b>	multi	+++			nē

*Paskaidrojumi:* + zema; ++ vidēja; +++ augsta; Foto – fotometrija; F-AAS – liesmas atomabsorbciometrija; H-AAS – hidrīda atomabsorbciometrija; CV-AAS – augstā tvaika atomabsorbciometrija; CV-AFS – augstā tvaika atomu fluorescences spektrometrija; ET-AAS – elektrotermālā atomabsorbciometrija; ICP-OES – induktīvi saistītās plazmas optiskās emisijas spektrometrija; ICP-MS – induktīvi saistītās plazmas masspektrometrija; DPASV – diferenciālā impulsa anodiskā stripinga voltamperometrija; SP – stripinga potenciometrija; XRF – rentgenfluorescence; TXRF – pilnīgi atstarotā rentgenfluorescence; INAA – instrumentālā neitronu aktivācijas analīze.

Lai nodrošinātu analītisko mērījumu kvalitāti, ir jāapzinās, ka modernie analītiskie mērinstrumenti nav galvenā atslēga analītiskajai metodei. Ir vēl vairāki analītiskās metodes pamatkomponenti, kuriem jāpievērš liela uzmanība. Tie ir:

- pārtikas produkta parauga ņemšanas metode, lai izvēlētos reprezentatīvu paraugu;
- parauga transportēšana un uzglabāšana;
- paraugu sagatavošanu analīzēm;
- mērījumu rezultātu izvērtēšana.

Pietiekamu informāciju par dažādām pārtikas produktu analīzes metodēm var iegūt, iepazīstoties ar LVS, ISO, EPA un citām standartmetodēm. Šajā nodaļā bez instrumentālo metožu pārskata nedaudz uzmanības tiks veltīts paraugu sagatavošanai analīzēm.

Tā kā pārtikas produktu sortiments ir ļoti daudzveidīgs, tad parauga sagatavošanas metodes izvēli nosaka parauga agregātstāvoklis, nosakāmā elementa daba un daudzums paraugā. Ja jānosaka makrokomponenti paraugā, tad mūsdienās izmanto arī klasiskās paraugu sagatavošanas metodes neorganiskajai analīzei. Galvenā pamatprasība parauga sagatavošanas procesā ir pārvērst paraugu analīzes metodei pieņemamā agregātstāvoklī un novērst traucējošo savienojumu (parasti tie ir organiskie savienojumi) ietekmi analīzes gaitā. Lielākajai daļai analīzes metožu pamatprasība ir pārvērst analizējamo paraugu šķīdumā. Lai to panāktu, ir jāveic parauga mineralizācija. Paraugu sadalīšana vai mineralizācija nepieciešama, lai cieta analizējamo vielu sastāvdaļas iegūtu šķīdumos dažādām ķīmiskajām noteikšanām vai arī lai sadalītu organiskās vielas par neorganiskiem savienojumiem. Lai varētu noteikt mikroelementu saturu augu valsts vai pārtikas produktos, ir nepieciešams apstrādāt paraugus tādā veidā, lai iegūtu t. s. pelnu šķīdumus. Paraugu pārpelnošanu var veikt sausās un slapjās mineralizācijas ceļā.

**Sausā mineralizācija** ir pārtikas produkta organiskās daļas sagraušana termiskās apstrādes ceļā. Analizējamo vielu ievieto kvarca, porcelāna vai platīna tīģelī un izkarsē mufelkrāsnī, pakāpeniski palielinot karsēšanas temperatūru līdz 500–550 °C. Atlikums pēc izkarsēšanas satur tikai neorganiskas vielas, piemēram, sārmzemju metālu karbonātus, kas veidojušies, organisko vielu ogleklīm oksidējoties līdz oglekļa dioksīdam. Šādā veidā mineralizējot paraugu, nevar noteikt paraugā esošos halogēnīdus, fosforu, arsēnu, dzīvsudrabu, kadmiju, sēru un citus, sevišķi tos, kas reducējas ar oglekli, kurš veidojas, karsējot organiskās vielas. Metodes priekšrocības – ļoti vienkārša, neprasa sarežģītu aprīkojumu, viegli izpildāma. Trūkumi – termiskās apstrādes rezultātā var rasties dažu nosakāmo elementu zudumi, pats mineralizācijas process ir ilgstošs (atkarībā no ņemtā parauga dabas mineralizācijas process ilgst no 3 līdz 30 stundām) un, piemēram, zivju paraugu karsēšana rada nepatīkamu smaku.

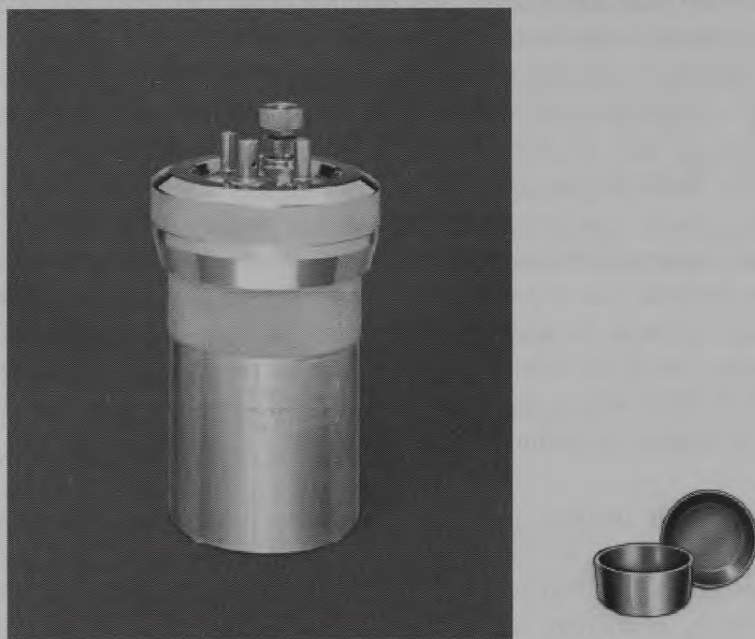
**Slapjā mineralizācija.** Organiskās vielas pārtikas produktā tiek pilnīgi noārdītas, paraugu karsējot uz plītiņas stikla vai kvarca trauciņos koncentrētu skābju (sērskābes, perhlorskābes vai slāpekļskābes) un ūdeņraža peroksīda klātbūtnē. Metode izmantojama visa veida pārtikas produktiem, izņemot vīnus, augu eļļas, margarīnu, sviestu. Priekšrocība – veicot slapjo mineralizāciju, tiek novērsti mikroelementu zudumi. Taču ir divi būtiski trūkumi: tā kā mineralizējot tiek pievienoti lieli skābju daudzumi, iespējams radīt parauga mākslīgu piesārņojumu, un arī darbošanās notiek stipri agresīvā vidē (koncentrētas skābes), paraugu nedrīkst atstāt bez uzraudzības. Tāpēc ir svarīgi iekārtot atsevišķu telpu gan paraugu sagatavošanai, gan analīžu veikšanai.

Taču ir elementi, kuru noteikšanai paraugus var sagatavot tikai slapjās mineralizācijas ceļā (Al, Hg, As, Sn, Se), kaut arī, šādā veidā veicot mineralizāciju, iepriekš minētos elementus var pazaudēt. Veicot mineralizāciju atklātā traukā, paraugs var tikt piesārņots no laboratorijas atmosfēras.

Dažu elementu noteikšanai paraugus var sagatavot, tikai veidojot sakausējumus (fluors, jods, bors, silīcijs). No sakausējumiem tālāk tiek iegūti analizējamie šķīdumi. Pārtikas paraugu pilnīgākai mineralizācijai var izmantot arī ultraskaņu. Organisko savienojumu sagraušanas procesu sāk

pievienotās minerālskābes, un to pastiprina ultraskaņa (ultraskaņas iedarbībā tiek sarautas ūdens molekulas saites, un veidojas  $H^+$  un  $OH\cdot$  radikāļi ar lielu reaģētspēju).

**Oksidēšana (mineralizācija) slēgtā sistēmā.** Paraugu iesver kvarca vai nerūsējošā tērauda kapsulā, kuru ievieto slēgtā sistēmā – “bumbā” (10.1. att.) – ar speciālu turētāju, oksidē paaugstināta spiediena un temperatūras apstākļos ar skābekli. Skābekļa spiediens ir aptuveni 5 atmosfēras. Ir iespēja aizvadīt veidojušās gāzes un ūdens tvaikus, lietojot speciālus adsorbentus. Dedzināšanas process ar skābekli ir ātrs un, pateicoties slēgtai sistēmai, netiek zaudēti paraugu saturoši elementi vai radušies produkti. Šāda veida mineralizatoros var analizēt paraugā saturošo sēru, halogēnīdus un citus elementus, pārvēršot tos šķīstošā formā, kas piemērota ķīmiskai analīzei.



10.1. att. Slēgta spiediena “Parr bumba” ([www.parrinst.com](http://www.parrinst.com))

Lietojot dažādas mineralizācijas metodes, ir jāņem vērā trauka tīrības pakāpe un tā sastāvs, jo mineralizācijas procesā izmantotā materiāla elementi paraugu var piesārņot. 10.2. tabulā parādīts, ka mikrokomponentu analīzei piemērotākie ir teflona (PTFE) un kvarca trauki.

**UV starojuma lietošana paraugu sagatavošanā.** Šo paraugu mineralizācijas paņēmieni parasti lieto, ja elementus nosaka elektroķīmiski. Daudzu objektu sastāvā ir salīdzinoši liels organisko vielu saturs, bet elektroķīmiskajās noteikšanas metodēs tas ir traucējošs faktors. Tāpat daudzu elementu joni veido stabilus kompleksos savienojumus ar organiskajām vielām, kas, piemēram, traucē noteikt elementus ar voltamperometriskajām metodēm. Lai iegūtu paraugus šādām noteikšanām, lieto paraugu mineralizāciju bez paraugu sadalīšanas, izmantojot UV starojumu. Aparatūra ir samērā vienkārša, tā sastāv no UV-starojuma lampas, dzesēšanas sistēmas un kvarca traukiem paraugiem. Par starojuma avotu izmanto dzīvsudraba, vakuuma vai augstspiediena lampas.

Vakuuma lampas (*low pressure lamps*) dod līniju spektru ar relatīvi lielu jaudu 185 nm (aptuveni 8%) un 254 nm (90%) elektromagnētiskā starojuma diapazonā. Izmantojot šādas lampas, siltuma daudzums ir mazs, un tas nozīmē, ka, pat lietojot ūdeņraža peroksīdu, pilnīgi paraugu mineralizēšanai nepieciešamas vairākas stundas. Augstspiediena dzīvsudraba lampas dod plašu starojuma diapazonu, no 200 līdz 435 nm, arī starojuma jauda ir daudz lielāka. Kā trūkumu šīm lampām var norādīt, ka rodas daudz lielāks siltuma daudzums, kas var palielināt paraugu zudumus iztvaikošanas dēļ. Tāpēc šādu lampu lietošanas gadījumos ir paredzēta efektīva dzesēšanas sistēma. Mineralizācijai nepieciešama aptuveni viena stunda.

Elementu saturs dažādos materiālos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), ko lieto paraugu mineralizācijai un uzglabāšanai

Elements	PTFE	Kvarcs	Ultratīrs kvarcs	Borsilikātkstikla trauki
<b>Na</b>	25000	1000	10	Pamatelements
Mg		10	100	$6 \times 10^5$
Al		30000	100	Pamatelements
Si		Pamatelements	Pamatelements	Pamatelements
Ca		800–3000	100	$10^6$
Ti		800	100	3000
<b>Cr</b>	30	5	3	3000
Mn		10	10	6000
<b>Fe</b>	10	800	200	$2 \times 10^5$
<b>Co</b>	2	1	1	100
Ni				2000
<b>Cu</b>	10	70	10	1000
Zn		50	200	3000
As		80	0,1	500–22000
Cd		10		1000
<b>Hg</b>	$10^a$	1	1	
<b>Sb</b>	0,4	2	1	8000
B		100	10	Pamatelements

a – atkarībā no glabāšanas apstākļiem

**Mikroviļņu lietošana paraugu sagatavošanā.** Viens no galvenajiem trūkumiem sildelementu izmantošanai paraugu sagatavošanā ir tas, ka parauga karsēšana notiek no malas uz vidu, un, lai sasniegtu vajadzīgo temperatūru, ir vajadzīgs noteikts laiks. Šo trūkumu var novērst ar mikroviļņu tehniku, paraugu karsējot visā tilpumā vienlaikus.

Pirmoreiz vārds “magnetrons” jeb mikroviļņu ģenerators tika lietots 1921. gadā (*W. Hall*). 1946. gadā Persijs Spensers atklāja mikroviļņu lietošanu mājas apstākļos. 1975. gadā mikroviļņi pirmo reizi tika lietoti paraugu sagatavošanai metālisko elementu analīzēm.

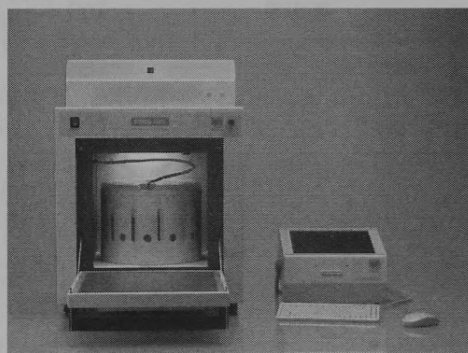
Mikroviļņi ir elektromagnētiska radiācija ar frekvenci 0,3–300 GHz (ar viļņa garumu 0,1–100 cm). Tie atrodas starp radio frekvenci un infrasarkano radiāciju elektromagnētiskajā spektrā. Mikroviļņus intensīvi lieto radaru tehnikā un telekomunikācijās. Lai novērstu traucējošo ietekmi, māsaimniecībā un zinātnē lieto mikroviļņus ar frekvenci 0,9 GHz vai 2,45 GHz. Mājas mikroviļņi strādā tikai 2,45 GHz režīmā. Mikroviļņi nav jonizējošā radiācija. Mikroviļņu enerģija ir daudz zemāka par enerģiju, kas nepieciešama, lai sarautu organisko molekulu saites. Mikroviļņu starojuma (2,450 MHz) kvantu enerģija ir 0,0016 eV. Ķīmisko saišu enerģija: H-OH ir 5,2 eV, ūdeņraža saites – 0,21 eV,  $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3$  – 3,8 eV.

Mikroviļņu karsēšanas iedarbība atšķiras no parastās karsēšanas mehānisma. Parastajā karsēšanā termālā enerģija tiek transformēta uz karsējamo objektu no sildelementa vadāmības un konvekcijas veidā. Mikroviļņu enerģija tiek transformēta siltumenerģijā jonu vadāmības un dipolu rotācijas rezultātā. Polarizētas molekulas rotē mikroviļņu ietekmē  $4,9 \cdot 10^9$  reizes sekundē, un tā rezultātā rodas siltumenerģija.

Mikroviļņu lietošanas iespējas analītiskajā ķīmijā ir plašas. Mūsdienās visas iespējamās klasiskās paraugu sagatavošanas metodes ir iespējams lietot mikroviļņu režīmā. Plašāk lietotās ir:

- slapjā mineralizācija slēgtos un atvērto traukos;
- soksleta ekstrakcija;
- sausā mineralizācija;
- ietvaicēšana.

Visplašāk lietotais režīms ir slapjā mineralizācija slēgtos traukos (spiediena traukos). Galvenā vērība ir jāpievērš spiediena un temperatūras kontrolei procesa laikā. Lietojot mikroviļņus slēgtā sistēmā, bez šo parametru kontroles nav iespējams droši strādāt, un var sabojāt spiediena trauku un laika gaitā arī mikroviļņu krāsni. Tāpēc mūsdienu iekārtas ir apgādātas ar iekšējo un ārējo spiediena un arī temperatūras kontroli (10.2. att.).



10.2. att. Milestone firmas EthosPlus mikroviļņu krāsns un rotors ar spiediena trauciņiem ([www.milestonesci.com](http://www.milestonesci.com))

**Mikroviļņu mineralizācijas metode.** Literatūra ir aprakstīta daudzas mineralizācijas metodes, kuras var atrast mikroviļņu iekārtu ražotāju lietošanas lapās. Piena pulvera un zivs audu mineralizācijas metodi izmantosim kā tipiskus piemērus, kas ņemti no CEM firmas metodikām.

Parauga tips. Piena pulveris.

Reaģenti. Slāpekļskābe (70%).

Iekārta. Mikroviļņu mineralizators ar augstspiediena teflona traukiem (HP-500) ar temperatūras un spiediena kontroli.

Paraugu sagatavošanas procedūra:

1. Nosver 0,500 g parauga un ievieto teflona traukā.
2. Pievieno 10,00 mL slāpekļskābes.
3. Ievieto spiediena traukus rotorā un nostiprina.
4. Izvēlas piemērotāko temperatūras programmu.

Temperatūras programma (pielāgota spiedienam):

Posms	Maks. jauda	Jauda	Izvērses laiks	Spiediens	Temperatūra	Izturēšanas laiks
1	600 W	100 %	30 min	195 psi	210 °C	5 min

Parauga tips. Zivs audi (karaliskā skumbrija), 75% mitrums, 5,5% tauki.

Reaģenti. Slāpekļskābe (70%).

Iekārta. Mikroviļņu mineralizators ar augstspiediena teflona traukiem (HP-500) ar temperatūras un spiediena kontroli.

Paraugu sagatavošanas procedūra:

1. Nosver 2,000 g parauga un ievieto teflona traukā.
2. Pievieno 10,00 mL slāpekļskābes.
3. Ievieto spiediena traukus rotorā un nostiprina.
4. Izvēlas piemērotāko temperatūras programmu.

Temperatūras programma:

Posms	1	2	3	4	5
Jauda, %	100	100	100	100	100
Spiediens, psi	100	200	385	500	600
Izvērses laiks, s	120	120	120	180	180
Izturēšanas laiks, s	60	60	60	120	180
Temperatūra, °C	120	140	160	180	200

Temperatūras programmu pielāgo atkarībā no spiediena trauku raksturlielumiem. Mūsdienās galvenokārt tiek lietoti divu veidu teflona spiediena trauki: 60 atm un 100 atm. Tādējādi, paaugstinot spiedienu, var samazināt mineralizācijas temperatūru. Lai palielinātu teflona trauku kalpošanas laiku, ieteicams nelietot maksimāli atļautos spiedienus. Svarīgs parametrs temperatūras programmas izvēlē ir trauka lielums, kas ļauj izvēlēties optimālo iesvarus. Savukārt iesvars ir atkarīgs no organiskā oglekļa satura paraugā. Aptuvenus organiskā oglekļa saturs sausos saldētos bioloģiskos paraugos ir dots 1.3. tabulā un, izmantojot šos tabulas datus, var pielāgot literatūrā aprakstītās mineralizācijas metodes laboratorijas vajadzībām.

10.3. tabula

#### Oglekļa saturs sausos saldētos bioloģiskos paraugos

Paraugšs	Oglekļa saturs, %	Paraugšs	Oglekļa saturs, %
Augu materiāli		Dzīvnieku materiāli	
Aļģes	35	Piena pulveris	42
Kvieši	45	Aknas	51
Spināti	38	Zivju fileja	52
Lapas, zāle	39–48	Asinis	52
Priežu skujuas	51	Muskuļu audi	41
Persiki	40	Olas	50
<b>Ogļhidrāti</b>		Tauki	
Glikoze	37	Augu tauki	74
Saharoze	42	Sviests	78
Laktoze	42	Augu eļļa	74
Celuloze	43		
Ciete	48		

**Optiskās analīzes metodes.** Līdzās elektroķīmiskās analīzes metodēm un laboratoriju praksē strauji ienākošajām jonu hromatogrāfijas metodēm pārtikas paraugu analīzē testēšanas laboratorijās tiek plaši lietotas optiskās analīzes metodes. Tās balstītas uz vielas mijiedarbību ar elektromagnētisko starojumu (1.4. tabula). Savukārt elektromagnētisko starojumu var uzskatīt par enerģiju kopumu, kas var būt:

- gaisma,
- siltums,
- ultravioletais starojums,
- mikroviļņi,
- radioviļņi,
- $\gamma$  stari,
- rentgenstari.

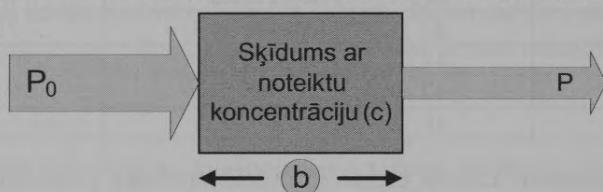
10.4. tabula

#### Spektrometrisko metožu saistība ar atbilstošiem elektromagnētiskā spektra apgabaliem

Spektrometriskās metodes	Spektra apgabals	Savu enerģiju maina
Kodolfizikālās ( $\gamma$ staru emisija)	0,005–1,4 Å	kodoli
Rentgenmetodes	0,1–100 Å	iekšējie elektroni
Vakuuma ultravioletā spektrometrija	10–180 nm	saites elektroni
Ultravioletā spektrometrija	180–400 nm	saites elektroni
Spektrometrija redzamās gaismas apgabalā	400–780 nm	saites elektroni
Tuvā infrasarkanā spektroskopija	780–2500 nm	molekulas (svārstību enerģija)
Infrasarkanā spektroskopija	4000–400 $\text{cm}^{-1}$	molekulas (svārstību, rotācijas enerģija)
Mikrovilņu spektroskopija	0,75–3,75 mm	molekulas (rotācijas enerģija)
Elektronu paramagnētiskā rezonanse	~ 3 cm	Elektrona spins (magnētiskajā laukā)
Kodolmagnētiskā rezonanse	0,6–10 m	kodola spins (magnētiskajā laukā)

Ar šīm metodēm var gan identificēt vielas, gan noteikt to struktūru (piemēram, organiskiem savienojumiem), gan veikt kvantitatīvo analīzi. Laboratoriju praksē visplašāk tiek lietota molekulārās absorbcijas spektrometrija (spektrofotometrija), atomabsorbcijas spektrometrija, liesmas fotometrija. Pēdējā laikā arvien vairāk tiek izmantota induktīvi saistītās plazmas masspektrometrija un induktīvi saistītās plazmas atomemisijas (optiskās emisijas) spektrometrija.

**Molekulārās un atomu absorbcijas spektrometrija.** Ķīmiskajās analīzēs vislielākā nozīme ir gaismas absorbcijai spektra ultravioletajā, redzamajā un infrasarkanajā daļā. Absorbcija spektra ultravioletajā un redzamajā daļā ir saistīta ar atomu un molekulu elektronu līmeņiem. Absorbcija spektra infrasarkanajā daļā galvenokārt notiek, gaismai mijiedarbojoties ar atsevišķiem atomiem vai atomu grupām saliktā molekulā. Gaisma ir elektromagnētiskais starojums, kam piemīt gan viļņu ( $c = \lambda\nu$ ), gan korpuskulāra daba ( $E = h\nu$ ). Gaismas absorbcijas procesā, kas noris molekulās, fotona enerģija tiek atdota vienam no molekulas elektroniem, kurš pāriet augstākā enerģētiskā līmenī. Pēc fotona absorbcijas molekula īsu brīdi ( $10^{-6}$ – $10^{-9}$  s) atrodas ierosinātā stāvoklī. Elektroni molekulā kustas pa stingri noteiktām orbitālēm, līmeņi ar zemākajām enerģijām ir aizpildīti, bet ar augstākajām – tukši. Elektrons, saņemot enerģiju, ko tam piešķir gaismas kvants, var pāriet no aizpildīta enerģijas līmeņa uz neaizpildītu līmeni. Parasti iespējamās elektronu pārejas ir vairākas, tādējādi katrai vielai var būt ne tikai viens, bet vairāki raksturīgi viļņu garumi, ko tā absorbē. Kvantitatīvajā analīzē tiek lietoti divi termini: absorbcija (A) un caurlaidība (T). Caurlaidību raksturo jauda starojumam, kas ir izgājis cauri noteiktam šķīduma slānim (b) ar noteiktu koncentrāciju (c) (10.3. att.).



10.3. att. Starojuma jaudas absorbcija un caurlaidība

Caurlaidība (T) ir starojuma jaudas daļa, kas ir izgājusi cauri absorbējošā šķīduma slānim:

$$T = P/P_0, \text{ ko parasti izsaka procentos: } T_{\%} = P/P_0 \times 100$$

Savukārt absorbcija ir tā starojuma daļa, kuru absorbē šķīdums:

$$A = \lg(P_0/P) = -\lg(P/P_0) = -\lg T = \lg(1/T)$$

Visiem tiem gaismas viļņu garumiem, kurus viela absorbē, ir spēkā **Bēra likums**: gaismas absorbcija vielā ir proporcionāla absorbējošā slāņa biezumam un vielas molārajai koncentrācijai.

$$A = \epsilon \times c \times b$$

kur:

A – absorbcija,

c – vielas koncentrācija, mol/L,

b – absorbējošā slāņa biezums, cm,

$\epsilon$  – molārais absorbcijas koeficients.

Bēra likumu praksē lieto, lai pielāgotu noteikšanas metodi laboratorijas vajadzībām. Zinot gaismu absorbējošā savienojuma  $\epsilon$ , var viegli noteikt, kāda būs savienojuma absorbcija, ņemot noteiktu analizējamās vielas koncentrāciju un zināmu kivetes jeb absorbējošā slāņa biezumu.  $\epsilon$  pie noteikta viļņa garuma var noteikt eksperimentāli, izmantojot standartšķīdumus, vai arī atrast literatūrā vai rokasgrāmatās.

Kā aprēķina piemēru izmantosim amonija jonu noteikšanu ar Neslera reaģentu. Amonjakālā vidē (pH=13) amonija joni ar Neslera reaģentu veido savienojumu, kura molārais absorbcijas koeficients ir 4000 (Lurjē tabulu dati). Pieņemot, ka pirmo punktu kalibrēšanas taisnei ņemsim ar absorbcijas

vērtību 0,05 un kivetes biezums būs 1 cm, pēc Bēra likuma ir viegli aprēķināt amonija jona molāro koncentrāciju standartšķīdumam:

$$c = \frac{A}{\epsilon \times b} = \frac{0,05}{4000 \times 1} = 1,25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

Ja gribam palielināt metodes jutību, tad jāņem lielāka kivete, piemēram, 10 cm (jutību uzlabosim desmit reizes) vai arī amonija jonu noteikšanai jālieto cits organiskais analītiskais reaģents, kuram molārais absorbcijas koeficients savienojumam ar amonija joniem ir lielāks.

Otra metode, kuru plaši lieto kvantitatīvajā analizē, ir atomu absorbcimetrija jeb emisija. Šajā metožu grupā ietilpst liesmas fotometrija, liesmas un elektrotermālā atomabsorbcimetrija, hidrīdu un dzīvsudraba tvaiku atomabsorbcimetrija un induktīvi saistītās plazmas atomemisijas spektrometrija. Visas atomspektrometriskās analīzes metodes balstās uz principu, ka pirms elektromagnētiskā starojuma iedarbības uz analītu, tas ir jāpārvērš no šķīduma atomtvaiku stāvoklī. Šajā grupā vēl nepieciešams pieminēt arī induktīvās saistītās plazmas masspektrometriju, kurā nosakāmo analītu pārvērš augsttemperatūras plazmā (6000–8000 °C) jonu stāvoklī ar lādiņu +1 un tad radušos jonus sadala masas analizatorā un kvantitatīvi analizē. Katrai metodei ir savas priekšrocības un trūkumi un, pirms kādu no tām ievieš laboratoriju praksē, rūpīgi jāizvērtē katras metodes raksturlielumi. 10.5. tabulā apkopoti četrus visizplatītāko analīzes metožu galvenie raksturlielumi.

10.5. tabula

Dažu biežāk lietoto elementu analīzes metožu raksturlielumu salīdzinājums

Metode	F-AAS	ET-AAS	ICP-OES	ICP-MS
Noteikšanas robeža	~1 µg/L	~0,01 µg/L	~0,1 µg/L	<1 ng/L
Linearitārais diapazons	3 kārtas	2 kārtas	5-6 kārtas	8-9 kārtas
Analīzes laiks/elem. skaits	~10 s/1	3 min/1	1-4 min/30	1-2 min/30
Traucējošie faktori	maz	maz	spektrālie	Izobārie poliatomi
Izmaksas	zemas	vidējas	augstas	augstas
Operatora pieredze	maza	vidēja	virš vidējā	liela
Parauga tilpums analīzei	~1 mL	20 µL	1 mL/min	1 mL/min

Paskaidrojumi:

F-AAS – liesmas atomabsorbcimetrija; ET-AAS – elektrotermālā atomabsorbcimetrija;

ICP-OES – induktīvi saistītās plazmas optiskās emisijas spektrometrija;

ICP-MS – induktīvi saistītās plazmas masspektrometrija.

**Elektroķīmiskās analīzes metodes.** Kaut gan optiskās analīzes metodes plaši lieto pārtikas produktu analizē, arī elektroķīmiskajām analīzes metodēm ir zināma nozīme laboratoriju praksē. Ir vairāki analīzes parametri, kuri ir nosakāmi, tikai lietojot elektroķīmiskas ierīces. Starp tiem jāmin šķīdumu pH, elektrovadītspēja, sāļainība, redokspotenciāls, izšķīdušais skābeklis ūdenī, gāzu selektīvie elektrodi un citi jonoselektīvie elektrodi, kaut arī anjonu analīzei arvien plašāk lieto jonu hromatogrāfiju. Pārtikas produktu piesārņojuma kontrolē ērti lietojama arī stripinga voltamperometrija un potenciometrija. Šajā nodaļā tiks apskatītas divas metodes: potenciometrija (jonometrija) un stripinga potenciometrija

**Potenciometrija.** Potenciometrija balstās uz potenciāla starpības ( $\Delta E$ ) mērījumiem starp elektrodiem, uzturot strāvas stiprumu ( $i$ ) konstantu. Potenciālam ir funkcionāla atkarība no izšķīdušo jonu koncentrācijas (vai arī atsevišķos gadījumos no aktivitātes):

$$\Delta E = f(c), \text{ ja } i = \text{const.}$$

Par mūsdienu potenciometrijas pamatlicēju uzskata Valteru Nernstu (*Walther Nernst*, 1864–1941). Viņš izveda sakarību starp līdzsvara potenciālu elektroķīmiskajā šūniņā un jonu aktivitāti šķīdumā:

$$E = E_{\text{galv.el}}^0 - \frac{0,059}{z} \lg \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})}, \text{ ja indikatorelektrods ir redokselektrods (piemēram, Pt);}$$

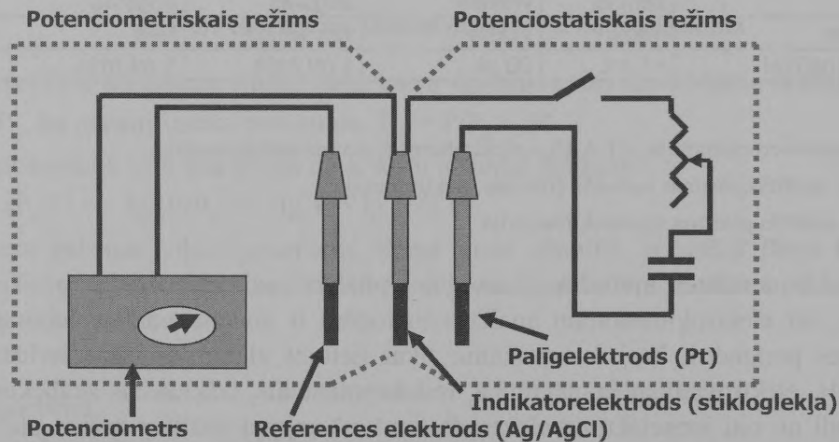
$E = E_{galv.el}^0 - 0,059pH$ , ja indikatorelektrods ir pH stikla elektrods;

$E = E_{galv.el}^0 - \frac{0,059}{z} pa_{nosak.,anal.}$ , ja indikatorelektrods ir jonselektīvais elektrods.

Lai nomērītu potenciālu, šķīdumā nepieciešami vismaz divi elektrodi. Viens no tiem ir indikatorelektrods, otrs – salīdzināšanas jeb references elektrods. Komerčiāli var iegādāties dažādu firmu ražotos pH elektrodus. Lai iegūtu mērījumus ar augstāku precizitāti, ir jāiegādājas labākas kvalitātes elektrodi, kuri parasti ir par kārtu dārgāki nekā elektrodi ar zemāku precizitāti. Mūsdienās pārsvarā lieto kombinētos pH stikla un jonselektīvos elektrodus, kur vienā korpusā ir apvienoti indikatorelektrods un salīdzināšanas elektrods. Ja potenciāls tiek mērīts suspensijām, tad drošāk lietot atsevišķo elektrodu sistēmu, jo kombinētiem elektrodiem pastāv risks aizsērēt sāls tiltiņa rajonā starp elektrodiem kombinētā elektroda korpusā.

*Stripinga potenciometrija.* Lielākā daļa no elektroķīmiskajām metodēm to mazās jutības dēļ nav piemērotas mazu koncentrāciju noteikšanai pārtikas produktos. Tomēr, pateicoties iespējai koncentrēt analītu uz elektroda virsmas, ir iespējams analizēt ļoti mazus vielas daudzumus, līdz pat 1 ng/L.

Elektroķīmisko metožu galvenā priekšrocība ir tā, ka tās lietojamas atsevišķu elementu specificēšanas vajadzībām bez parauga apstrādes, atšķirībā no optiskajām analīzes metodēm, kurās nosaka kopējo elementa daudzumu. Piemēram, lietojot stripinga potenciometriju, ir ērti noteikt selēna vai arsēna oksidācijas pakāpi. Stripinga potenciometrijā vispirms nosakāmo metālisko elementu jonus reducē par atomiem potenciostatiskajā režīmā, uzturot noteiktu elektrolīzes potenciālu konstantu. Tie koncentrējas plānā dzīvsudraba kārtiņā, kas iepriekš ir uznesta uz stikloglekļa elektroda. Izveidojas attiecīgo metālu šķīdums dzīvsudrabā (amalgama). Nākošajā posmā (galvanostatiskajā režīmā) tiek radīti tādi apstākļi, lai metālu atomi oksidētos par atbilstošiem joniem un pārietu šķīdumā. Šo procesu sauc par *stripingu* (10.4. att.).



10.4. att. Stripinga potenciometrijas principiālā uzbūve un darbības shēma

**Stripingpotenciometriskā vara un svina noteikšana vīnā.** Vara saturs vīnā ir atkarīgs no vīnogu šķirnes, turpretī svins vīnā nonāk kā piesārņojuma elements (gaisa un augsnes piesārņojums vīnogu augšanas procesā) un vīna uzglabāšanas procesā (svins pāriet vīnā no stikla pudelēm, it sevišķi no tumšā stikla pudelēm). Pirms stripingpotenciometriskās analīzes ieteicams vīna paraugu mineralizēt, izmantojot koncentrētu slāpekļskābi.

*Parauga priekšapstrāde.* Pie 25 mL vīna pielej 0,8 mL konc. slāpekļskābes, silda ūdens vannā 50 °C temperatūrā 30 minūtes. Pēc parauga atdzesēšanas to atšķaida 50 mL mērkolbā ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei.

*Stripinga potenciometrijas analīzes metode.* Elektroķīmiskajā šūnā ielej 15,00 mL iepriekš apstrādātā vīna parauga, pievieno 2,00 mL 0,005 M  $\text{Hg}^{2+}$  šķīdumu un 2,00 mL 6M HCl. Elektroķīmiskajai šūnai vara noteikšanai izvēlas šādu režīmu:

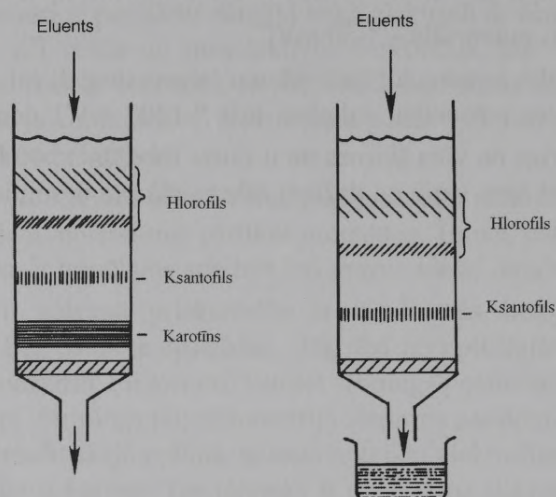
- elektrolīzes potenciāls – “-900 mV”;
- elektrolīzes laiks – “120 s”;
- stripinga strāva – “0,5  $\mu\text{A}$ ”;
- stripinga laiks – “1,0 s”;
- elektroda tīrīšanas potenciāls – “-50 mV”.

Kvantitatīvo saturu nosaka, izmantojot kalibrēšanas taisnes metodi vai arī standartpiedevu metodi. Svina noteikšanai elektrolīzes potenciālu palielina līdz “-1200 mV”, nemainot pārējos parametrus.

Vara saturs vīnā ir atkarīgs no vīna šķirnes un ir citēts robežās no 90 līdz 800  $\mu\text{g/L}$ . Svina saturs atkarībā no piesārņojuma pakāpes variē no dažiem līdz vairākiem desmitiem mikrogramu litrā.

# 11. Augstefektīvākā šķidrumu hromatogrāfija – teorētiskie principi

Hromatogrāfijas pirmsākumi ir saistāmi ar Varšavas Universitātes profesoru M. Cvetu, kas 1903. gadā, izmantojot ar  $\text{CaCO}_3$  pildītu cauruli, sadalīja sastāvdaļās lapu ekstraktu petrolēterī. Viņam izdevās pierādīt dažādu hlorofila formu, kā arī ksantofila un karotīna esamību pētītajos ekstraktos.



Ar  $\text{CaCO}_3$  kolonnu, tai skalojot cauri lapu ekstraktu petrolēterī, izdevās iegūt vairākas dažādu krāsu joslas, kas atbilda hlorofilam, ksantofilam un karotīniem

11.1. att. M. Cveta eksperiments

## 11.1. Definīcija

**Hromatogrāfija** ir vielu atdalīšanas process, kurā parauga maisījums sadalās starp divām fāzēm, no kurām viena ir kustīga. Otrā fāze ir nekustīgs sorbenta slānis, kas var atrasties kolonnā vai plāknē.

Nekustīgā fāze ir ciets, porains aktīvas virsmas materiāls sīku daļiņu veidā vai plāns šķidruma slānītis, ar ko pārklāts cietais adsorbents vai kolonnas iekšējās sieniņas. Kustīgā fāze var būt gāze vai šķidrums. Ja izmanto gāzi, procesu sauc par gāzu hromatogrāfiju. Kustīgā fāze ir šķidrums visu veidu šķidrumu hromatogrāfijā, ieskaitot plānslāņa un papīra metodes.

## 11.2. Šķidrumu hromatogrāfijas metožu iedalījums

**Adsorbcijas hromatogrāfijas** būtība ir tāda pati kā klasiskajā kolonnā un plānslāņa hromatogrāfijā, kurā relatīvi polārs materiāls ar lielu īpatnējo virsmu tiek lietots par nekustīgo fāzi. Plašāk izmantotais adsorbents ir silikagels, lai arī mēdz izmantot arī alumīnija un magnija oksīdus.

Kustīgā fāze ir samērā nepolāra (robežās starp heptānu un tetrahidrofurānu). Maisījumā esošās dažāda veida molekulas atšķirīgā mērā adsorbējas uz nekustīgās fāzes virsmas un tāpēc atdalās. Nepolārais heksāns kā eluents maisījuma komponentus no kolonnas izdala lēnāk nekā vidēji polārais dietilēteris.

*Likumība:* polārās vielas izdalās vēlāk par nepolārajām.

Polārs nozīmē *ūdenī šķīstošs, hidrofilis*. Nepolārs ir sinonīms *lipofilam, šķīstošam taukos*.

**Apgrieztās fāzes hromatogrāfija.** Jēdziens “*apgriezts*” nozīmē:

- nekustīgā fāze ir izteikti nepolāra;
- kustīgā fāze ir relatīvi polāra (no ūdens līdz THF);

c) polārais  $H_2O$  kā eluents vielas izdalīs lēnāk nekā mazāk polārais acetonitrils.

*Likumība:* nepolāras vielas izdalās vēlāk par polārajām.

**Hromatogrāfija ar ķīmiski saistītajām fāzēm.** Nekustīgā fāze ir kovalenti piesaistīta nesējam ķīmiskās reakcijas rezultātā. Izvēloties atbilstošos reakcijas partnerus, var iegūt lielu skaitu nekustīgo fāžu. Iepriekš aprakstītā apgrieztās fāzes metode ir svarīgākais ķīmiski saistīto fāžu speciālgadijums.

**Jonu apmaiņas hromatogrāfijā** nekustīgajā fāzē ir grupas ar jonu dabu ( $NR_3^+$ ,  $SO_3^-$ ), kas iedarbojas ar joniskas dabas grupām parauga molekulās. Metodi izmanto aminoskābju, joniskas dabas metabolītu vai organisko jonu atdalīšanai.

**Jonu pāru hromatogrāfiju** lieto jonisku vielu atdalīšanai, pārvarot dažus trūkumus, kas piemīt jonu apmaiņas metodei. Joniskas dabas molekulas tiek maskētas ar atbilstošu pretjonu. Galvenā metodes priekšrocība ir apstākļi, ka tajā var lietot plaši pieejamās apgrieztās fāzes sistēmas. Jonu apmaiņtājs tajās nav vajadzīgs. Ar metodi vienlaicīgi var atdalīt skābju, bāzu un neitrālu vielu maisījumus.

**Jonu hromatogrāfija** ir izstrādāta, lai atdalītu stipru skābju un stipru bāzu jonus ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-Na^+$ ,  $K^+$ ). Tā ir jonu apmaiņas hromatogrāfijas paveids, lai arī izmantotās iekārtas ir citas.

**Eksklūzijas (Size-Exclusion) hromatogrāfija** ir veids, ko sīkāk iedala gelcaurspiedības (ar organiskajiem šķīdinātājiem) un gelfiltrācijas (ar ūdens šķīdumiem) metodēs. Eksklūzijas hromatogrāfijā molekulas atdalās pēc to lieluma – atbilstoši molu masām. Lielākās molekulas izdalās agrāk, mazākās – vēlāk. Tā ir vislabākā metode tādu vielu atdalīšanai, kuru molu masas atšķiras vismaz par 10%.

**Afinā hromatogrāfijā** atdalīšanas pamatā ir ļoti specifiskās bioķīmiskās iedarbības. Nekustīgajā fāzē ir specifiskas molekulu grupas, kas var adsorbēt tikai tādu paraugu, kurā izpildās noteiktas stēriskās vai lādiņa atbilstības prasības (iedarbība starp antigēnu un antiķermeni). Afīno hromatogrāfiju izmanto olbaltumvielu (fermentu) līpīdu un citu vielu izolēšanai no sarežģītiem maisījumiem.

### 11.3. Hromatogrāfiskais process

Molekulas, kurām ir lielāka tendence atrasties kustīgajā fāzē, cauri sorbenta slānim pārvietojas ātrāk nekā vielas, kurām ir tieksme pārsvarā atrasties nekustīgajā fāzē. Tas ir atkarīgs no vielas **sadalījuma koeficienta  $K$** :

$$K_X = \frac{[X]_{nek.}}{[X]_{kust.}} \quad (11.1)$$

kur  $[X]_{nek.}$  ir vielas  $X$  koncentrācija (mol/L, faktiskā aktivitāte) nekustīgajā fāzē,  $[X]_{kust.}$  – tās koncentrācija kustīgajā fāzē. Vielas sadalījumu starp fāzēm raksturo arī izdalīšanas faktors  $k$ , ko agrāk sauca par kapacitātes faktoru  $k'$ :

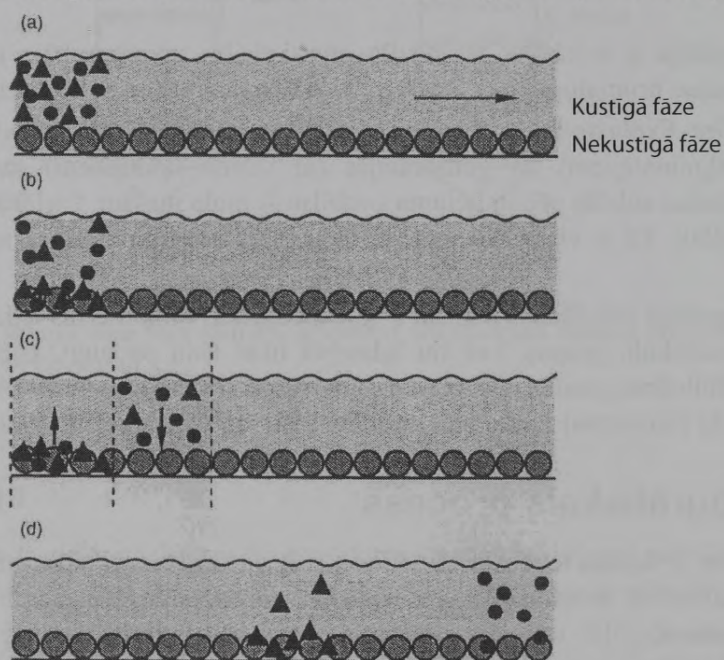
$$k'_X = \frac{n_{nek.}}{n_{kust.}} \quad (11.2)$$

kur  $n_{nek.}$  ir vielas  $X$  molu skaits nekustīgajā fāzē, bet  $n_{kust.}$  – vielas molu skaits kustīgajā fāzē. Lai iestātos līdzsvara stāvoklis, kustīgajai un nekustīgajai fāzei ir jāatrodas ciešā saskarē.

Dažādiem parauga komponentiem konkrētajā hromatogrāfiskajā sistēmā var būt atšķirīgi sadalījuma koeficienti, tāpēc arī dažādi izdalīšanas faktori.

## Atdalīšanas procesa grafisks attēlojums

- (a) Maisījumu no diviem komponentiem, kas apzīmēti ar  $\blacktriangle$  un  $\bullet$ , ievada hromatogrāfiskajā slānītī (11.2. att.).
- (b) Komponentam  $\blacktriangle$  piemīt tieksme atrasties galvenokārt nekustīgajā fāzē, bet komponentam  $\bullet$  – kustīgajā fāzē. Tāpēc  $k_{\blacktriangle} = 5/2 = 2,5$ , bet  $k_{\bullet} = 2/5 = 0,4$ .
- (c) Pēc jaunas eluenta porcijas pievienošanas iestājas jauns līdzsvars – parauga molekulas daļēji adsorbējas uz “neapklātās” nekustīgās fāzes virsmas atbilstoši to sadalījuma koeficientiem, savukārt, tās molekulas, kas iepriekš bija adsorbējušās, ir pārvietojušās uz kustīgo fāzi (11.2. att. c).
- (d) Procesam atkārtojoties daudzas reizes, galu galā abas vielas ir atdalījušās. Viela  $\bullet$ , kurai ir tieksme atrasties galvenokārt kustīgajā fāzē, cauri sorbenta slānim pārvietosies ātrāk par vielu  $\blacktriangle$ , kurai piemīt tieksme saistīties ar nekustīgo fāzi (11.2. att. d).



Līdzsvars iestājas sorbenta slānītī, kas atbilst 3,5 nekustīgās fāzes sorbenta granulu diametriem. Šo attālumu sauc par teorētisko šķīvī. Jo garāks ir sorbenta slānis, jo vairāk tajā ir teorētisko šķīvju un tāpēc iespējama pilnīgāka maisījuma atdalīšana.

Šo efektu daļēji samazina joslu paplašināšanās. Eksperimentāli ir noskaidrots, ka, vielām pārvietojoties kolonnas garumā, joslas, kurās atrodas vielu molekulas, kļūst arvien platākas un izdalīšanas laiki – lielāki.

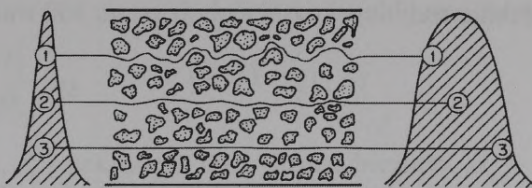
11.2. att. Hromatogrāfiskā atdalīšanas procesa attēlojums

### 11.3.1. Joslu platuma pieauguma cēloņi

Joslu paplašināšanās cēloņi ir vairāki, un tos ir jāizprot, lai šo parādību iespējami samazinātu un sasniegtu augstu teorētisko šķīvju skaitu hromatogrāfiskajā kolonnā.

#### Pirmais cēlonis: virpuļdifūzija

Kolonna ir piepildīta ar mazām nekustīgās fāzes daļiņām. Kustīgā fāze iet tām cauri un tādā veidā pārvieto arī parauga molekulas (11.3. att.). Dažām molekulām “paveicas”, un tās izdalās no kolonnas ātrāk par citām, jo to veiktais ceļš, pārvietojoties cauri sorbenta slānim, ir taisnāks nekā pārējām. Cītu molekulu veiktais ceļš ir līkumaināks un tāpēc garāks.



11.3. att. Virpuļdifūzijas (molekulu veikto dažādo ceļu) ietekme uz joslu platuma pieaugumu hromatogrāfiskajā kolonnā

Virpuļdifūzijas ieguldījumu joslas platumā izsaka izteiksme:

$$A = 2\lambda \times d_p \quad (11.3)$$

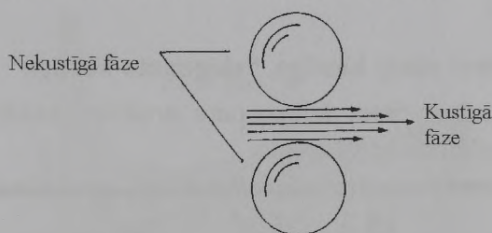
kur  $\lambda$  = pildījuma konstante,

$d_p$  = sorbenta daļiņu diametrs.

Lai samazinātu lielumu A, jālieto maza izmēra sorbenta daļiņas, kas cieši novietotas cita pie citas viendabīgā slānī.

### Otrais cēlonis: plūsmas sadalījums

Kustīgās fāzes lamināra plūsma pārvietojas starp nekustīgās fāzes daļiņām (11.4. att.). Plūsma ir ātrāka “kanāla” centrā, nekā daļiņu tuvumā. Virpuļdifūziju un plūsmu sadalījumu iespējams samazināt, piepildot kolonnu ar vienādas formas sorbenta daļiņām.



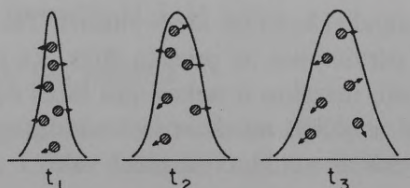
11.4. att. Plūsmas ātrumu sadalījums starp sorbenta daļiņām. Bultas atbilst kustīgās fāzes vektoriem (jo garāka bulta, jo lielāks ir lokālās plūsmas ātrums)

Galvenais princips, uz kura balstās labas kolonnas darbība, – sorbentam jāpastāv no daļiņām ar mazāko iespējamo daļiņu lieluma sadalījumu. Attiecībai starp lielāko un mazāko daļiņu diametru nevajadzētu pārsniegt 2. Vēl labāk, ja šis lielums ir 1,5 (piemēram, mazākās daļiņas lielums ir 5  $\mu\text{m}$ , bet lielākās – 7,5  $\mu\text{m}$ ).

Joslas paplašināšanos, ko rada virpuļdifūzija un plūsmas sadalījums, visai maz (ja vispār) ietekmē kustīgās fāzes ātrums.

### Trešais cēlonis: parauga molekulu difūzija kustīgajā fāzē

Parauga molekulas kustīgajā fāzē izkļiedžas arī bez jebkādas ārējas iedarbības (tāpat kā cukura graudiņš lēnām izšķīst un arī bez maisīšanas ieņem šķīduma tilpumu). Hromatogrāfijā atbilstošo parādību sauc par garendifūziju (longitudinālo difūziju), kuras būtība izskaidrota 11.5. attēlā.



Kreisajā pusē: parauga josla tūlīt pēc ievadīšanas sāk izplūst visos telpas virzienos, kas norādīti ar bultiņām. Labajā pusē: parauga josla pēc kāda laika. Tā ir palielinājusies difūzijas dēļ un pārvietojas ar kustīgās fāzes plūsmu.

11.5. att. Joslu paplašināšanās molekulārās difūzijas ietekmē

Molekulārās difūzijas ieguldījums:

$$B = \frac{2\gamma D_m}{u} \quad (11.4)$$

kur  $\gamma$  – sorbenta viendabības faktors,  $D_m$  – parauga difūzijas koeficients gāzes fāzē,  $u$  – kustīgās fāzes lineārais ātrums.

Garendifūzijai ir nevēlama ietekme uz hromatogrāfiskās sistēmas vienam šķīvim ekvivalento augstumu, ja:

- nekustīgās fāzes daļiņas ir mazas ( $<10 \mu\text{m}$ ),
- mazs ir kustīgās fāzes ātrums,
- paraugam ir liels difūzijas koeficients.

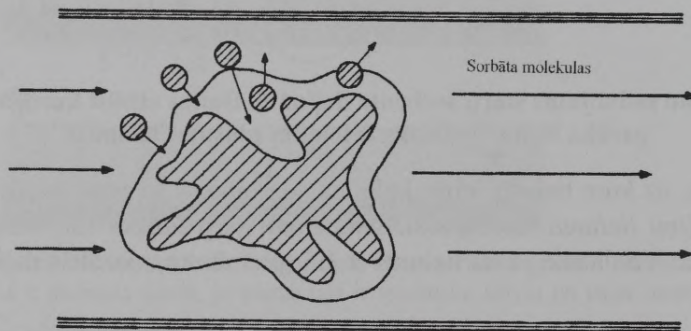
Otrs princips – kustīgās fāzes plūsmas ātrums ir jāizvēlas tāds, lai garendifūzijas ietekme būtu mazākā iespējamā. To sasniedz pie nosacījuma:

$$u > \frac{2D_m}{d_p} \quad (11.5)$$

kur  $u$  ir lineārais kustīgās fāzes plūsmas ātrums,  $D_m$  – parauga difūzijas koeficients kustīgajā fāzē un  $d_p$  – sorbenta daļiņu diametrs.

#### Ceturtais cēlonis: masas pārnese starp kustīgo, “stagnanto kustīgo” un nekustīgo fāzi

11.6. attēlā redzama nekustīgās fāzes daļiņas poru struktūra: kanāli ir gan plati, gan šauri, gan šauri, daži iziet cauri visai daļiņai, citi noslēdzas ar strupceļu.



Masas pārnese starp kustīgo un nekustīgo fāzi. Nekustīgajā fāzē esošie adsorbcijas centri pievelk tuvumā esošās molekulas. Piekļūšana centriem poru iekšpusē ir apgrūtināta, tāpēc lēnāka (pa labi).

11.6. att. Nekustīgās fāzes daļiņas poru struktūra

Poras ir piepildītas ar kustīgo fāzi, kas nepārvietojas – stagnē. Parauga molekula, nonākdama porā, beidz pārvietoties ar eluenta plūsmu un savu novietojumu maina vienīgi difūzijas ceļā. Tomēr tai pastāv divas iespējas:

- Molekula var difundēt atpakaļ kustīgās fāzes plūsmā. Tas prasa laiku, kurā molekulas, kas porās nenonāk, paspēj pārvietoties uz priekšu tālāk. Tā rezultātā josla paplašinās mazāk, ja poras ir šaurākas, proti, mazākas ir nekustīgās fāzes daļiņas. Turklāt parauga molekulu difūzijas ātrums eluentā ir lielāks mazākas viskozitātes apstākļos (tās ātrāk difundē porās iekšā un no tām ārā), nekā tas notiktu viskozākā vidē.
- Molekula iedarbojas ar pašu nekustīgo fāzi (adsorbentu vai šķidrums slānīti) un tiek adsorbēta. Uz mirkli tā paliek saistīta ar nekustīgo fāzi un pēc izkļūšanas no tās turpina pārvietoties. Arī šis masas pārnese process prasa zināmu laiku (11.6. att.).

Masas pārnese uz šķidrā fāzi un no šķidrās fāzes ieguldījumu izsaka izteiksme:

$$C = \left( \frac{8}{\pi^2} \right) \left[ \frac{k'}{(1+k')^2} \right] \left( \frac{d_f^2}{D_{liq}} \right) u \quad (11.6)$$

kur  $k'$  = izdalīšanas faktors,  $d_f$  = nekustīgās fāzes slānīša biezums,  $D_{liq}$  – parauga difūzijas koeficients nekustīgajā fāzē,  $u$  = kustīgās fāzes lineārais ātrums.

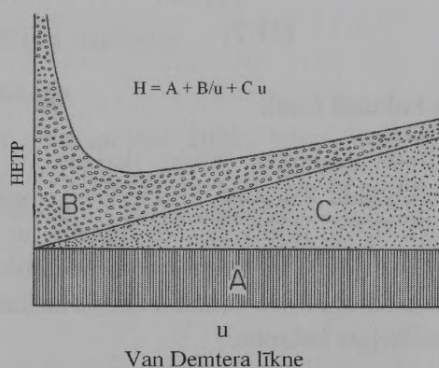
Lai samazinātu lielumu  $C$ , jālieto iespējami plāns mazas viskozitātes nekustīgās fāzes slānītis, kas vienmērīgi pārklāj liela laukuma cieta nesēju.

Joslu platums pieaug, palielinoties kustīgās fāzes ātrumam: parauga molekulas, kas paliek kustīgajā eluentā, attālinās no stagnējošajām molekulām vairāk, ja plūsma ir ātrāka (parauga izdalīšanai tad nepieciešams mazāk laika). Tāpēc par nekustīgo fāzi jālieto:

- maza diametra daļiņu sorbenti ar virsmu, kurā atrodas seklas poras;
- eluenti ar mazu viskozitāti.

Liels analīzes ātrums sasniedzams uz izšķiršanas rēķina, un otrādi. Tomēr mazāku daļiņu gadījumā efekts nav pārāk izteikts, salīdzinājumā ar lielām daļiņām.

Teorētiskā šķīvja augstumu  $H$  var izteikt kā funkciju no kustīgās fāzes plūsmas ātruma  $u$  (11.7. att.). Līkni  $H$ - $u$  koordinātēs sauc par **van Demtera** līkni. Optimāls plūsmas ātrums  $u_{opt}$  ir atkarīgs no analizējamās vielas īpašībām.



$A$  = virpuļdifūzijas un plūsmas sadalījuma komponenta ieguldījums joslas platumā;

$B$  = garendifūzijas ieguldījums – plūsmas ātrumu, kādā šis faktors kļūst nenozīmīgs, parasti lieto šķidrums hromatogrāfijā;

$C$  = masas pārnese komponents – taisnes slīpums ir lielāks 50  $\mu\text{m}$  nekā 5  $\mu\text{m}$  daļiņām; visu komponentu veidotā kopējā van Demtera  $H$ - $u$  līkne.

### 11.7. att. Van Demtera līkne ( $H$ - $u$ līkne)

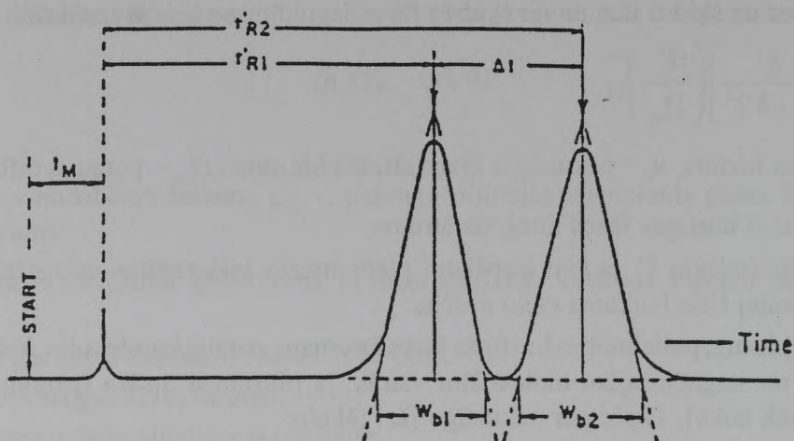
Attiecīgo ieguldījumu lielumu ieguldījumus izsaka šādas izteiksmes:

$$A = 2\lambda d_p, \quad \frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u}, \quad C_{S,u} = \frac{f_s(k')d_f^2}{D_s}u, \quad C_{M,u} = \frac{f_M(k')d_p^2}{D_M}u$$

(Apzīmējumu atšifrējumi kā formulās 11.3–11.6.)

## 11.3.2. Hromatogramma un tās būtība

Eluējamās savienojumus kustīgā fāzē pārvieto uz detektoru, kas to īpašības pārveido Gausa līknēs, kurām ir zvanveida forma. Līknes mēdz saukt par joslām un joslu kopumu no viena parauga – par hromatogrammu (11.8. att.).



Analizējamās vielas izdalīšanas laiks  $t_R$ , kustīgās fāzes izdalīšanas laiks  $t_M$  un koriģētais izdalīšanas laiks  $t'_R$  ( $t_R - t_M = t'_R$ ). Joslu laukumi ir proporcionāli komponentu daudzumiem paraugā. Lielumi  $w_{b1}$  un  $w_{b2}$  ir joslu platumi pie pamatnes.

### 11.8. att. Hromatogrammas raksturlielumi

Kvantitatīvai kolonnas efektivitātes novērtēšanai izmanto divus saistītus lielumus: šķīvja augstumu  $H$  un šķīvju skaitu  $N$ . Abi lielumi raksturo hromatogrāfiskās sistēmas spēju veidot šauras joslas:

$$H = \frac{L}{N}, \quad (11.7)$$

kur  $L$  = ir sorbenta slāņa garums kolonnā (cm).

Kolonnas efektivitāte palielinās, pieaugot šķīvju skaitam  $N$  un samazinoties viena šķīvja augstumam  $H$ . Lielās atšķirības dažādu kolonnu efektivitātē nosaka nekustīgo un kustīgo fāžu lielā dažādība. Kolonnas teorētisko šķīvju skaits var būt robežās no dažiem simtiem līdz vairākiem tūkstošiem; šķīvja augstums var būt no  $10^{-3}$  –  $10^{-1}$  mm. Jēdzienus „kolonnas efektivitāte” un „kolonnas šķīvju skaits” ieviesa mūsdienu hromatogrāfijas pamatlicēji – Martins un Sings, kas hromatogrāfisko kolonnu uzskatīja par līdzīgu destilācijas kolonnai.

Saskaņā ar viņu izstrādāto teoriju, kolonna sastāv no liela skaita diskretu (lai arī nepārtrauktu), šauru slāņiņu, kurus Martins nosauca par teorētiskajiem šķīvjiem. Katrā šķīvī iestājas analizējamās vielas līdzsvars starp kustīgo un nekustīgo fāzi. Vielas pārvietošanos kolonnas garumā teorijas autori uzskatīja par solveidīgu kustīgās fāzes pārvietošanos no viena šķīvja uz nākošo.

Šķīvju teorija spēja veiksmīgi izskaidrot hromatogrāfiskās joslas Gausa formu un vielas pārvietošanās ātrumu kolonnā, tādējādi uzvarot otru hromatogrāfijas teoriju – ātruma teoriju, kas mehāniskā veidā nespēja izskaidrot joslu paplašināšanos. Ātruma teorija mēģināja pārvarēt pieņēmumu, ka kolonnā ir šķīvji, kuros realizējas līdzsvara iestāšanās. Īstenībā līdzsvara stāvoklis nekad neiestājas, ja kustīgā fāze nepārtraukti pārvietojas.

### Šķīvja augstuma definīcija

Statistiskais vidējais (atkārtojamo rezultātu kopums):

$$\mu = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\sum_{i=0}^N x_i}{N} \quad (11.8)$$

kur  $x_i$  ir  $i$ -tā mērījuma vērtība. Kā rāda šī sakarība, vidējais aritmētiskais tuvojas vidējam statistiskajam, ja mērījumu skaits  $N \rightarrow \infty$ . Lielumu  $\mu$  sauc par izmērāmā lieluma patieso vērtību.

Statistisko standartnovirzi definē sakarība:

$$\sigma = \sqrt{\lim_{N \rightarrow \infty} \frac{\sum_{i=0}^N (x_i - \mu)^2}{N}} \quad (11.9)$$

Statistikā priekšroku dod statistiskajai izkliedei (*variancei*), kas ir standartnovirzes kvadrāts –  $\sigma^2$ , jo šis lielums ir aditīvs. Tas nozīmē, ja sistēmu ietekmē  $n$  neatkarīgi kļūdu avoti, kopējā izkliede ir:

$$\sigma_t^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2 \quad (11.10)$$

$\sigma_1^2, \sigma_2^2, \dots$  ir dažādo kļūdu avotu radītās izkļiedes.

Statistikā novērojumu daļa  $\frac{dN}{N}$ , kur vērtības atrodas robežās no  $x$  līdz  $(x+dx)$ , ir:

$$\frac{dN}{N} = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} dx \quad (11.11)$$

Tā kā hromatogrāfiskajām joslām ir Gausa sadalījuma forma, **kolonnas efektivitāti definē ar standartnovirzi uz kolonnas garuma vienību:**

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (11.12)$$

Tā ir šķīvja augstuma definīcijas izteiksme.

### Eksperimentāla $H$ un $N$ noteikšana

Parasti hromatogrammā uz abscisas ass attēlo laiku. Sorbāta joslas izkļiedes mērvienība ir *sekundes*<sup>2</sup> un to apzīmē ar  $\tau^2$ , lai atšķirtu no  $\sigma^2$ , kuras mērvienības ir *cm*<sup>2</sup>. To var iegūt ar vienkāršu grafisku metodi, jo abas standartnovirzes saista sakarība:

$$\tau = \frac{\sigma}{L} t_R \quad (11.13)$$

kur  $\frac{L}{t_R}$  ir vidējais lineārais sorbāta kustības ātrums (*cm/s*).

Pieskares infleksijas punktus abās joslas pusēs pagarina līdz nulles līnijai un uz augšu, līdz izveidojas trijstūris, kura laukums ir apmēram 96% no kopējā joslas laukuma. Kā zināms, 96% joslas laukuma atbilst  $\pm 2\sigma$  (2 standartnovirzēm) no joslas maksimuma. Tas nozīmē atbilstošo  $\pm 2\tau$  standartnovirzi, un  $w = 4\tau$ .

Apvienojot (11.13) ar  $w = 4\tau$ , iegūst:

$$\sigma = \frac{Lw}{4t_R} \quad (11.14)$$

Ievietojot šo izteiksmi šķīvja augstuma izteiksmē (11.12), iegūst

$$H = \frac{Lw^2}{16t_R^2} \quad (11.15)$$

bet, ievērojot, ka  $N = L/H$ , teorētisko šķīvju skaitu var noteikt no diviem laiku mērījumiem –  $t_R$  un  $w$ :

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (11.16)$$

Var izmantot arī joslas platumu tās augstuma pusē:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2. \quad (11.17)$$

### Mainīgie, kas ietekmē kolonnas efektivitāti

Mainīgais	Simbols	Mērvienības
Kustīgās fāzes lineārais ātrums	$u$	$cm \times s^{-1}$
Difūzijas koeficients kustīgajā fāzē	$D_m$	$cm^2 \times s^{-1}$
Difūzijas koeficients nekustīgajā fāzē	$D_s$	$cm^2 \times s^{-1}$
Izdalīšanas faktors	$k'$	Bezdimensijas lielums
Sorbenta daļiņu diametrs	$d_p$	$cm, \mu m$
Šķidrās fāzes slāniņa biezums nekustīgajā fāzē	$d_t$	$cm, \mu m$

Joslas sniedz kvantitatīvu un kvalitatīvu informāciju par nosakāmo maisījumu.

- A. *Kvalitatīvā*: komponenta izdalīšanas laiks vienmēr ir nemainīgs lielums vienādos hromatogrāfiskos apstākļos. Izdalīšanas laiks ir laika periods, kas paiet starp parauga ievadīšanu un maksimālās signāla intensitātes sasniegšanu. Hromatogrāfiskos apstākļus veido kolonnas izmēri, nekustīgās fāzes daba, kustīgās fāzes sastāvs un plūsmas ātrums, parauga lielums un kolonnas termostata temperatūra. Tāpēc joslai atbilstošo vielu var noteikt, ievadot standartvielu tādos pašos apstākļos un salīdzinot izdalīšanas laikus.
- B. *Kvantitatīvā*: joslas laukums un augstums ir proporcionāli ievadītā parauga daudzumam. Kalibrācijas grafiku var iegūt no joslu laukumiem vai augstumiem, tos izmērot šķīdumiem ar precīzi zināmu koncentrāciju. Joslas lielums, ko rada komponents zināmā koncentrācijā, ir izmantojams nezināmas koncentrācijas parauga noteikšanai.

Hromatogrammu var izmantot, lai iegūtu informāciju par atdalīšanas efektivitāti (11.9. att.).

Lielums  $w$  ir joslas platumu pie pamatlīnijas ( $w = 4\sigma$ , kur  $\sigma$  ir standartnovirze Gausa sadalījumā). Lielums  $t_0$  ir laiks, kādā no kolonnas izdalās kustīgā fāze vai viela, kas dotajos apstākļos nesorbējas. Ja kolonnas garums ir  $L$ , plūsmas lineāro ātrumu  $u$  izsaka sakarība:

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (11.18)$$

Komponents, kas nekustīgajā fāzē nesorbējas, no kolonnas izdalās laikā  $t_0$ . Lielums  $t_R$  ir vielas izdalīšanas laiks un ir vienāds ar laiku, kas paiet no parauga ievadīšanas līdz brīdim, kad josla sasniedz maksimālo intensitāti. Izdalīšanas tilpums  $V_R$ :

$$V_R = F \times t_R \text{ un } V_0 = F \times t_0 \quad (11.19)$$

kur  $F$  ir plūsmas ātrums mL/min, bet  $V_0$  – kolonnas brīvais tilpums. Lielums  $V_R$  ir vienāds ar kustīgās fāzes tilpumu, kāds nepieciešams vielas izdalīšanai no kolonnas. Divus savienojumus ir iespējams atdalīt, ja tos raksturo atšķirīgi izdalīšanas laiki.

Lielums  $t_R'$  ir koriģētais izdalīšanas laiks:

$$t_R' = t_R - t_0 \quad (11.20)$$

kas ir atšķirīgs dažādiem komponentiem.

Lielums  $t_0$  ir vienāds visiem parauga komponentiem, jo ir laiks, kādu kolonnā pavada kustīgā fāze. Jo ilgāk viela uzturas nekustīgajā fāzē, jo vēlāk tā izdalās no kolonnas.

Izdalīšanas laiks ir funkcija no kustīgās fāzes plūsmas ātruma un kolonnas garuma. Ja kustīgās fāzes plūsma ir maza vai kolonna ir gara,  $t_0$  būs liels, tāpat kā  $t_R$ ; tāpēc  $t_R$  nav piemērots analizējamā

savienojuma raksturošanai. Šim nolūkam lieto **izdalīšanas faktoru  $k$**  (agrāk to sauca par *kapacitātes* faktoru un apzīmēja ar  $k'$ ):

$$k' = \frac{t_R'}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (11.21)$$

Lielums  $k$  nav atkarīgs no kolonnas garuma un kustīgās fāzes plūsmas ātruma. Tas ir saistīts ar vielas daudzuma attiecību nekustīgajā un kustīgajā fāzēs.

### Pierādījums:

Apzīmēsim kustīgās fāzes pārvietošanās ātrumu kolonnā ar  $u$  (cm/s), bet sorbāta  $X$  – ar  $u_x$ . Lielums  $u_x$  ir atkarīgs no vielas  $X$  daļas kustīgajā fāzē  $R$ , kā arī no kustīgās fāzes ātruma  $u$ :

$$u_x = u \times R \quad (11.22)$$

Ja molekulu  $X$  daļa kustīgajā fāzē ir nulle ( $R = 0$ ),  $u_x = 0$ , kas nozīmē, ka sorbāta molekulas uz priekšu nepārvietojas. Ja sorbāta mola daļa kustīgajā fāzē  $R=1$ , viela  $X$  cauri kolonnai pārvietojas tikpat ātri kā eluents un  $u_x = u$ . Izdalīšanas faktoru  $k'$  definē ar izteiksmi:

$$k' = \frac{n_n}{n_k} \quad (11.23)$$

kur  $n_n$  un  $n_k$  ir sorbāta daudzumi (molos) nekustīgajā un kustīgajā fāzē. Izteiksmi var pārveidot:

$$k'+1 = \frac{n_n}{n_k} + \frac{n_k}{n_k} = \frac{n_n + n_k}{n_k} \quad (11.24)$$

Tā kā

$$R = \frac{n_k}{n_n + n_k} = \frac{1}{k'+1} \quad (11.25)$$

kas nozīmē, ka:

$$u_x = \frac{u}{k'+1} \quad (11.26)$$

Lielumu  $u_x$  var izteikt ar izdalīšanas laiku  $t_R$  un kolonnas garumu  $L$  (laiks ir attālums dalīts ar ātrumu), bet  $t_0$  ir  $L$  pret  $u$ :

$$t_R = \frac{L}{u_x} \quad \text{un} \quad t_0 = \frac{L}{u} \quad (11.27)$$

Izsakot  $L$  no pēdējām divām izteiksmēm, iegūst:

$$t_R = \frac{u \times t_0}{u_x} \quad (11.28)$$

Ievietojot pēdējo izteiksmi sakarībā (11.27), iegūst sakarību (11.21).

Lai uzlabotu atdalīšanu, bieži nākas noteikt  $k$  vienai vai vairākām joslām hromatogrammā. Sakarība (11.21) to ļauj viegli izdarīt, ja vien ir zināma  $t_0$  vērtība.

Izdalīšanas koeficients ir saistīts ar sadalījuma konstanti starp nekustīgo un kustīgo fāzi sakarībā:

$$k' = K \times \frac{V_n}{V_k} \quad (11.29)$$

kur  $K$  ir sadalījuma konstante:

$$K = \frac{[X]_n}{[X]_k} \quad (11.30)$$

Ievērojot, ka  $n_n = [X]_n V_n$  un  $n_k = [X]_k V_k$ , sakarības (11.29) pastāvēšana ir viegli saprotama, ja  $V_n$  ir nekustīgās fāzes, bet  $V_k$  – kustīgās fāzes tilpumi hromatogrāfiskajā kolonnā.

Izdalīšanas faktors ir tieši proporcionāls nekustīgās fāzes aizņemtajam tilpumam vai īpatnējai virsmai ( $m^2/g$ ) adsorbentu gadījumā. Kolonna, kas pildīta ar porainā virsmas slāņa daļiņām, ļauj iegūt mazākas  $k'$  vērtības un tāpēc īsākus analīzes laikus nekā kolonnas ar viscaur porainām daļiņām, pārējie apstākļi paliek nemainīgi. Silikagels ar šaurām porām ļauj iegūt lielākas  $k$  vērtības nekā tas pats lielporains materiāls.

Divu komponentu maisījumu nav iespējams atdalīt, ja vien tiem nav atšķirīgas  $k'$  vērtības. Šo atšķirību novērtēšanai lieto atdalīšanas faktoru  $\alpha$  (agrāk – atdalīšanas selektivitāti):

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1} \quad (11.31)$$

Ja  $\alpha = 1$ , vielu atdalīšana nav iespējama, jo izdalīšanas laiki ir vienādi. Atdalīšanas faktors ir hromatogrāfiskās sistēmas potenciāla mērs divu vielu atdalīšanai, proti, tās selektivitāte. Izvēloties dažādas nekustīgās un kustīgās fāzes, iespējams mainīt selektivitāti  $\alpha$ .

Divu blakus esošu joslu izšķiršanu  $R_s$  definē kā attiecību attālumam starp to maksimumiem, jeb izdalīšanas laiku starpību  $\Delta t_R$  un vidējo aritmētisko no divu joslu platumiem ( $w_1$  un  $w_2$ ):

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2_1} + w_{1/2_2}} \quad (11.32)$$

kur  $w_{1/2}$  ir joslas platums augstuma pusē.

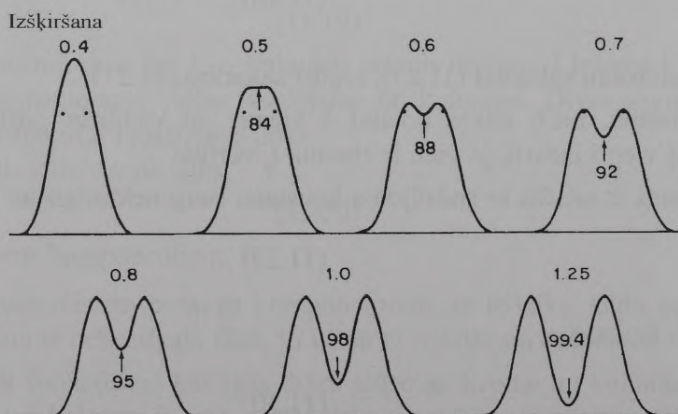
Ja  $R_s = 1$ , joslas nav atdalītas pilnīgi, lai arī to virsotnes ir labi saskatāmas. Infleksijas punkta pieskares krustojas uz nulles līnijas. Kvantitatīvai analīzei vairumā gadījumu izšķiršanas vērtība 1,0 ir nepietiekama. Nepieciešams sasniegt tā saukto nulles līnijas izšķiršanu, kas  $R_s = 1,5$ . Ja kāda no joslām ir ievērojami lielāka par otru, var būt nepieciešama arī augstāka izšķiršana.

Vienam teorētiskam šķīvīim atbilstošais augstums  $H$  ir izrēķināms, ja zināms kolonnas garums  $L$ .

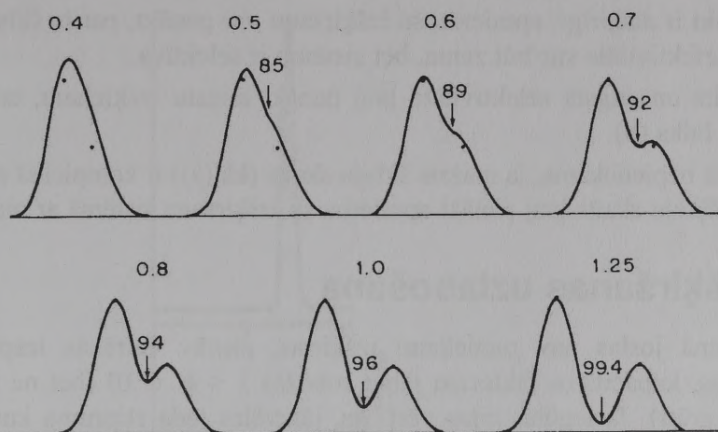
$$H = \frac{L}{N}$$

Lielums  $H$  ir sorbenta slānīša garums, kādā iestājas hromatogrāfiskais līdzsvars.

Iegūstot nelielu pieredzi, nav pārāk grūti izšķiršanu  $R_s$  noteikt vizuāli. Nākamie attēli tam var labi palīdzēt. Tajos redzami joslu pāri ar dažādām izšķiršanām un lieluma attiecībām 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1, 32:1, 64:1 un 128:1. Novietojot šos šablonus līdzās datu apstrādes sistēmai, joslu izšķiršanu var novērtēt jebkurā laikā. Reāli tomēr tie var atšķirties no ideālajiem attēliem, jo reālās joslas mēdz būt asimetriskas un to platumi ir dažādi.



11.9. att. Joslu novietojums ar dažādu izšķiršanu un lielumu attiecību 1:1



11.10. att. Joslu pāru novietojums ar dažādām  $R_s$  vērtībā un lielumu attiecību

## 11.4. Faktori, kas ietekmē izšķiršanu

Atdalīšanas faktors (selektivitāte)  $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$  un  $k_1 \approx k_2 = \bar{k}$ , tāpēc:

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \left( \frac{k_1}{1+k} \right) = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N} \times \frac{k_2}{1+k} \quad (11.33)$$

kur  $\bar{k} = \frac{k_1 + k_2}{2}$

Sakarību (11.33) sauc par hromatogrāfiskās atdalīšanas pamatsakarību.

**Selektivitāte**  $\alpha$  kļūst liela, ja atdalāmie komponenti iedarbojas ar kustīgo un/vai nekustīgo fāzi dažādos intensitātes līmeņos. Šajā gadījumā ārkārtīgi svarīgs ir mijiedarbības spēku raksturs (dispersijas spēki, dipola-dipola mijiedarbības, ūdeņraža saite,  $\pi$ - $\pi$  iedarbības, pH vērtība jonu apmaiņas hromatogrāfijā u. c.).

Lielums  $N$  raksturo kolonnas efektivitāti. Teorētisko šķīvju skaits palielinās kā funkcija no sorbenta slāņa kvalitātes (viendabīguma), kolonnas garuma un optimālāka kustīgās fāzes plūsmas ātruma. Kolonna ar lielāku šķīvju skaitu spēj atdalīt maisījumus, kuru komponentiem ir līdzīgas  $\alpha$  vērtības. Ja  $\alpha$  ir tuva 1, nepieciešamās izšķiršanas sasniegšanai jāizmanto kolonna ar lielāku teorētisko šķīvju skaitu, kā tas izriet no 11.2. tabulas.

11.2. tabula

**Teorētisko šķīvju skaita ietekme uz izšķiršanas vērtību, atkarībā no atdalīšanas selektivitātes  $\alpha$ , ja  $k_1 = 10$**

Atdalīšanas selektivitāte $\alpha$	Teorētisko šķīvju skaits $N$	
	$R_s=1,0$	$R_s=1,5$
1,005	780 000	1 750 000
1,01	195 000	440 000
1,05	8100	18 000
1,10	2100	4800
1,25	320	860
1,50	120	260
2,0	40	90

Ja izdalīšanas laiki ir atšķirīgi, apmierinošu izšķiršanu var panākt, pat ja šķīvju skaits ir samērā mazs (a) – kolonnas efektivitāte var būt zema, bet sistēma ir selektīva.

Liels šķīvju skaits un augsta selektivitāte ļauj panākt augstu izšķiršanu, taču nevajadzīgi var palielināties analīzes laiks (b).

Izšķiršana var kļūt nepietiekama, ja mazais šķīvju skaits (kā (a)) ir komplektā ar zemu selektivitāti (c). Kolonnas lielais šķīvju skaits ļauj panākt apmierinošu izšķiršanu sistēmā ar mazu selektivitāti (d).

## 11.5. Joslu izšķiršanas uzlabošana

Ja hromatogrammā joslas nav pietiekami izšķirtas, pastāv vairākas iespējas uzlabot vielu atdalīšanu. Kā zināms, kapacitātes faktoram jābūt robežās  $1 < k' < 10$  (bet ne mazākam par 5, ja atdalīšanu panākt ir grūti). Ja iegūtas citas vērtības, jāizvēlas tāda stipruma kustīgā fāze, kas ļauj iegūt atbilstošās  $k'$  vērtības. Ja atdalīšana joprojām ir neapmierinoša, jāpalielina teorētisko šķīvju skaits:

(i) nopērkot vai pagatavojot labāku kolonnu,

(ii) lietojot garāku kolonnu, vai saslēdzot virknē vairākas kolonnas (pie nosacījuma, ka abas kolonnas ir efektīvas, jo, saslēdzot efektīvu kopā ar neefektīvu, tiks iegūts neapmierinošs rezultāts),

(iii) optimizējot kustīgās fāzes plūsmas ātrumu tā, lai tas atbilstu minimumam van Demtera līknē. Ja parauga molekulu difūzijas koeficienti kustīgajā fāzē ir zināmi, iespējams aprēķināt reducēto plūsmas ātrumu  $v$ , ja atdalīšana veikta van Demtera optimuma tuvumā.

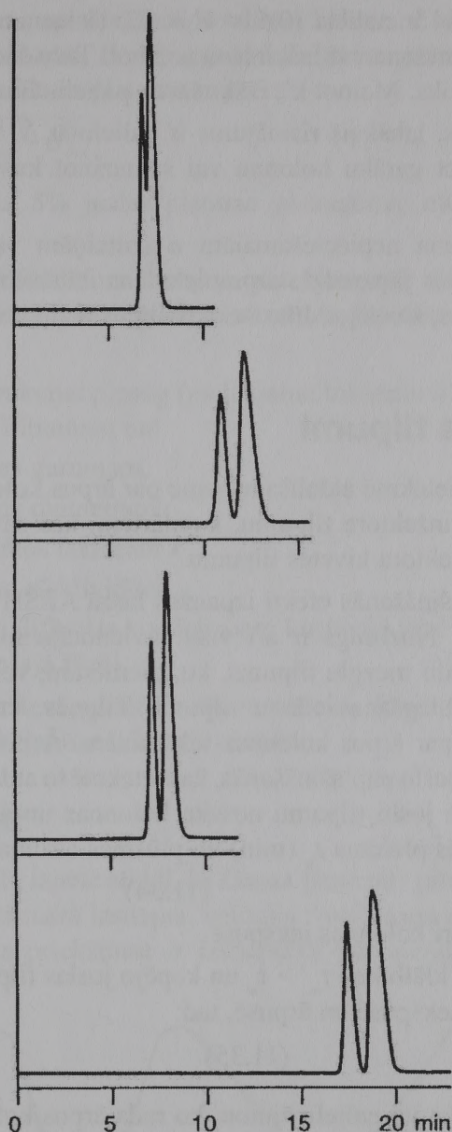
Izšķiršana ir proporcionāla kvadrātsaknei no šķīvju skaita.

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \left( \frac{k_1}{1 + k} \right) = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N} \times \frac{k_2}{1 + k}$$

Tas nozīmē, ka, divkāršojot šķīvju skaitu, efektivitāte palielināsies  $\sqrt{2} = 1,4$  reizes. Vienlaicīgi pieaugs analīzes laiks. Ja kolonna ir sabojāta un tai ir 3000 t. šķ. domājamo 6000 vietā, tā ir jānomaina pret jaunu.

Visefektīvākais, bet arī grūtākais ceļš izšķiršanas uzlabošanai ir selektivitātes  $\alpha$  paaugstināšana. To var panākt, nomainot nekustīgo fāzi ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  pret  $\text{SiO}_2$  vai tiešās fāzes metodi pret apgriezto fāzi). Tomēr vieglāk tas ir panākams, nomainot kustīgo fāzi. Jaunajai fāzei vajadzētu būt ar to pašu stiprumu kā sākotnējai (ja  $k$  ir optimizēts), bet ir nepieciešams, lai tā atšķirīgā veidā mijiedarbojas ar parauga molekulām. Piemēram, dihloretāns un dietilēteris tiešās fāzes metodē ir ar vienādu stiprumu, lai arī to dipoli un protonakceptorās īpašības ir dažādas.

11.11. attēlā redzams, kā mainās joslu novietojums atkarībā no  $k$ ,  $\alpha$  vai  $N$ , pārējiem faktoriem nemainoties. Sākotnējā izšķiršana  $R_s = 0,8$ .



Neapmierinoša izšķiršana ( $R_s=0,8$  augšā) un tās uzlabošanās, ko iegūst, palielinot  $k'$ ; palielinot  $N$ ; palielinot  $\alpha$ .

11.11. att. Trīs iespējas izšķiršanas uzlabošanai

## 11.6. Atdalīšanas kontrole

Sekmīgu AEŠH atdalīšanas stratēģiju var iedalīt 7 stadijās:

1. Izvēlēties vienu no 6 AEŠH metodēm.
2. Iegādāties vai papildīt piemērotu kolonnu.
3. Izvēlēties sākotnējos eksperimenta apstākļus.
4. Veikt pirmo mēģinājumu.
5. Novērtēt iegūto hromatogrammu un noteikt, kas tajā ir jāmaina (ja vispār jāmaina), lai sasniegtu nepieciešamo izšķiršanu.
6. Novērtēt nepieciešamos apstākļus galīgai atdalīšanai.
7. Ja nepieciešams, risināt speciālas problēmas vai lietot īpašas metodes.

Ja sākotnējā mēģinājumā  $k'$  ir neliels ( $0,5 < k' < 2$ ), tā samazināšana izšķiršanu pasliktinās, tāpēc kapacitātes faktora palielināšana var izšķiršanu uzlabot. Taču šādā gadījumā samazināsies joslu augstumi un pieaugu analīzes laiks. Mainot  $k'$ , izšķiršanas palielināšana ir panākama visvieglāk.

Ja  $k'$  ir optimālajās robežās, labākais risinājums ir palielināt  $N$ . Lietojot maza izmēra sorbenta daļiņas,  $N$  var palielināt, ņemot garāku kolonnu vai samazinot kustīgās fāzes ātrumu. Tomēr tas palielinās analīzes laiku.

Pareizu apstākļu paredzēšana nepieciešamajām  $\alpha$  izmaiņām var prasīt vairāk pūļu nekā to eksperimentāla sasniegšana, jo ir jāparedz starpmolekulāro iedarbību raksturs starp analizējamām vielām un sorbentu. Tomēr pūles, kas ieguldītas selektivitātes maiņā, var atmaksāties, ja paredzamais paraugu skaits ir liels.

## 11.7. Ārpus kolonnas tilpumi

Tilpnes AEŠH iekārtā, kas ietekmē atdalīšanu, sauc par ārpus kolonnas tilpumiem (*extra-column volumes*). Jēdziens attiecas uz inžektora tilpumu, kapilāriem, kas savieno inžektoru ar kolonnu un kolonnu ar detektoru, kā arī detektora kivetes tilpumu.

Ārpus kolonnas joslu paplašināšanās efekti izpaužas katrā AEŠH sistēmā un noteiktās situācijās var radīt nopietnas problēmas. Nozīmīgs ir arī visu savienotāju mezglu tilpums un, atkarībā no iekārtas konstrukcijas, arī papildu mezglu tilpums, ko, piemēram, veido detektora iekšpusē paslēpti siltumapmaiņas kapilāri vai ieslēgšanas vārstu tilpumi. Tilpnes, kas atrodas pirms inžektora un aiz detektora, nav uzskatāmas par ārpus kolonnas tukšumiem. Ārpus kolonnas tukšumiem ir jābūt minimāliem, jo tajos notiek gan joslu paplašināšanās, kas ietekmē to atdalīšanu, gan arī joslu asimetrijas palielināšanās. Ievadītā parauga joslu tilpumu nosaka kolonnas un ārpus kolonnas faktoru summa. Joslas tilpums  $V_p$  izsakāms ar tās platuma  $t_w$  (min) un plūsmas ātruma  $F$  (mL/min) reizinājumu:

$$V_p = t_w F \quad (11.34)$$

ja tās platumu nosaka faktori kolonnas iekšpusē.

Ja ir ārpus kolonnas efektu klātbūtne  $t_w' > t_w$  un kopējo joslas tilpumu detektorā  $V_w = t_w' F$  veido summa no faktoriem kolonnas iekšpusē un ārpusē, tad:

$$V_w^2 = V_p^2 + V_{ex}^2 \quad (11.35)$$

Tā kā ir svarīgi novērtēt relatīvo palielinājumu, ko rada ārpus kolonnas cēloņi, pēdējā izteiksme jāpārveido:

$$\frac{V_w}{V_p} = \sqrt{1 + \left(\frac{V_{ex}}{V_p}\right)^2} \quad (11.36)$$

Izteiksme rāda, ka ārpus kolonnas faktoru *relatīvais* ieguldījums būs *mazāks* joslām ar lielāku  $V_p$  (kuru tilpums bez ārpus kolonnu faktoriem ir lielāks, proti, kuras izdalās vēlāk).

Tam ir trīs svarīgi secinājumi:

1. Efektīvākas kolonnas ļauj iegūt šaurākas parauga joslas ar mazām  $V_p$  vērtībām, tāpēc lielu  $N$  un mazu  $H$  vērtību kolonnām ārpus kolonnu joslu paplašināšanās faktoru nozīme ir lielāka. AEŠH sistēma, kurā vienas kolonnas gadījumā ārpus kolonnas faktori nav nozīmīgi, tie var kļūt svarīgi, strādājot ar citu, efektīvāku kolonnu.
2. Tā kā  $t_w$  un  $V_p$  palielinās līdz ar  $t_R$ , ārpus kolonnu paplašināšanās cēloņi kļūst svarīgāki joslām, kas izdalās tieši analīzes sākumā, salīdzinājumā ar tām, kas izdalās vēlāk.
3. Lietojot platākas un garākas kolonnas, iegūst lielākas  $V_p$  vērtības, tādējādi samazinās ārpus kolonnas joslu paplašināšanās cēloņu nozīmība.

Tukšumu ieguldījums joslas paplašināšanā ir aditīvs lielums. Lielums  $\sigma^2$  veidojas no inžekcijas, kapilāriem, savienojumiem, kolonnas (kurā notiek atdalīšanas process) un detektora ieguldījuma summas, veidojot galīgo Gausa līknes platumu  $w = 4\sigma$ :

$$w = \sqrt{\sigma_{inj}^2 + \sigma_{kap}^2 + \sigma_{sav}^2 + \sigma_{kol}^2 + \sigma_{det}^2} \quad (11.37)$$

Ja katra sastāvdaļa iegulda 5% joslas platumā pieaugumā, efektivitātes pazeminājums kļūst ievērojams.

Tā kā iekārtā detektora un inžektora maiņa ir sarežģīta, tad atliek izvēlēties pareiza diametra kapilārus, kas savieno atbilstošās hromatogrāfa sastāvdaļas. Pareiza izvēle nozīmē iekšējo diametru 0,17 vai 0,25 mm.

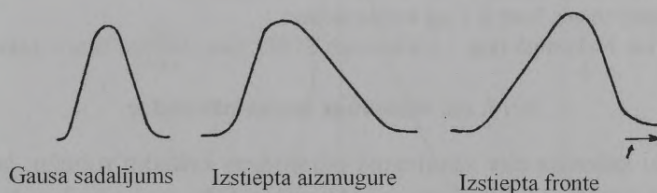
Prasības instrumenta konstrukcijai pieaug (pieļaujamo tukšumu tilpums samazinās), samazinoties interesējošās joslas izdalīšanas tilpumam un:

- samazinoties kolonnas garumam,
- samazinoties kolonnas diametram,
- samazinoties kapacitātes faktoram  $k'$ ,
- palielinoties kolonnas efektivitātei,
- samazinoties parauga difūzijas koeficientam kustīgajā fāzē (atdalīšanai apgrieztajā fāzē tas ir nozīmīgāk nekā tiešajā fāzē).

Ja agrāk izdalītām joslām ir ievērojami mazāk teorētisko šķīvju nekā tām, kas izdalās vēlāk, tad tas norāda uz parazitāro ārpus kolonnas tukšumu esamību.

## 11.8. Joslu asimetrija

Sīkāka hromatogrāfisko joslu izpēte atklāj, ka Gausa līkne nav pilnīgi simetriska – tās aizmugures daļa parasti ir lielākā vai mazākā mērā izstiepta, veidojot “asti”, kura raksturo joslas asimetriju. Retāk novēro pretēju parādību: joslas priekšpuse ir izstieptāka par aizmuguri. Iespējamās joslu formas redzamas 11.12. attēlā.



11.12. att. Iespējamie joslu asimetrijas veidi tuvplānā – Gausa sadalījums, izstiepta joslas aizmugure un izstiepta fronte

Nelielas novirzes no Gausa formas ir uzskatāmas par normālu parādību, savukārt palielināta asimetrija norāda uz hromatogrāfiskās sistēmas neoptimāliem darbības apstākļiem. Astes izraisa kolonnas šķīvju skaita pazeminājumu, kas samazina joslu izšķiršanu, tāpēc ir jāatrod un jānovērš to rašanās cēloņi. Integratoram ir grūtāk atrast joslas beigas.

### 11.8.1. Asimetrijas cēloņi

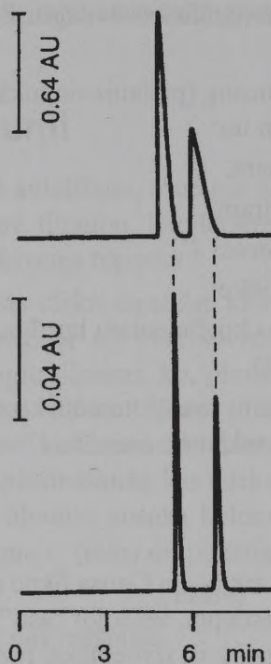
Nevienmērīgi piepildīta vai sabojāta kolonna var radīt joslas ar „pleciem” vai pat dubultjoslas. To var izraisīt parazitārās ārpus kolonnas tilpnes, kas nosaka ne vien joslas paplašināšanos, bet arī rada „astes”, uz ko norāda:

- joslas, kas izdalās agrāk, ir asimetriskākas par tām, kas izdalās vēlāk;
- asimetrija kļūst izteiktāka, palielinoties kustīgās fāzes plūsmas ātrumam.

To var novērst, saīsinot ceļu starp inžekcijas vārstu un sorbenta slāni kolonnā, kā arī starp kolonnas galu un detektoru. Jāizmanto šaurāki kapilāri un mazāka detektora kivete.

### 11.8.2. Kolonnas pārslodze

Kolonna nav spējīga atdalīt jebkuru vielas daudzumu. Ja tajā ievadīts pārāk liels paraugs, kapacitātes faktori un joslu platumi kļūst atkarīgi no parauga lieluma. Joslas kļūst platākas un asimetriskākas, vienlaicīgi mainoties izdalīšanas laikiem. **Asimetrija** nosaka izdalīšanas parametru samazinājumu.



Augšā: hromatogramma maisījumam, kurā ir 2 mg acetofenona un veratrola.

Apakšā: hromatogramma maisījumam, kurā ir 2 µg katras vielas.

Kolonna, 25 cm × 3,2 mm i.d. Nekustīgā fāze – LiChrosorb SI 60, 5µm; kustīgā fāze – heksāns: dietilēteris (9:1), UV detektors ar  $\lambda = 290$  nm.

#### 11.13. att. Kolonnas masas pārslodze

Atbilstoši definīcijai kolonna nav sasniegusi pārslodzes kritisko robežu, ja  $k$  atšķiras mazāk par 10% salīdzinājumā ar bezgalīgi mazu paraugu. Vairums fāžu nav pārslogotas, ja parauga masa ir mazāka par 10 µg vienā gramā sorbenta. Pieaugot parauga tilpumam vai koncentrācijai, kolonnas efektivitāte var būtiski samazināties.

Efektīvām kolonnām, kas pildītas ar maza izmēra daļiņām (<10 µm), raksturīga augstāka jutība pret šķīvjņu skaitu nekā izdalīšanas laiku. Maksimālo pieļaujamo kolonnas slodzi jānosaka konkrētam AĒSH pielietojumam.

Ievadot lielāku parauga tilpumu, bet mazākā koncentrācijā (vairāk atšķaidītu šķīdumu), var panākt mazāku šķīvjņu skaita zudumu, tomēr tas ir spēkā tikai tad, ja paraugs nepārsniedz 1/3 no pirmās nosakāmās joslas tilpuma. Kolonnas efektivitātes mērīšanai, ievadot tajā testa maisījumu, ieteicams lietot parauga lielumu ap 1 µg uz 1 g sorbenta. Tuvināti var uzskatīt, ka kolonnā ir aptuveni grams sorbenta (reāli atkarībā no kolonnas dimensijām ir no 0,5 g līdz 5 g).

### 11.8.3. Ķīmiskā asimetrija – parauga nesaderība ar kustīgās un/vai nekustīgās fāzes dabu

Joslas var būt asimetriskas arī tad, ja ārpus kolonnu tilpumi ir vismazākie un parauga lielums nepārsniedz  $1 \mu\text{g/g}$ . Tas var būt gadījumā, ja hromatogrāfiskās sistēmas kustīgās un nekustīgās fāzes daba ir pretēja paraugam. Tā ir ķīmiskā vai termodinamiskā asimetrija.

Tās rašanās iemesli var būt:

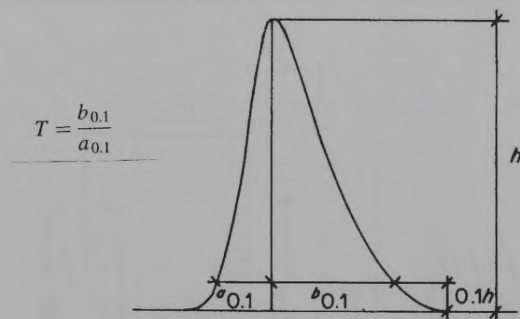
- parauga nepietiekama šķīdība kustīgajā fāzē;
- jaukts mijiedarbību mehānisms; apgrieztās fāzes hromatogrāfijā sevi var likt manīt ar alkilreāģentu neizreaģējušās silanolgrupas, īpaši, ja paraugam piemīt bāziska daba (11.14. att.);
- nekustīgā fāze jāiegūst no tīra silikagela, un tajā nedrīkst būt mijiedarbībai pieejamas silanolgrupas;
- analizējot joniskas dabas paraugu uz nekustīgās fāzes, kurā jonu nav;
- nekustīgās fāzes virsma ir pārāk aktīva, lai lietotu adsorbcijas hromatogrāfiju.

Problēmas risinājums: nomainīt kustīgo un/vai nekustīgo fāzi, nomainīt kustīgās fāzes pH vai lietot citu metodi (piemēram, jonu-pāru hromatogrāfiju). Lieluma pH maiņa var būt nepieciešama adsorbcijas hromatogrāfijā: etiķskābi vai skudrskābi mēdz pievienot kustīgajai fāzei, ja paraugam ir skāba daba. Piridīnu, trietilamīnu vai amonjaku pievieno, ja paraugs ir bāzisks.

Asimetriju skaitliski izsaka ar faktoru  $T$ , ko nosaka 10% augstumā no joslas kopējā augstuma  $h$ :

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad (11.39)$$

kur  $a_{0,1}$  ir attālums starp joslas fronti un maksimumu, kas izmērīts pie 0,1h, un  $b_{0,1}$  ir attālums starp joslas maksimumu un beigām, izmērīts pie 0,1 h.



11.14. att. Asimetriska josla

Lielumam  $T$  jābūt mazākam par 2,5. Ja  $T > 3$ , joslu kvantitatīvie mērījumi būs kļūdaini, jo kļūst problemātiski noteikt punktu, kurā joslas augstums sasniedz 0.

Piezīme: frontētas joslas gadījumā  $T < 1$ .

Asimetriskas joslas var aprakstīt ar eksponenciāli modificētu Gausa funkciju (EMG).

## 11.9. Temperatūras ietekme uz atdalīšanu AEŠH apstākļos

Nav iespējams formulēt stingras likumības temperatūras ietekmei uz atdalīšanu augsti efektīvās šķīdumu hromatogrāfijas (AEŠH) apstākļos. Parasti, palielinoties temperatūrai, kolonnas efektivitāte pieaug, jo samazinās kustīgās fāzes viskozitāte, kas paātrina masas pārnese procesus. Tomēr iespējama arī efektivitātes samazināšanās. Kapacitātes faktori var gan palielināties, gan samazināties.

Temperatūras pieauguma priekšrocība ir analīzes laika samazināšanā, jo kustīgās fāzes viskozitātes samazinājums un difūzijas koeficientu pieaugums tajā ļauj lietot lielāku plūsmas ātrumu.

Ja eluents vai parauga šķīdums ir viskozs, paaugstināta temperatūra ir pat vēlama: mazāks spiediens nepieciešams kustīgās fāzes sūkņēšanai, un parauga ievadīšana iespējama vienīgi šādos apstākļos. Optimizējot atdalīšanu, temperatūras ietekme vienmēr ir jāpārbauda; vienmēr pastāv iespēja veikt analīzi ātrāk un precīzāk temperatūrā, kas ir augstāka vai zemāka par sākotnējo. Var izmantot pat 100 °C (lai arī nepieciešamas dažas izmaiņas iekārtā).

**Visi hromatogrāfiskie līdzsvāri ir atkarīgi no temperatūras**, jo īpaši jonu līdzsvāri  $H_2O$  saturošās kustīgajās fāzēs (apgrieztās fāzes un jonu apmaiņas hromatogrāfijā). Tāpat no temperatūras ir atkarīgs līdzsvārs starp kustīgajā fāzē esošo ūdeni un uz virsmas adsorbēto ūdeni adsorbcijas metodē, turklāt paaugstinātā temperatūrā šāds līdzsvārs ir grūtāk kontrolējams, kas nepieņemami ietekmē kolonnas darbību. Atkārtojamība var būt slikta, ja termostats darbojas nestabili.

Silikagela šķīdība paaugstinātā temperatūrā palielinās visāda veida kustīgajās fāzēs. Tāpēc darbā ar ķīmiski saistītajām uz silikagela bāzes iegūtajām nekustīgajām fāzēm ir iesakāma termostatētu uztvērēju kolonnu (*scavenger column*) ieslēgšana pirms inžekcijas vārsta.

Kolonnas termostatēšana mūsdienu iekārtās parasti grūtības nerada. Arī kustīgās fāzes temperatūra ir jākontrolē pirms tās nonākšanas kolonnā (ar pietiekami gara kapilāra palīdzību). Pieejami arī sūkņi ar termostatējamām galviņām. Maksimālā pieļaujamā temperatūra ir ap 120 °C silikagela kolonnām un 80 °C – kolonnām ar saistīto fāzi.

Kolonnas pretestība kustīgās fāzes plūsmai izraisa tās sasilšanu. Empīriska likumība – uz katru 1 bar spiediena krituma, temperatūra palielinās par 0,1 °C vai par 10 °C uz 100 bar tīra ūdens gadījumā. Tāpēc ir ieteicams kolonnu dzesēt un strādāt ar mazu plūsmas ātrumu, ja izmanto kustīgās fāzes ar zemu vārīšanās temperatūru (kā n-pentānu, kas vārās 36 °C).

## 12. Iekārtas augsti efektīvajā šķidrumu hromatogrāfijā

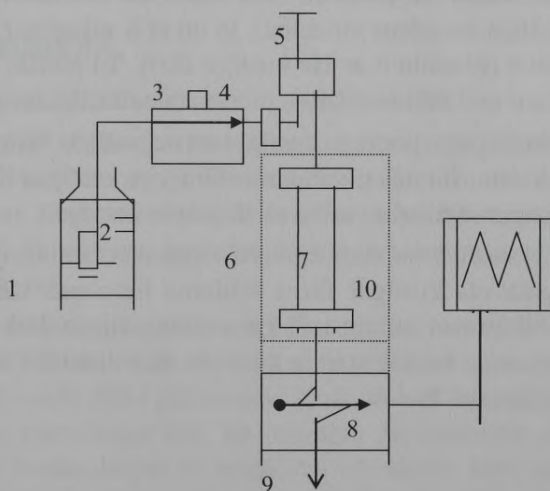
### 12.1. Vispārīgs raksturojums

Mūsdienu augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas (AEŠH) iekārtas ļoti atšķiras no vienkāršajām konstrukcijām, ko lietoja klasiskajā šķidrumu hromatogrāfijā. To uzdevums ir iegūt ticamus un atkārtojamus kvalitatīvās un kvantitatīvās analīzes rezultātus. Jaunas iekārtas parādās tirgū un sniedz dažādas iespējas cenas un izpildījuma ziņā. Tāpēc pirms galīgās izvēles nepieciešams iegūt informāciju no dažādiem ražotājiem un izplatītājiem. Integrētās iekārtas ir precīzākas, drošākas, mazāk atkarīgas no operatora kvalifikācijas, bet dārgākas. Tās ir nepieciešamas liela skaita vienvēidīgu analīžu veikšanai. Augsta efektivitāte ir atkarīga no visu sastāvdaļu darbības. Lieliska, efektīva kolonna, kas ievietota vāji konstruētā iekārtā, var dot nepareizus rezultātus.

12.1. tabula

Prasības mūsdienu AEŠH iekārtām

Prasības izpildījumam	Sistēmas raksturojums	Nepieciešamais aprīkojums
Daudzpusība	Lietojama dažāda veida paraugiem	Pret agresīvu vidi noturīgi materiāli, dažādi detektori, efektīvas kolonnas
Ātrums	Selektīvas un efektīvas kolonnas, liels kustīgās fāzes ātrums, ātri iegūstami rezultāti	Piemērots sūknis, maza brīvā tilpuma detektori un savienojumu mezgli, ātra un automātiska datu apstrāde
Atkārtojamība	Darba parametru kontrole	Precīza kontrole pār kolonnu un detektoru temperatūru, kustīgās fāzes sastāvu (gradientu), plūsmas ātrumu, detektora signālu
Jutība	Jutīgs detektora signāls, asas joslas	Pareizi konstruēts detektors ar labu signāla trokšņa attiecību, efektīvas kolonnas



1 – kustīgās fāzes rezervuārs, 2 – ieejas filtrs, 3 – sūknis, 4 – līnijas filtrs, 5 – ievadišanas krāns, 6 – termostats, 7 – kolonna, 8 – detektors, 9 – atkritumi, 10 – datu apstrādes sistēma.

12.1. att. AEŠH iekārtas shēma

Īpašu eksperimentu izpildei var būt nepieciešami arī citi komponenti. Objektīvo joslu paplašināšanos, kas notiek kolonnā, papildina ārpus kolonnas efekti.

*Likumība:* paplašināšanās, ko rada ārpus kolonnas efekti, nedrīkst būt lielāka par 1/3 no pirmās interesējošās joslas tilpuma. Tad jebkura joslas platuma pieaugums nepārsniegs 10%, kas nozīmēs nenozīmīgus izšķiršanas zudumus. Joslu paplašināšanos var izraisīt kolonnu nostiprinājuma vietas,

ievadīšanas krāni, bet visvairāk tā notiek kapilāros, kas savieno ievadīšanas mezglu ar kolonnu un kolonnu ar detektoru. Tāpēc kapilāriem jābūt pēc iespējas īsākiem un šaurākiem.

Bieži lietotājs konstatē, ka piegādātāja norādītais šķīvju skaits (16000) viņa iekārtā ir daudz mazāks. Tuvāka iekārtas analīze rāda, ka tai ir palielināti ārpus kolonnas tilpumi, kas arī nosaka efektivitātes samazināšanos.

Joslu paplašināšanos, ko nosaka instruments, var pazīt, ja vienai kolonnai pieslēdz otru. Šķīvju summai tad vajadzētu būt tuvākai ražotāja uzrādītajai, jo divu kolonnu kopējais tilpums ir kļuvis lielāks, bet fiksētais ārpus kolonnu tilpums – relatīvi mazāks (tā ieguldījuma daļa kopējā tilpumā samazinājusies).

## 12.2. Kustīgās fāzes rezervuārs

Reservuāram analītiskiem mērķiem jābūt ar vismaz 500 mL tilpumu, bet preparatīviem mērķiem – daudz lielākiem. Vienkāršākais rezervuārs sastāv no Erlenmeijera kolbas ar magnētisko maisītāju. Kustīgās fāzes līnijai uz sūkni ir jābūt apgādātai ar filtru, kas aiztur daļiņas ar diametru  $> 2 \mu\text{m}$ , lai nepieļautu to nokļūšanu sūknī. Lai nodrošinātu kustīgās fāzes atrašanos degazētā stāvoklī, rezervuāri ir apgādāti ar sildītāju, maisītāju, un telpā virs šķīduma atrodas inerta gāze.

Kustīgās fāzes degazācija nepieciešama, lai izdalītu tajā izšķīdušās gāzes un samazinātu gāzes burbuļu izdalīšanās iespēju sūknī un detektorā analīzes laikā. Degazācija uzlabo arī mērierīču darbību, neļaujot tajās izdalīties mikroburbuļiem. Skābekļa izdalīšana no kustīgās fāzes ir svarīga arī tāpēc, lai novērstu tā iespējamās reakcijas ar paraugu, nekustīgo fāzi un kustīgās fāzes komponentiem. Degazācija ir īpaši svarīga, ja izmanto ūdeni vai citus polārus šķīdinātājus (īpaši gradienta apstākļos). Napolāru šķīdinātāju gadījumā tās nozīme ir mazāka.

Degazāciju veic, piepildītu rezervuāru uz 3–4 minūtēm pievienojot retinājumam, vienlaicīgi intensīvi maisot. Degazāciju mēdz veikt, rezervuāru ievietojot ultraskaņas vannā – sonificējot. Degazāciju veicina sildīšana, tomēr tai jānotiek tādā mērā, lai neizmainītos kustīgās fāzes sastāvs (piemēram, organiskā šķīdinātāja un ūdens attiecība), jo no tā ir atkarīgs  $t_R$  un  $k'$ . Uzskata, ka labākā degazācija notiek He klātbūtnē (piesātinot ar He kustīgo fāzi). To panāk, dažas minūtes laižot cauri eluentam ātru He plūsmu, kuru pēc tam samazina, lai neizmainītu tās sastāvu.

He un  $N_2$  novērš viegli oksidējamo paraugu kustīgās un nekustīgās fāzes komponentu pārvēršanos, izdalot skābekļa zīmes no eluenta. Inertās gāzes atmosfēra virs kustīgās fāzes nepieļauj  $O_2$  atkārtotu izšķīšanu tajā, kā arī novērš ugunsnedrošo tvaiku aizdegšanās iespēju.

Tā kā kustīgās fāzes (k. f.) sastāvs var mainīties iztvaikošanas, oksidācijas un citu faktoru ietekmē, iesakāma ir tikai svaigi pagatavota kustīgās fāzes šķīduma lietošana, tādā veidā panākot optimālu atdalīšanas atkārtotamību. Atkārtotas un ilgstoši (piemēram, diennakti) uzglabātas kustīgās fāzes lietošana nav ieteicama. Jāatceras, ka pat neliela kustīgās fāzes sastāva maiņa var radīt izdalīšanas laiku, izšķiršanas un joslu augstumu maiņu.

## 12.3. Sūknis

### 12.3.1. Vispārējās prasības

Sūkņa uzdevums ir nemainīgas un atkārtojamas kustīgās fāzes plūsmas piegāde hromatogrāfiskajai kolonnai. Tā kā AEŠH kolonnas pildītas ar maza izmēra sorbenta daļiņām (3–10  $\mu\text{m}$ ), tām piemīt liela pretestība kustīgās fāzes plūsmai. AEŠH sūkņiem jāapvieno divas atšķirīgas īpašības: tiem ir jāspēj attīstīt augsts spiediens (350 un pat 500 bar) un vienlaikus jānodrošina augsta plūsmas pareizība un precizitāte pie jebkura izvēlēta plūsmas ātruma (piemēram, 2,04 mL/min uzdoto 2,00 mL/min vietā var radīt 2% kļūdu).

Sūkni raksturo:

- atkārtojamība;
- precizitāte īsās laika vienībās;
- sūkņa troksnis (pulsācijas);
- ilglaicīga mērīšanas precizitāte (dreifs);
- precizitāte.

Plūsmu intervālam ir jābūt robežās no 0,1 mL/min līdz 5–10 mL/min, un plūsmai šajā apgabalā jāspēj mainīties ar soli 0,1 mL/min. Ir modeļi, kas spēj kolonnas ieejā radīt spiedienu ap 700 bar un nodrošināt plūsmas ātrumu 28 mL/min.

**Sūkņa radītajai plūsmai jābūt neatkarīgai no pretspiediena**, pat ja tas mainās atdalīšanas gaitā, kā tas parasti notiek kustīgās fāzes gradienta apstākļos.

Sūkņa dreifs ir ilglaicīga, nepārtraukta sūkņa jaudas maiņa (palielināšanās vai samazināšanās) ilgā laika periodā (stundās), visbiežāk apkārtējā gaisa temperatūras maiņas ietekmē. Plūsma nedrīkst pulsēt, īpaši, ja lieto refraktometru, vadītspējas vai elektroķīmisko detektoru.



12.2. att. Plūsmas pulsāciju profils apaļa diska gadījumā

Sūknim jābūt vienkārši un ērti vadāmam un apkalpojamam, lietojot dažas vienkāršas komandas. Nedrīkst rasties sarežģījumi eluenta maiņas gadījumā. Sūkņa iekšējam tilpumam ir jābūt mazam, lai varētu ātri nomainīt eluentu, kaut arī zināms papildu tilpums nepieciešams pulsāciju slāpēšanai. Sūkņa daļu nomainai jābūt vienkāršai un ātri izpildāmai.

Augstais spiediens, kas nepieciešams AEŠH, nav nepieciešams metodei kā tādai. Tā lietošana ir saistīta ar faktu, ka kustīgā fāze ir šķidrums ar visai augstu viskozitāti, kuru nākas saspīest, lai tas varētu virzīties cauri blīvi novietotām ļoti sīkām sorbenta daļiņām. Smalku daļiņu gadījumā ir niecīgs difūzijas attālums, tāpēc var iegūt lielu skaitu teorētisko šķīvju uz garuma vienību.

### 12.3.2. Īsgājiena virzuļsūknis

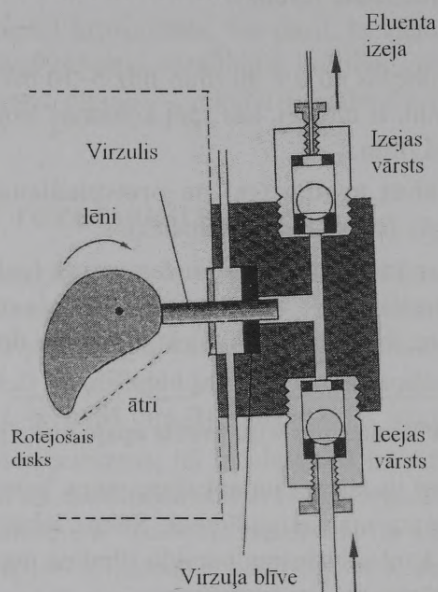
Īsgājiena virzuļsūkņa principiālā uzbūve attēlota 12.3. attēlā.

Plūsmas ātrumu  $F$  regulē, mainot darba tilpumu vai virzuļa gājiena frekvenci. Darba tilpums mainās līdz ar gājiena attālumu. Katra gājiena sākumā kustīgā fāze tiek nedaudz saspīesta, tāpēc liela spiediena gadījumā plūsmas ātrums ir nedaudz mazāks, ja pārējie apstākļi paliek nemainīgi. Vārsti darbojas asimetriskā veidā: tie aizveras, spiedienam sākot pieaugt un atveras, kad spiediens to lejas pusē ir augstāks nekā augšpusē.

Ar riņķveida diska palīdzību iegūtā plūsma nebūtu nepārtraukta un vienāda. Tāpēc tās uzlabošanai lieto neregulāras formas rotējošo disku, kas nodrošina virzuļa ātruma maiņu pēc noteiktas programmas. Darba gājiena laikā elipses veida disks pārvietojas lēnām, un tā forma nodrošina nemainīgu plūsmu. Uzpildīšanās gājienā disks pārvietojas ātri, kā rezultātā pārtraukums plūsmas padevē ir mazākais iespējamais. Pastāv sūkņu konstrukcijas ar vairākiem virzuļiem, kuru stāvoklis attiecībā citam pret citu ir nobīdīts. Tas ļauj novērst kustīgās fāzes saspiežamību un tvaiku burbuļu veidošanos iesūkšanas gājienā. Ar paralēli saslēgtiem divu virzuļu sūkņiem, kuros virzuļu kustība notiek pretējās fāzēs, panāk ievērojamu plūsmas pulsācijas samazinājumu (brīdī, kad viens veic darba gājienu, otrs uzpildās).

Sūkņu elektronika ir tā konstruēta, lai izslēgtu eluenta saspiežamību (kas, par laimi, ir maza – aptuveni 1% uz 100 bar). Virzuļi ir izgatavoti no safīra, tāpēc ir trausli un var saplīst, nokrītot uz grīdas. Normālas sūkņa darbības apstākļos virzuļa salūšanas gadījumi ir reti. Ja buferšķīdums palicis sūkņa galvas iekšpusē, laika gaitā šķīdinātājs var iztvaikot un izveidoties sāļu kristāliņi. Šādos apstākļos ieslēdzot sūkni, virzuļa virsma tiks saskrāpēta un plūsmas padeve kļūs neprecīza. Virzuļa blīves ir no inerta polimēra (Kel-F), virzuļi ir blīvējošā atspere, kas ir redzama no vienas puses. Tāpēc

ir svarīga blīvju orientācija to nomainas gadījumā. Blīvju uzbūve ļauj sūkņim radīt augstu spiedienu, vienlaikus ļoti nedaudz laižot cauri kustīgo fāzi, kura samazina virzuļa berzi ar cilindra sienām un uztur blīves elastīgā stāvoklī. Vairumam mūsdienu sūkņu ir skalojošais kanāls, kurā cirkulē šķidrums, parasti ūdens, kas pasargā virzuli no bufera sāļiem vai abrazīvajām virzuļu blīvju daļiņām. Skalošanas kanālam pašam ir nepieciešama blīve. Par to kalpo teflona ķermenis, kas neatrodas zem spiediena.



Kustīgās fāzes pārvietošanu veic virzulis, kamēr kontrolvārsti, kas atveras un aizveras, nosaka šķidruma plūsmu noteiktā virzienā. Tumši tonētā detaļa, kurā iemontēti vārsti, ir sūkņa galva.

Sūkņēšanu nodrošina motorīņš, kas kustina rotējošo disku (*cam*), kurš liek virzulim kustēties “uz priekšu un atpakaļ” virzienos. Katrā gājienā virzulis pārvieto nelielu šķidruma daudzumu, parasti ap 100  $\mu\text{L}$  (sūkņa darba tilpums ir 35–400  $\mu\text{L}$ ), pārvarot kolonnas radīto pretestību (pretpiedienu).

### 12.3 att. Īsgājiena virzulsūkņa darbības princips

Vārstu lodītes ir no rubīna, bet lodīšu ligzdas – no safīra. Atrazdamās ligzdā, lodītes blīvējot izveido šauru gredzenu, abām daļām atrodoties kontaktā. Ja tur iekļūst kāds puteklis vai kristāliņš no buferšķiduma, vārsts sāk tecēt. Šī iemesla dēļ kustīgajai fāzei jābūt brīvai no cietvielu daļiņām.

#### 12.3.3. Apkope un nomaina

Sūkņis ir precīzas darbības iekārta, tāpēc ir jāuztur ar tādu pašu rūpību kā analītiskie svāri. Jāievēro visi instrukciju norādījumi. Arī vislabākajos darbības apstākļos laiku pa laikam nepieciešama sūkņa apkope. Pēc noteikta laika rotējošajam diskam ir nepieciešama eļļošana. Jāievēro instrukcija. Sūkņa galvas apkopei nepieciešama tīrība un atbilstoši instrumenti.

Svarīgi ievērot divus ieteikumus:

1. **Nekad nedarbināt sausu sūkni!**
2. **Neizslēgt sūkni, kad tas ir piepildīts ar buferšķidrumu.** Tas vienmēr ir jāaizvieto ar ūdeni, kuru vēlāk nomaina ar organisko šķīdinātāju. Sūkni nedrīkst pakļaut pretpiedienam, kas pārsniedz maksimāli pieļaujamo (tas ir norādīts pasē), jo tas var deformēt blīvējumu un radīt sūci.

## 12.4. Iekārtas sagatavošana parauga ievadīšanai

### 12.4.1. Kustīgās fāzes izvēle

Kustīgo fāzi jāizvēlas atbilstoši tās hromatogrāfiskajām īpašībām: tai piemērotā veidā ir jāiedarbojas ar nekustīgo fāzi, lai maisījumu atdalītu maksimāli ātri un efektīvi.

Vispārīga likumība: šķīdinātāju dažādība ļauj potenciāli atrisināt jebkuru problēmu, bet to izvēle ir jābalsta uz dažādiem kritērijiem.

1. *Viskozitāte*: uzturot vienu un to pašu plūsmas ātrumu, mazas viskozitātes šķīdinātājs rada mazāku spiediena kritumu kolonnā nekā viskozais šķīdinātājs. Lietojot šķīdinātāju ar mazu viskozitāti, hromatogrāfiskais process noritēs ātrāk, jo masas pārnese notiks ātrāk. Šķīdinātāja dinamisko viskozitāti  $\eta$  izsaka milipaskālu sekundēs ( $\text{mPa} \times \text{s}$ ) (agrāk lietoja centipuasus (cP); skaitliskā vērtība ir tā pati).
2. *UV caurlaidība*: lietojot UV detektoru, kustīgajai fāzei jābūt pilnīgi caurlaidīgai pie nepieciešamā viļņu garuma, piemēram, etilacetāts neder darbam pie 254 nm, jo tā optiskā caurlaidība nav pietiekama līdz 275 nm (absorbēcija mazāka par 10%). Izmantojot buferšķīduma sāļus, jonu pāra reaģentus un citas piedevas, jāievēro to UV caurlaidība.
3. *Laušanas koeficients*: svarīgs, ja izmanto refraktometrisko detektoru. Strādājot ar šo detektoru tuvu tā jutības robežai, ir svarīgi, lai parauga un kustīgās fāzes laušanas koeficienti būtu maksimāli atšķirīgi.
4. *Viršanas punkts*: zemā temperatūrā virstošus šķīdinātājus izvēlas, ja nepieciešams tos atdalīt no parauga – tādā gadījumā kustīgo fāzi izdosies aiztvaicēt zemākā temperatūrā, kas ir svarīgi termiski nestabiliem savienojumiem. No otras puses, šķīdinātāji ar augstu tvaika spiedienu darba temperatūrā mēdz detektorā veidot tvaiku burbuļus.
5. *Tīrība*: šim kritērijam var būt dažāda nozīme atkarībā no veicamā uzdevuma: šķīdinātājā nedrīkst būt savienojumi, kas traucē izvēlētajam detektēšanas veidam; jānovērš tādu savienojumu klātbūtne, kas traucē eluāciju gradientā. Veicot preparatīvo izdalīšanu, šķīdinātājā nedrīkst atrasties negaistošas atlikumvielas. Heksānam AEŠH mērķiem nav jābūt absolūti tīram – tas drīkst saturēt heksāna izomērus, jo tie netraucē eluācijas procesam (tajā nedrīkst būt benzols, pat zīmju veidā, ja lieto UV detektoru).
6. *Inerts attiecībā pret parauga savienojumiem*: kustīgā fāze nekādā veidā nedrīkst reaģēt ar parauga maisījumu (peroksīdi!). Ja strādā ar paraugiem, kas ir jutīgi pret oksidāciju, kustīgajai fāzei jāpievieno 0,05% antioksidanta – 2,6-di-tert-butil-p-krezola (BHT). BHT ir viegli iztvaicējams, bet tas absorbē UV apgabalā zem 285 nm.
7. *Noturība pret koroziju*: gaisma veicina HCl izdalīšanos no hloru saturošiem šķīdinātājiem. Pat ūdens zīmes šajos šķīdinātājos izveido sāļsskābi, kas izraisa tērauda daļu koroziju. Polāru šķīdinātāju klātbūtnē korozija kļūst intensīvāka. Īpaši reaktīvi ir tādi maisījumi kā tetrahidrofurāns/tetrahlorglekli vai metanols/tetrahlorglekli. Visi jonu savienojumus veidojošie savienojumi kā hlorīda, bromīda, jodīda, acetāta, citrāta vai formiāta joni (buferšķīdumi!) ir ar korozīvām īpašībām. Ar stipri izteiktām korozīvām īpašībām ir Li sāļu buferšķīdumi zemās pH vērtībās. Tērauds korodē arī metanola vai acetonitrila iedarbībā. Pēc hloru saturošas kustīgās fāzes lietošanas iesakāma mazgāšana ar šķīdinātāju, kas brīvs no joniem un halogēniem.
8. *Toksiskums*: katrai laboratorijai ir jārisina problēmas, kas saistītas ar toksisku vielu aizvadīšanu, cik vien tālu iespējams.

Vispārēja ir prasība, lai kustīgā fāze nebūtu aktīva pret detektoru; lai tai nepiemistu īpašība, kuru izmanto detektēšanā (izņēmums ir netiešā detektēšana). Pretējā gadījumā novēro nevēlamas pārmaiņas nulles līnijā un neīsto joslu parādīšanos hromatogrammā.

## 12.4.2. Kustīgās fāzes pagatavošana

Pareizai kustīgās fāzes izvēlei seko tās rūpīga pagatavošana. Pareizākā prakse ir lietot šķīdinātājus un reaģentus ar atzīmi “*AEŠH grade*” vai ar līdzīgu kvalitāti. Tas ir spēkā arī attiecībā uz ūdeni, ja tā iegūšana laboratorijas apstākļos nav pietiekami kvalitatīva. “*AEŠH grade*” šķīdinātāju izmantošana garantē labāko UV caurlaidību un novērš tādu nevēlamu vielu klātbūtni, kuras var izmainīt eluējošo spēku vai radīt neīstas joslas, lietojot atdalīšanu gradienta apstākļos. Ja pieejami tikai sliktākas kvalitātes šķīdinātāji, tie ir jāattīra, lietojot fracionēto destilāciju vai adsorbcijas hromatogrāfiju.

Jaukto kustīgo fāžu vai buferšķīdumu pagatavošanas procesam jābūt sīki aprakstītam. Eluenta īpašības var ievērojami atšķirties atkarībā no iegūšanas stadiju secības, piemēram, dažādu bufera sāļu šķīdināšanas, pH iestādīšanas vai nejonisku piedevu pievienošanas.

Sajaucot ūdeni ar metanolu (zināmā mērā arī citus ūdenī šķīstošus šķīdinātājus), notiek tilpuma kontrakcija; maisījuma tilpums ir mazāks par atsevišķo tilpumu summu. Tāpēc šķīdinātāju tilpums jāmēra pirms to sajaukšanas.

Ja eluentu nelieto tieši no oriģinālā trauka, to nepieciešams filtrēt caur 0,5 vai 0,8  $\mu\text{m}$  filtru tieši pirms lietošanas, jo vienmēr ir iespējama cietvielas daļiņu klātbūtne, kas var apdraudēt sūkņa vārstu darbību, bloķēt kapilārus un filtrus vai aizdambēt kolonnu. Jāievēro, ka filtra materiālam ir jābūt inertam attiecībā pret eluentu.

Eluenti, ko lieto AEŠH, ir jādegazē, īpaši polārie, kuros izšķīst ievērojams daudzums gaisa (ūdens, buferšķīdumi, visi  $\text{H}_2\text{O}$  saturošie maisījumi vai ūdenī šķīstošie organiskie šķīdinātāji). Pretējā gadījumā gaisa burbuli izdalīsies detektorā, kur pretspiediens ir zems, veidojot augstu nulles līnijas trokšņa līmeni un/vai neīstās joslas. Rezultātā samazināsies analītiskā pareizība – joslas kļūs mazākas, jo izšķīdušais skābeklis absorbē pie zemām UV viļņu garuma vērtībām un izsauc fluorescenci. Īpaši jutīga pret to ir eluācija gradientā, jo gāzes izdalās, sajaucot gaisu saturošus šķīdinātājus.

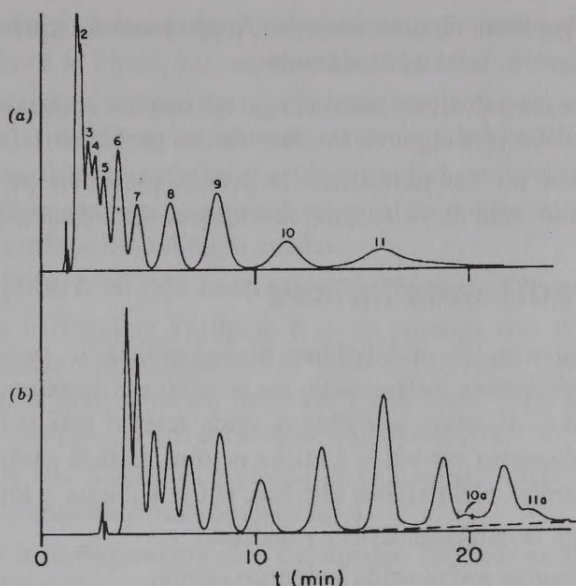
Kustīgo fāzi var degazēt ārpus hromatogrāfa (“*off-line*” režīmā), ievietojot kolbu ar kustīgo fāzi ultraskaņas vannā un turot to vakuumā 1 minūti. Degazācija būs spēkā vairākas stundas un būs pietiekama, ja prasības analītiskajai precizitātei ir zemas. “*On-line*” degazācija ir piemērotāka (un dārgāka), gan nepārtraukti laižot cauri hēliju (*He* daudz mazāk šķīst par citām gāzēm), gan lietojot degazācijas moduļus.

Šādās iekārtās kustīgā fāze izplūst cauri membrānai, kas ļauj gāzēm pāriet apkārtējā vakuumā. Taču iekārtām ir visai liels iekšējais tilpums, kas ir trūkums, ja eluents ir jānomaina.

Šķīdinātājus un eluentus nedrīkst uzglabāt plastmasas traukos, jo plastifikatori un citi mazmolekulāri savienojumi difundē šķīdumos. Eluenta rezervuāram vienmēr ir jābūt ciet neatkarīgi no tā, kādi šķīdinātāji tiek lietoti.

## 12.4.3. Gradienta sistēmas

Kustīgās fāzes sastāvu var būt nepieciešams mainīt vielu pārvietošanās laikā kolonnā, ja paraugā ir komponenti ar īpašību atšķirībām plašā diapazonā (ārpus intervāla  $1 < k' < 10$ ). Sastāva maiņai ir jānosaka kustīgās fāzes stipruma pieaugums, lai panāktu to joslu izdalīšanos, kuras citādi izdalītos pārāk vēlu vai pat neizdalītos nemaz.

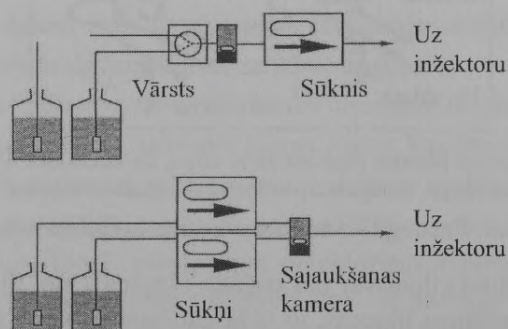


Analīzes laikā mainot kustīgās fāzes sastāvu, var noteikt lielāku komponentu skaitu. Gradiēta apstākļos iegūtās hromatogrammās joslām ir līdzīgi platumi.

**12.4 att. Joslu izvietojums hromatogrammā, kas iegūta ar kustīgās fāzes izokrātisku sastāvu (augšā) un gradiētā (apakšā)**

Gradiēta sistēmas iedala divās grupās – zemspiediena un augstspiediena, atkarībā no komponentu sajaukšanas pirms vai pēc augstspiediena sūkņa.

*Zemspiediena gradiēta sistēma* sastāv no diviem vai vairākiem rezervuāriem, kas savienoti ar programmējamu daudzkanālu iesūkšanas vārstu un sajaukšanas kameru (tilpums <1 mL) ar magnētisko maisītāju. Rezervuāros atrodas šķīdinātāji ar dažādu eluējošo spēku. Vārsta kanālu atvēršanās pakāpes mainās laika gaitā, nodrošinot kamerā mainīgu sastāvu sajaukšanos. Sūknis sajaukto eluentu nogādā inžektorā un kolonnā. Šādā konstrukcijā šķīdinātāji sajaucas sūkņa zemspiediena pusē. Tādas iekārtas ir samērā lētas, lai arī vārsta darbība jākontrolē ļoti precīzi, ko veic procesors.



**12.5. att. Iekārtu uzbūve zemspiediena (augšā) un augstspiediena (apakšā) kustīgās fāzes gradiēta iegūšanai**

*Augstspiediena gradiēta sistēmām* ir nepieciešami 2–3 augstspiediena sūkņi dažādu šķīdinātāju piegādei (tiem ir jā sajaucas). Analīzes sākumā vājākā eluenta sūknis piegādā lielāko daļu šķīdinātāja (ja ne visu), bet stiprākā eluenta sūknis – mazāko daļu (vai pat neko). Katra sūkņa ātrums mainās lineāri vai eksponenciāli vai nu nepārtraukti, vai soļveidīgi. Elektroniskai kontrolei ir jānodrošina, ka kopējais eluenta tilpums paliek nemainīgs. Iekārtā šķīdinātāji sajaucas sūkņa augstspiediena daļā, no kā radies arī metodes nosaukums. Tā kā katram šķīdinātājam vajadzīgs savs sūknis, iekārta ir dārga. AEŠH sistēmas tilpums no punkta, kur šķīdinātāji sajaucas, līdz ieejai kolonnā (“*dwell volume*”) ir mazs. Zemspiediena sistēmā to veido zemspiediena vārsta, sajaukšanās kameras, sūkņa galvas,

inžektora un savienojošo kapilāru tilpumu summa. Augstspiediena sistēmā tas ir mazāks, jo tajā ietilpst tikai sajaukšanas kamera, inžektors un kapilāri.

Ja grādienta sistēma nav pieejama, iesūkšanas līniju var ievietot secīgi dažādu eluentu rezervuāros, iegūstot soļa gradientu (sevišķu vērību pievēršot degazācijas problēmai).

Pastāv arī iespēja vienu no komponentiem (stiprāko) pievienot pa pilienam vājākajam, tos nepārtraukti samaisot. Sūknim esot darba režīmā, izveidosies nepārtraukts gradients.

## 12.5. Parauga ievadīšanas ierīces

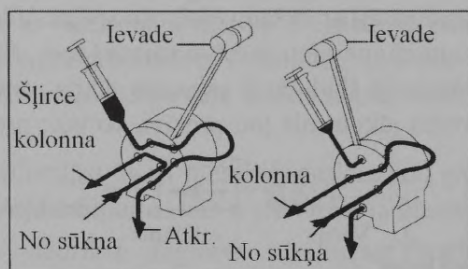
Svarīgs faktors iekārtu augstas efektivitātes nodrošināšanā ir pareizai parauga ievadīšanai kolonnā. Paraugs ir jāievada šauras joslas veidā, un ievadīšanas ietekmei uz joslas paplašināšanos ir jābūt pēc iespējas mazākai. Parauga ievadīšanas veids relatīvi īsās (<15 cm) kolonnās ar mazu (<10 μm) sorbenta daļiņu diametru var būt ar kritisku nozīmi, jo tādā gadījumā joslas ir īpaši šauras. Nepareiza ievadīšana var izraisīt efektivitātes kritumu, pat ja kolonna ir ļoti kvalitatīva.

Ideālā gadījumā parauga ievadīšanas ierīcei vajadzētu:

- 1) ievadīt paraugu šauras joslas veidā kolonnas centrā;
- 2) būt vienkārši un ērti lietojamai, nepieļaut gaisa iekļūšanu sistēmā;
- 3) nodrošināt atkārtojamību;
- 4) darboties pie augsta spiediena.

Reizēm var būt nepieciešamība pēc apsildāmas ierīces, lai nodrošinātu vajadzīgo parauga šķīdību (nesazarotie poliolefīni, kurus analizē ar gelhromatogrāfiju).

Biežāk lietotā ievadīšanas ierīce ir 6 ceļu krāns (*Valco, Rheodyne*), kas ļauj ievadīt paraugu ar labu atkārtojamību zem augsta spiediena esošā kolonnā, gandrīz nepārtraucot plūsmu (arī paaugstinātā temperatūrā).



Darbību nodrošina divi stāvokļi – vienā paraugs piepilda ārējo cilpu, tai atrodoties no plūsmas atslēgtā stāvoklī, otrā – cilpu pieslēdz kustīgās fāzes plūsmas līnijai. Pāreju starp abiem stāvokļiem nodrošina vai nu pašrocīgi, vai mehāniski.

### 12.6. att. Parauga ievadīšanas krāna darbības princips

Atkarībā no darba uzdevuma cilpai var būt dažāds tilpums – no 20 mikrolitriem līdz vairākiem mililitriem, ja jāievada liels parauga tilpums, jo tādā gadījumā novērs joslā paplašināšanās efektus.

Cilpu izmanto divos veidos.

1. *Pilnā uzpilde.* Cilpu uzpildot, paraugs neizgrūž tur esošo šķīdinātāju kā korķis, bet gan sajaucas ar to. Tāpēc cilpā jāievada piekārtīgs parauga pārākums (100 μL cilpā ar tilpumu 20 μL). Tad tur atradīsies mazāk par 1% atlikušā šķīdinātāja, ko pieļauj kvantitatīvā analīzē ar ārējā standarta izmantošanu.
2. *Daļējā uzpilde.* To lieto, ja ir svarīgi paraugu nezaudēt. Parauga tilpums nepārsniedz ½ no cilpas tilpuma.

Maziem parauga daudzumiem, kas nepieciešami kolonnām ar sorbenta daļiņu izmēru 3 μm, lieto īpašus krānus ar cilpu tilpumu 0,5–5 μL. Neliels iekārtu trūkums ir, ka dažāda tilpuma paraugu

ievadīšanai ir jānomaina cilpa. Iekārtas ļauj ātri, atkārtojami un no operatora neatkarīgi ievadīt paraugu pat 500 bar spiedienā ar kļūdu, kas nepārsniedz 2%.

Dažas vadlīnijas par parauga šķīdinātāja un tilpuma izvēli. Parauga sagatavošana ir nozīmīga analītiskā darba sastāvdaļa, strādājot ar klīniskiem vai apkārtējās vides paraugiem. Galvenās izmantotās metodes parauga šķīduma attīrīšanai ir filtrēšana (arī cauri membrānai, kas selektīvi aiztur savienojumus) un cietās fāzes ekstrakcija ar atbilstošas selektivitātes kolonniņām (*cartridge*). Īpašs gadījums ir parauga sagatavošana biopolimēru analīzei.

#### Parauga šķīdums ir jāfiltrē, lai tajā neatrastos cietvielas.

Ja iespējams, paraugs ir jāšķīdina kustīgajā fāzē. Ja paraugs tajā slikti šķīst, var rasties joslu asimetrija vai notikt kolonnas aizdambēšanās. Ja laiku noteikšanai izmanto laušanas koeficientu maiņu, parauga šķīdinātājam jābūt vājākam nekā kustīgajai fāzei. Taču ķīmiskajam sastāvam jābūt cik vien iespējams tuvam (pentāns, ja k.f. ir heksāns, vai ūdens, ja k.f. ir metanola šķīdums).

Kolonnas šķīvju skaits būs lielāks, ja paraugu ievadīs daudz **vājākā** šķīdinātājā nekā kustīgā fāze – parauga komponenti koncentrēsies kolonnas ieejā.

Ja parauga šķīdinātājs ir ievērojami stiprāks par kustīgo fāzi, var notikt joslu paplašināšanās vai divvainas formas joslu veidošanās.

## 12.6. Detektoru

Detektoram jābūt spējīgam noteikt mirkli, kad vielas josla ir izdalījusies no kolonnas.

Detektors nepārtraukti mēra kustīgās fāzes sastāva maiņu (veic tās monitoringu), noteiktā veidā pārvēršot to elektriskajā signālā, kurš, nonākot pašrakstītājā vai datora displejā, parāda novirzi no nulles līnijas.

Ideālam detektoram vajadzētu:

- būt vienādā mērā jutīgam pret visām izdalītajām vielām vai uztvert tikai interesējošās vielas;
- būt tādām, kura darbību neietekmē temperatūras izmaiņas vai kustīgās fāzes plūsmas un sastāva maiņa (kā tas notiek, piemēram, atdalot vielas kustīgās fāzes sastāva gradientā);
- spēt reaģēt uz niecīgiem vielu daudzumiem (mikropiemaisījumu vai zīmju analīze);
- būt ar plašu koncentrācijas/signāla linearitātes apgabalu;
- nerādīt joslu paplašināšanos, tāpēc tā kivetes tilpumam ir jābūt mazam;
- ātri reaģēt uz vielu klātbūtni, uztverot šauras joslas, kas ātri šķērso kivetu;
- būt vienkārši darbināmam un apkalpojamam, drošam un lētam.

Visām prasībām atbilstošu AEŠH detektoru nav. AEŠH nav līdzinieka GH katarometram vai liesmas jonizācijas detektoram. Tomēr pieejamiem detektoriem ir pietiekami plašs pielietojums, un metodes lietošanu parasti neierobežo detektora problēma. Ja parauga komponenti ir ar atšķirīgām fizikālajām īpašībām, mēdz lietot vairākus virknē saslēgtus detektorus, nodrošinot katra komponenta noteikšanu.

### 12.6.1. Detektoru iedalījums

1. Detektoru, kas ir *jūtīgi pret vielas koncentrācijas maiņu* veido signālu  $S$ , kas ir proporcionāls parauga koncentrācijai  $c$  eluātā.

$$S \sim c \left( \frac{g}{mL} \right)$$

2. *Masas jutīgie (mass sensitivity)* detektoru rada signālu, kas ir proporcionāls masas plūsmai, proti, parauga molekulu vai jonu skaitam laika vienībā.

$$S \sim \frac{n}{\Delta t} \left( \frac{g}{s} \right)$$

Vairums lietoto detektoru ir jutīgi pret koncentrācijas maiņu, izņemot masas jutīgo elektroķīmisko, gaismas izkliedes, fotovadītspējas un transporta detektorus.

Detektorus raksturo to selektivitāte. Neselektīvie detektori mēra kādu kopēju šķīduma īpašību, kas izplūst tiem cauri. Tā refraktometriskais detektors mēra eluāta laušanas koeficientu.

Tīrai kustīgai fāzei ir noteikts laušanas koeficients, kura vērtība izmainās, no kolonnas izdaloties analizējamai vielai. Detektors ir jutīgs pret šādām maiņām un ļauj noteikt jebkuru vielu – tāpēc tas ir neselektīvs vai vispārējas īpašības (*bulky property*) detektors. Tas ir iemesls, kāpēc refraktometrs un vadītspējas detektors nav piemērots kustīgās fāzes gradienta apstākļiem.

Savukārt UV detektors ļauj identificēt tikai tos savienojumus, kuri kaut nedaudz absorbē UV starus izvēlētajā viļņu garumā. Tāpēc šāds detektors ir selektīvs.

**Detektora troksni** definē kā maksimālo nulles līnijas amplitūdu, kas sastāv no augstfrekvences fona un patvaļīgām nulles līnijas fluktuācijām (svārstībām), kuras rada iekārtas elektronika, temperatūras svārstības, sprieguma maiņa tīklā vai citi efekti, kas neattiecas uz analizējamo vielu.

Palielinot detektora signāla pastiprinājumu, var pārlicināties, ka nulles līnija nav gluda, pat ja viela no kolonnas neizdalās. Augstfrekvences troksni var izsaukt nepareizs detektora iezemējums un/ vai pastiprinātāja elektronika.

Detektora troksnis rada grūtības mazu hromatogrāfisko joslu noteikšanā. To parasti izsaka kā patvaļīgas nulles līnijas svārstības detektora signāla vienībās (piemēram, absorbcijas vienībās UV detektoram).

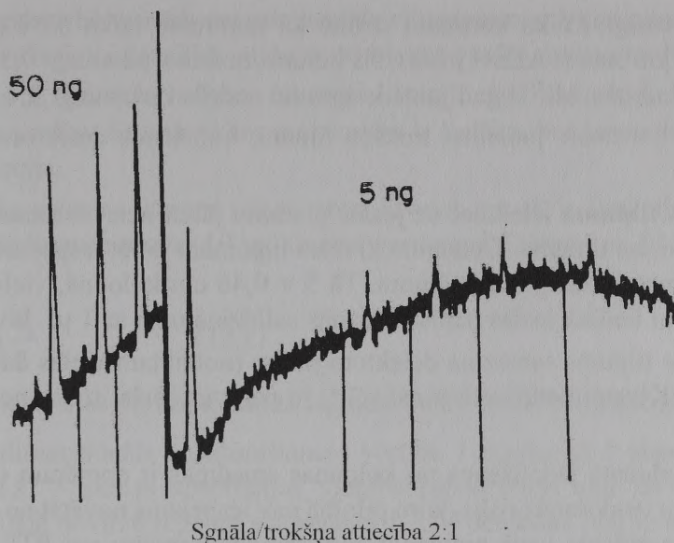
**Detektora dreifs** ir augšup vai lejup ejoša nulles līnija. Dreifu definē kā nulles līnijas novirzi, kas parasti ir mērāma stundās un ir normāla parādība pēc detektora ieslēgšanas. Taču elektronikai un lampām sasniedzot darba temperatūru, nulles līnijai ir jāstabilizējas, ja vien:

- nenotiek eluācija gradientā, kurā mainās kustīgās fāzes laušanas koeficients, ko var fiksēt UV detektors;
- pēc eluenta nomaiņas jaunā kustīgā fāze nav pilnībā aizstājusi veco;
- nenotiek nepārtraukta kustīgās fāzes sastāva maiņa, ko rada iztvaikošana vai pārāk intensīva degazācija ar He;
- notiek temperatūras maiņa.

Dreifs ir mazs salīdzinājumā ar troksni.

Detektora troksni (fonu) un dreifu rada sistēmas kopējais stāvoklis – piemaisījumi kustīgajā fāzē, temperatūras maiņa u. c., nevis detektora darbība kā tāda.

Detektora jutība AEŠH parasti ir tāda, ka var noteikt 10 un mazāk nanogramus. To definē kā vielas masu vai koncentrāciju, kas, nokļūstot detektorā, laika vienībā sniedz signāla/troksņa attiecību  $(S/N) = 2$ . Tā ir minimālā nosakāmā koncentrācija. Kvalitatīvai analīzei iesaka  $S/N$  attiecību ne mazāku par 3–5, kvantitatīvai – ap 10.

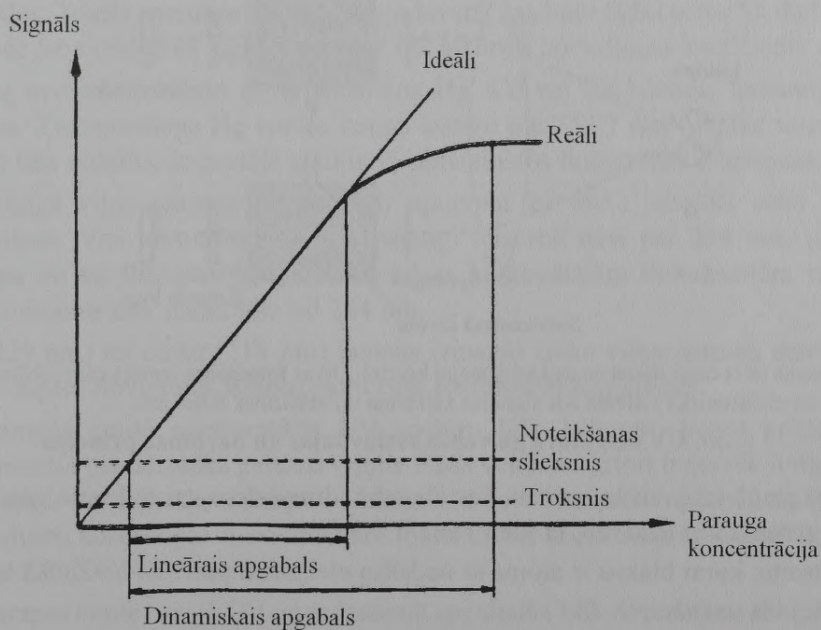


Paraugs – ditions (pesticīds). Nekustīgā fāze – Perisorb A, kustīgā – heptāns/etilacetāts (95:5); UV detektors, 254 nm.

12.7. att. Mazākais nosakāmais signāls (jutība)

**Detektora linearitātes diapazons.** Ideālam detektoram būtu jārada signāls, kuram atbilstošais joslu laukums būtu proporcionāls ievadītā parauga lielumam, neatkarīgi no tā lieluma. Tomēr linearitātes diapazons nevar būt bezgalīgs, lai arī tam jābūt iespējami plašam. Koncentrācijas detektora signālam, kuru lieto kvantitatīvajā analīzē, jābūt lineāri atkarīgam no nosakāmā komponenta koncentrācijas (g/mL), bet masas jutīgiem detektoriem – no masas maiņas laikā (g/s).

Detektoram ir jābūt ar plašu ( $10^4$ ) lineāro apgabalu, lai pārākumā esošus komponentus un mikro piemaisījumus varētu noteikt vienlaicīgi. UV detektoru diapazons ir augstāks nekā refraktometriem. Diapazons 1:10000 nozīmē, ka augšējā robeža  $5 \times 10^{-4}$  g/L zemākajai ap  $5 \times 10^{-8}$  g/L.



12.8. att. Detektora raksturlielumi – lineārais apgabals, dinamiskais apgabals, troksnis un jutība

**Laika konstante.** Atdalītās joslas pēc izdalīšanās no kolonnas var izskatīties daudz platākas un zemākas nekā īstenībā, ja detektora reakcija uz koncentrācijas maiņu ir lēna. Laika konstante  $\tau$  norāda, cik ātri detektors rada joslai atbilstošo signālu. Ja detektors darbojas kopā ar datu uztveres

sistēmu, tas ir īpaši svarīgi. Laika konstanti definē kā minimālo laiku 63% pilnas skalas vērtības sasniegšanai. Nosakot ļoti šauras AEŠH joslas, šis lielums nedrīkst pārsniegt 0,3 s. Tādu joslu tilpums var nepārsniegt 100  $\mu\text{L}$ . Ātrās AEŠH gadījumā konstante nedrīkst pārsniegt 0,1 s.

Pārāk maza laika konstante palielina trokšņa līmeni. Labākajos detektoros laika konstanti var mainīt.

**Detektora kivetes tilpuma** ietekmei uz joslas platumu jābūt neievērojamai – mazākai par 10% no šaurākās (pirmās) joslas tilpuma. Detektora kivetes tilpumam jābūt iespējami mazam, lai neradītu ārpus kolonnas izcelsmes joslas paplašinājumu. Tā  $5 \times 0,46$  cm kolonnā, vielai, kuras  $k' > 3,8$   $\mu\text{L}$ , kivetē notiek ievērojami lielāka joslas paplašināšanās salīdzinājumā ar 1  $\mu\text{L}$  kiveti.

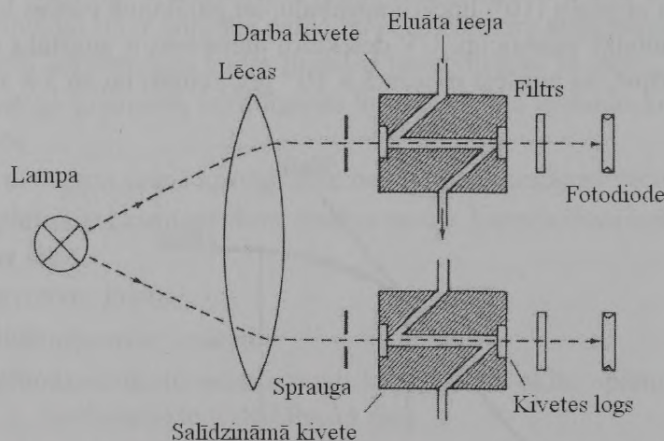
Pārāk mazs kivetes tilpums samazina detektora jutību (noteiktam vielas daudzumam ir jābūt, lai vispār rastos signāls). Kivetei nedrīkst būt asi stūri, jo parauga joslai ir momentā jāizskalojas ar tai sekojošo eluentu.

Detektorā līdz ar eluenta izdalīšanos no kolonnas spiediens ir apmēram tāds pats kā kolonnas izejā, un pastāv burbuļu veidošanās risks, kuru pilnībā nav iespējams novērst ne ar kādiem līdzekļiem. Tāpēc iesaka detektora eluenta izejā pievienot garu tērauda kapilāru vai PTFE kapilāru, lai kivete vienmēr atrastos nelielā (1–2 bar) pārspiedienā (tāpat rīkojas ar detektoriem, kurus saslēdz virknē).

*Piezīme:* ja kustīgajai fāzei pievieno mazu daudzumu daudz polārākas vielas (1% metanola heksānā), tā plānā kārtiņā var pārklāt kivetes logus. Vēlāk, analizējot relatīvi polārākas vielas, pārklājums tiks noskalots, veidojot neīstās joslas.

## 12.6.2. UV detektori

UV detektori ir plašāk lietotais detektoru tips, jo tie ir pietiekami jutīgi, ar plašu linearitātes diapazonu, relatīvi nejutīgi pret temperatūras svārstībām un izmantojami gradienta apstākļos.



Lampas izstarotā gaisma iziet cauri darba un salīdzināmajai kivetei. Divas fotodiodes izmēra cauri abām kivetēm izgājušās gaismas intensitāti, un elektroniskā sistēma šos signālus salīdzina un atšķirības līdzsvaro.

### 12.9. att. UV detektora galvenās sastāvdaļas un darbības princips

UV detektors reaģē uz savienojumiem, kas absorbē ultravioleto vai redzamo gaismu. Absorbēcija notiek pie viļņa garuma virs 200 nm, ja vien vielā ir vismaz:

- dubultsaite, kurai blakus ir atoms ar nedalītu elektronu pāri ( $X=Y-Z$ ), kā tas ir vinilēterī;
- broms, jods vai sērs;
- karbonilgrupa  $C=O$  vai nitrogrupa  $NO_2$ ;
- divas konjugētas dubultsaites ( $X=X-X=X$ );
- aromātiskais gredzens;
- arī neorganiskie joni:  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ .

Minētās grupas neabsorbē vienādi vai pie vienāda viļņa garuma. Viļņa garumu, kurā absorbcija ir maksimāla, kā arī absorbcijas intensitāti ietekmē arī blakus esošās grupas molekulā.

Molārā absorbcija  $\epsilon$ , kas ir atrodama rokasgrāmatās, lielam savienojumu skaitam ir gaismas absorbcijas intensitātes mērs. Aromātiskām molekulām ir lielāka, bet ketoniem (C=O) – salīdzinoši mazāka molārā absorbcija.

Absorbcija notiek, gaismas staram izejot cauri kivetei, un tā ir funkcija no parauga molārās absorbcijas, tā molārās koncentrācijas  $[i]$  un kivetes garuma  $d$ . Lielumu  $\epsilon$ ,  $[i]$  un  $d$  reizinājumu sauc par absorbanci,  $A$ :

$$A = \epsilon \times [i] \times d = \lg \frac{I_0}{I} \quad (12.1)$$

( $I$  un  $I_0$  ir gaismas intensitātes vērtības, kad tā izgājusi cauri kivetei ar paraugu un bez tā).

Lielums  $A$  ir bezdimensionāls un absorbances vērtību 1 izsaka kā 1 absorbcijas vienību (AU). Apzīmējums “1 a.u.f.s” – skalas absorbcijas vienība (*absorption unit full scale*) – nozīmē, ka pašrakstītājs maksimālajā novirzē reģistrē absorbanci 1. UV detektors ļauj izmērīt eluāta absorbanci. Tāpēc **kustīgai fāzei jābūt optiski caurlaidīgai pie detektora lampas viļņa garuma**, proti, tās absorbancei ir jābūt nullei, vai vismaz jāvar elektroniski ieregulēt nulli. Tādā gadījumā paša detektora signāls ir nulle un integrators reģistrē nulles līniju. Atbilstoši Bēra likumam joslas augstums ir funkcija no molārās absorbcijas un vielas koncentrācijas, kas šķērso detektora kivetē.

**Ja ievadīto savienojumu koncentrācijas ir vienādas, lielākas joslas veido tie, kuru molārā absorbcija  $\epsilon$  ir lielāka salīdzinājumā ar vielām, kuru  $\epsilon$  ir mazāka.**

Tā kā signāla amplitūda ir funkcija no gaismas ceļa, kivetes garumam  $d$  UV detektorā ir jābūt cik vien iespējams garam. Parastākais garums ir 10 mm – vienlaicīgi kivetē jābūt pietiekami šaurai, lai tās tilpums būtu mazs.

Salīdzināmajā kivetē parasti šķīdinātāja nav, lai gan mēdz būt ar šķīdumu piepildīti detektori. Tā mēdz būt gadījumos, kad kustīgajai fāzei piemīt specifiska absorbcija vai tās laušanas koeficients mainās gradienta apstākļos. Tomēr izmaiņas salīdzināmajā kivetē, kas būtu tādas pašas kā darba kivetē, realizēt ir sarežģīti. Tāpēc laba detektora signāls nedrīkst būt atkarīgs no laušanas koeficienta maiņas.

Par gaismas avotiem izmanto zema spiediena Hg, Cd vai Zn lampas. Izmanto arī deitērija un volframa lampas. Zemspiediena Hg tvaiku lampa izstaro pie 253,7 nm. Vājāks starojums pie citiem viļņa garumiem tiek atdalīts, jo pretējā gadījumā samazinātos linearitātes diapazons.

Šāds nemainīgā viļņa garuma detektors ir aptuveni 20 reižu jutīgāks nekā tāds, kura viļņa garums ir maināms. Visi aromātiskas dabas paraugi absorbē tieši pie 254 nm; pat savienojumus ar karbonilgrupu un tai līdzīgām grupām, kā arī ar konjugētajām dubultsaitēm var noteikt, ja to absorbcijas maksimums nav pārāk tālu no 254 nm.

Kadmija (229 nm) un cinka (214 nm) lampas izmanto īsāka viļņa garuma starojuma iegūšanai. Garākus viļņus iegūst, novietojot lampas stara ceļā fosforescējošus slāņus.

Deitērija lampas emitē nepārtrauktu UV spektru līdz 340 nm, ļaujot konkrētas problēmas atrisināšanai izmantot piemērotākā garuma viļņus. Šāda veida detektori ir mazāk jutīgi par nemaināmā  $\lambda$  analogiem (tiem ir arī augstāks trokšņa līmenis), taču šo trūkumu kompensē iespēja piemērot viļņa garumu savienojumu absorbcijas maksimumam. Šāda izvēle ļauj izslēgt traucējošās joslas, uzlabojot integrēšanas pareizību vai selektivitāti.

Volframa lampas emitē tuvajā UV un redzamajā apgabalā (340–850 nm) un ir ideāls papildinājums deitērija lampām.

Spektrālo joslu platumam šajās iekārtās nav jābūt tik šauram, kā tas ir spektrofotometros. Parastā vērtība ir ap 10 nm (filtrētā gaisma nav monohromatiska, bet ir diapazonā no 280–290 nm, ja izvēlētais viļņa garums ir 285 nm). Tas ļauj iegūt lielākas intensitātes gaismu, kas palielina detektora jutību.

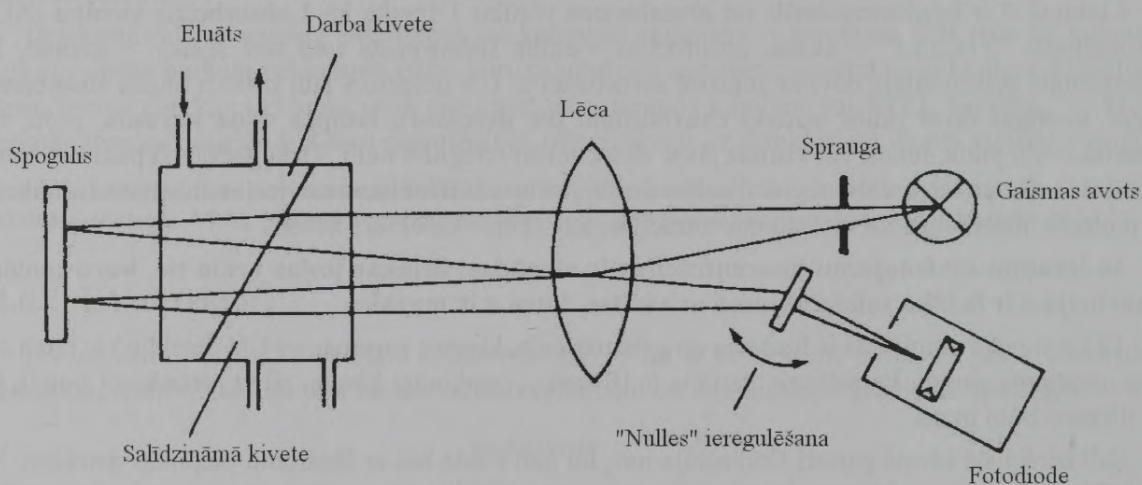
Spektrālo joslu platumam nav jābūt pārāk lielam, jo tad samazinās linearitātes diapazons.

### 12.6.3. Laušanas koeficienta detektori (refraktometri)

Laušanas koeficienta (RI) detektori ir neselektīvi un parasti tiek lietoti kā papildinājums UV modeļiem. Tie spēj uztvert visas eluēto vielu joslas, kuru laušanas koeficienti atšķiras no tīras kustīgās fāzes laušanas koeficientiem. Jo vairāk atšķiras laušanas koeficientu vērtības viēlai un kustīgajai fāzei, jo lielāka ir signāla intensitāte. Kritiskos gadījumos detektēšanas līmeni var paaugstināt ar piemērota eluenta izvēli.

Refraktometri ir par trīs kārtām (1000 reižu) mazāk jutīgi nekā UV (to jutības sliekšnis ir ap  $5 \times 10^{-7}$  g parauga 1 mL kustīgās fāzes, salīdzinājumā ar UV detektora  $5 \times 10^{-10} \frac{\text{g}}{\text{mL}}$ ).

Tā kā šķidrumu laušanas koeficienti ir atkarīgi no temperatūras (ap  $5 \times 10^{-4}$  vienības uz  $^{\circ}\text{C}$ ), detektora kivei ir jābūt ar termostatēšanas kontroli, īpaši, ja plūsmas ātrums pārsniedz 1 mL/min.



Kive ir sadalīta divās daļās ar atdalošo sieniņu. Vienā daļā atrodas salīdzināšanas šķidrums, bet eluents izplūst cauri otrai. Gaismas stara novirzīšanās notiek, ja laušanas koeficienta vērtības atšķiras abās kivetēs, proti, kad vienai izplūst cauri eluents ar paraugu.

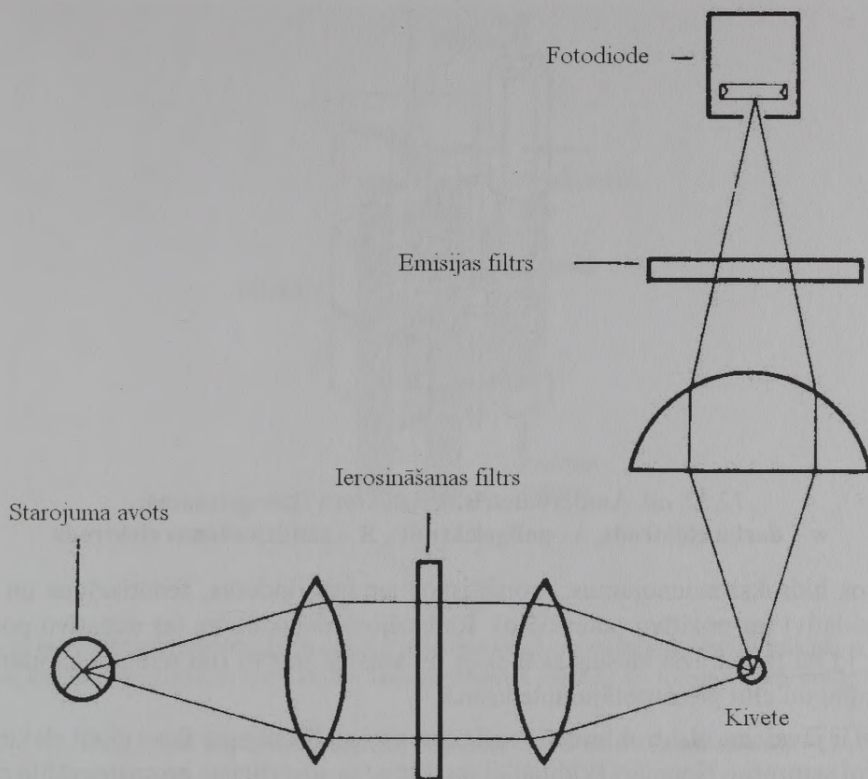
#### 12.10. att. Stara novirzes refraktometrs

Stars iziet cauri spraugai, divreiz cauri lēcai (turp un atpakaļ) un divreiz cauri dubultai kivei. Kustīgajai fāzei atrodies mērkivetē, kustināma nulles lēca tiek iestādīta stāvoklī, kas gaismas staram cauri spraugai ļauj krist uz fotodiodi.

Jebkuras izmaiņas laušanas koeficienta vērtībā novirza gaismas staru tā, ka tas nevar iziet cauri spraugai. Tad mainās fotodiodes pretestība, un atbilstošā tilta strāva maina spriegumu un veido signālu.

### 12.6.4. Fluorescences detektori

Savienojumus, kuri paši fluorescē vai kurus var pārvērst fluorescējošos atvasinājumos, iespējams noteikt ar ļoti jutīgajiem un specifiskajiem fluorescences detektoriem. Tajos mēra enerģiju, ko emitē vielas, kas ierosinātas UV starojuma iedarbībā. Fluorescē savienojumi, kuros ir simetrisks konjugēto dubultsaišu izvietojums, ja vien to daba nav joniska. Fluorescences detektoru jutība ir 1000 reižu augstāka ( $10^{-13} \frac{\text{g}}{\text{mL}}$ ) nekā UV detektoriem.



Atbilstošā viļņa garuma starojums iziet cauri kivetē, un emitētais garāka viļņa starojums tiek noteikts pareizā leņķa virzienā. Gaismas intensitāte un tai atbilstošā jutība palielinās, lietojot samērā lielas kivetes (ap 20  $\mu\text{L}$  vai lielākas).

12.11. att. Fluorometrs

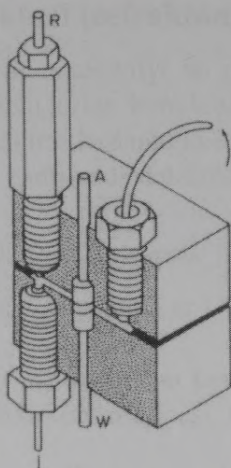
Attēlā redzamā sistēma ir ar nemainīgu ierosinošo viļņa garumu, kura joslas platumam nav jābūt īpaši šauram, kā arī nemainīgu viļņu garuma diapazonu fluorescences starojuma noteikšanai.

Dārgākos modeļos ierosināšanas viļņa garumu var mainīt. Komplicētākās ierīces ir apgādātas ar monohromatoru ierosināšanas un fluorescences starojumam, ļaujot sasniegt ļoti specifisku (bet mazāk jutīgu) detektēšanas līmeni.

Detektora darbībai traucē skābeklis kustīgajā fāzē, jo tas "izdzēš" fluorescenci. Lineārais apgabals ir atkarīgs no sistēmas (parauga, šķīdinātāja, tā piemaisījumiem) un var būt samērā šaurs.

### 12.6.5. Elektroķīmiskie (amperometriskie) detektori

Elektroķīmija sniedz veidu, kā ar augstu selektivitāti noteikt viegli oksidējamu vai reducējamu organisko savienojumu mikroaudzumu. Nosakāmā koncentrācija var būt ārkārtīgi zema, un detektori ir vienkārši un lēti. Detektora šūnā, kurā notiek elektroķīmiskā reakcija, atrodas trīs elektrodi. Potenciālu starp salīdzinājamo un darba elektrodu var izvēlēties. Strāvu, ko rada elektroķīmiskā reakcija, nosaka palīgelektrods, tā, ka tas neietekmē darba elektroda potenciālu. Darba elektrodus izgatavo no grafiņa, grafiņa pastas vai amalgamēta zelta.



12.12. att. Amperometriskā detektora šķērsgriezums:  
w – darba elektrods, A – palīgelektrods, R – salīdzināšanas elektrods

Aromātiskos hidroksisavienojumus, aromātiskos amīnus, indolus, fenotiazīnus un merkaptānus var noteikt oksidatīvi (ar pozitīvo potenciālu). Reducējošā detektēšana (ar negatīvo potenciālu) tiek izmantota reti, jo tai traucē izšķīdušais skābeklis un smagie metāli (no tērauda kapilāriem). Metodi lieto nitrozoamīnu un citu piesārņotāju noteikšanā.

Šūnas videi ir jāveicina elektroķīmiskās reakcijas norise. Kustīgajai fāzei jābūt elektrovadošai, bet ne obligāti ūdeni saturošai. Nepolāri šķīdinātāji un līdz ar to adsorbcijas hromatogrāfija nav piemērota elektroķīmiskai detektēšanai. Kustīgā fāze nedrīkst saturēt hlorīdus vai hidroksikarbonskābes.

Elektroķīmiskais iznākums nav augstāks par 1–10%, tāpēc lielākā daļa parauga atstāj šūnu neuzlādēta. Kulonometriskajā detektēšanā konversijas līmenis ir 100%, bet tās jutība nav augstāka kā amperometriskajai detektēšanai.

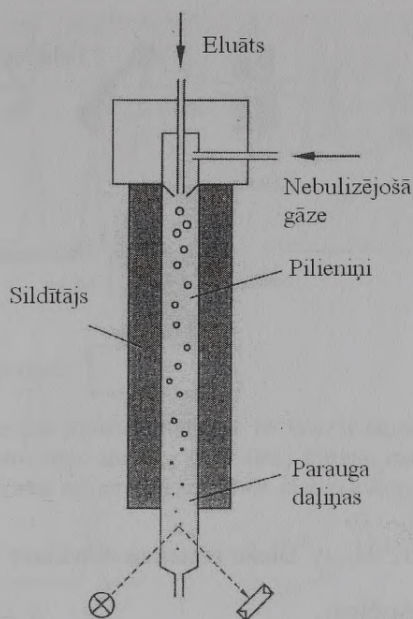
### 12.6.6. Gaismas izkliedes detektoru

Gaismas izkliedes detektors ar eluenta iztvaicēšanu ir iekārta neselektīvai negaistošu vielu analīzei.

Detektora darbības princips norāda, ka kustīgajai fāzei ir jābūt gaistošai – piemēroti ir zemā temperatūrā virstoši organiskie šķīdinātāji, kas ļauj iekārtai strādāt pie lieliem plūsmas ātrumiem (līdz 2 ml/min). Var lietot arī ūdeni, tikai tad plūsma nedrīkst pārsniegt 1 mL/min. Piedevām un buferšķīdumiem, ja tos vispār izmanto, jābūt gaistošiem un ar mazu koncentrāciju.

Gaistošus buferšķīdumus var iegūt no etiķskābes, skudrskābes, trifluoretiķskābes, amonija acetāta, amonija hidroksīda un trietilamīna; visiem šiem savienojumiem ir jābūt tīriem. Par nebulizējošo gāzi parasti lieto slāpekli.

Detektora signāla lielums ir funkcija no analizējamās vielas mola masas, nevis no sastāva vai funkcionālo grupu klātbūtnes. Savienojumi ar tuvām mola masām, rada līdzīgas intensitātes signālus, ja vien ievadītā koncentrācija ir vienāda.



Kolonnas eluātu ar inertās gāzes palīdzību izkļiedē sīku pilieniņu veidā (nebulizē). Šķidruma pilieniņus iztvaicē, iegūstot cietvielas daļiņas, kas iziet cauri lāzera staru kūlim. Daļiņas izkļiedē gaismu, un fotodiode reģistrē gaismas intensitātes pazeminājumu.

12.13. att. Gaismas izkļiedes detektors ar eluenta iztvaicēšanu

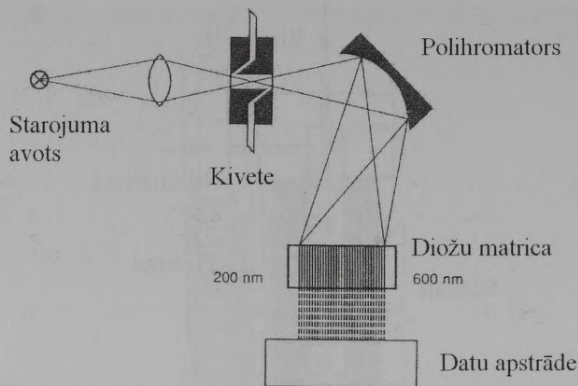
Nulles līniju neietekmē ne kustīgās fāzes UV absorbcija, ne laušanas koeficientu vērtību maiņa, mainoties tās sastāvam, tāpēc gaismas izkļiedes detektors ir ideāli piemērots analīzei gradienta apstākļos. Tā lineārais apgabals ir ievērojami mazāks par dinamisko. Parasti noteikšanas sliekšnis ir ap 5 ng.

## 12.7. AEŠH kombinācija ar spektrometrijas metodēm

AEŠH ir mēģināts savienot ar daudzām analītiskām metodēm, bet vislabākie rezultāti ir iegūti savienojumā ar kādu no spektrometrijas veidiem.

Hromatogrāfija un spektrometrija ir ortogonālas metodes – ar to palīdzību iegūtā informācija ir principiāli dažāda. Hromatogrāfija ir vielu atdalīšanas metode, savukārt spektrometrija ļauj iegūt molekulu “pirkstu nospiedumus”. Svarīgākās kombinācijas ir AEŠH-UV, AEŠH-MS, AEŠH-NMR, jo ar to palīdzību iegūtie spektri ļauj noskaidrot vielu struktūru. Minētās kombinācijas pieder hipenēto (*hyphenated*) metožu grupai.

**AEŠH-UV: diožu matricas detektors.** Atšķirībā no parastajiem UV detektoriem diožu matricas detektorā ir inversā optika. Detektors sniedz to pašu informāciju, kuru iegūst ar UV spektru palīdzību.

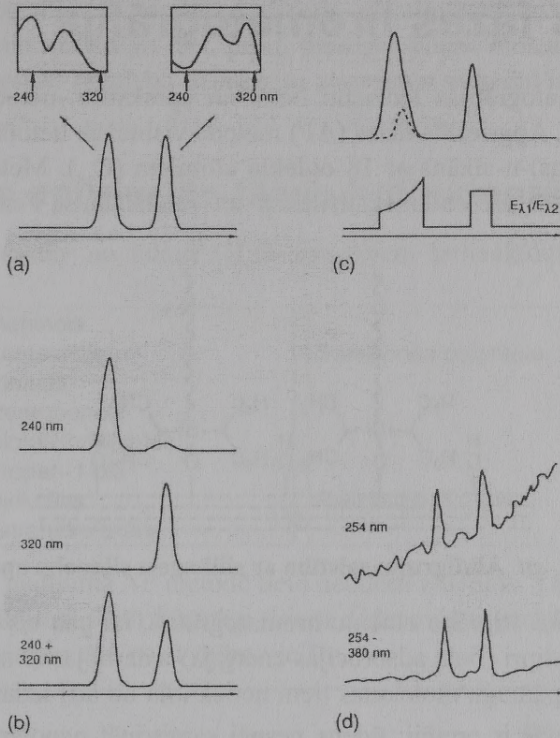


Gaismas stars vispirms iziet cauri detektora kivetei un tad polihromatorā tiek sadalīts spektrāli (ar režģa vai prizmas palīdzību). Spektrālā gaisma nonāk diožu matricā (100–1000 gaismas aktīvu diožu kopums, kas novietotas cita citai blakus). Katra diode sniedz noteiktu informācijas daļu, ko nolasa elektronika datu iegūšanai. Detektorī sniedz informāciju, kuru iegūst ar UV spektru palīdzību.

12.14. att. Diožu matricas detektors

### Diožu matricas detektora iespējas:

1. Hromatogrammas iegūšanas laikā var iegūt un saglabāt atsevišķām joslām atbilstošos UV spektrus pussekundes laikā. Spektru identificēšanai var izmantot spektru bibliotēku “on-line” režīmā. Atbilstības ticamības palielināšanai dators izrēķina otros atvasinājumus, kuros redzams vairāk maksimumu un minimumu nekā sākotnējā spektrā.
2. Paraugu spektri ļauj veikt detektēšanu pie izvēlēta viļņa garuma. Traucējošās joslas iespējams izslēgt. Pareizi izvēloties detektēšanas apstākļus, bieži vien iespējams veikt kvantitatīvo analīzi joslām, kuras ir slikti atdalītas no citām. Detektēšanas viļņa garumu var mainīt analīzes laikā.
3. Vienlaicīga detektēšana pie diviem dažādiem viļņu garumiem ļauj izrēķināt absorbances attiecību. Tai ir jābūt nemainīgai visā hromatogrāfiskās joslas platumā pie nosacījuma, ka joslu veido tīra viela (izņemot, ja piemaisījuma spektrs ir tāds pats kā vielai). Ja attiecība nav konstanta, joslu veido vairāk nekā viena viela.
4. Atņemot signālus, kas iegūti pie dažādiem viļņu garumiem, var samazināt nulles līnijas dreifū, kā arī troksni. Salīdzināšanas viļņa garumu var izvēlēties patvaļīgi spektra apgabalā, kurā neviens no nosakāmajiem savienojumiem neabsorbē.

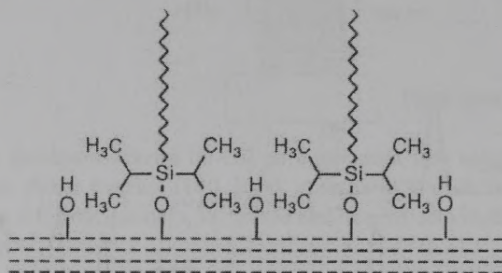


(a) Spektra uzņemšana atdalīšanas laikā; (b) hromatogrammu uzņemšana pie dažāda garuma viļņiem; (c) joslu viendabības kontrole; (d) hromatogrammas ar un bez salīdzināmā garuma viļņa atņemšanas.

12.15. att. Diožu matricas detektora iespējas

## 13. Apgrieztās fāzes hromatogrāfija

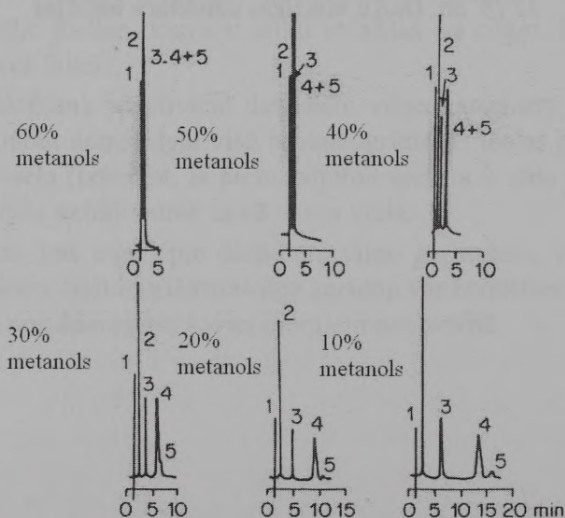
Apgrieztās fāzes hromatogrāfijas jēdzienu lieto, lai aprakstītu metodi, kurā nekustīgā fāze ir nepolārāka par kustīgo fāzi. Apgrieztās fāzes (AF) metodē visbiežāk lietotā ķīmiski saistītā nekustīgā fāze ir ODS (oktadecilsilāns)-n-alkāns ar 18 oglekļa atomiem ( $C_{18}$ ). Metodē izmanto  $C_8$  un īsākas ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_4$ ) alkilvirknes, kā arī cikloheksilsilānus un fenilsilānus. Fenilgrupas ir polārākas par alkilgrupām.



13.1. att. Alkilgrupu saistība ar silikagela silanolgrupām

Ūdeni parasti raksturo kā stiprāko eluentu hromatogrāfijā, lai gan tas ir pareizi tikai adsorbcijas hromatogrāfijā. Ūdens ļoti stipri (liela adsorbcijas enerģija) iedarbojas ar silikagela un  $Al_2O_3$  virsmas aktīvajiem centriem, tāpēc parauga molekulas tiem netiek klāt un ātri izdalās no kolonnas.

Apgrieztās fāzes sistēmās ir pretēji: ūdens nespēj samitrināt nepolārās (hidrofobās – ar ūdeni nesaderīgās) alkilgrupas un neiedarbojas ar tām nekādā veidā. Tāpēc ūdens kā eluents AF ir vājākais no visiem, un ar to iegūtie izdalīšanas laiki – vislielākie.



1 – laušanas koeficienta maiņas josla šķīdinātājam; 2 – benzols; 3 – o-dihlorbenzols; 4 – jodbenzols.

13.2. att. Eluenta sastāva ietekme apgrieztās fāzes hromatogrāfijā

Jo paraugs sliktāk šķīst ūdenī (ir nepolārāks), jo lielāki būs izdalīšanas laiki (sadalījuma konstantes) apgrieztās fāzes hromatogrāfiskajās sistēmās.

Izdalīšanas raksturlielumi samazinās šādā secībā:

Alifātika > inducētie dipoli ( $CCl_4$ ) > pastāvīgie dipoli ( $CHCl_3$ ) > vājās Luisa bāzes (ēteri, aldehīdi, ketoni) > stiprās Luisa bāzes (amīni) > vājās Luisa skābes (spirti fenoli) > stiprās Luisa skābes (karbonskābes).

Izdalīšanas laiki pieaug līdz ar oglekļa atomu skaitu molekulās.

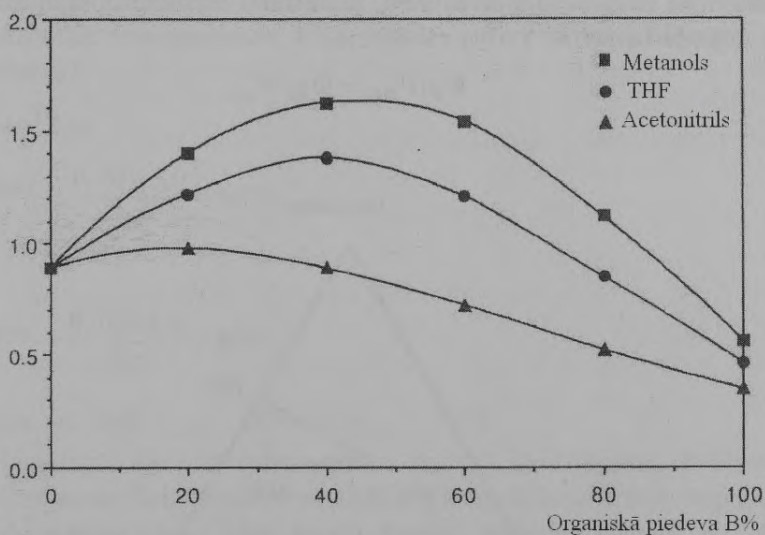
Vispārēja likumība: izdalīšanas parametri pieaug, palielinoties saskares (kontakta) laukumam starp parauga molekulām un nekustīgo fāzi, proti, pieaugot ūdens molekulu skaitam, kas atbrīvojas parauga molekulu “adsorbcijas” rezultātā. Izomēri ar sazarotām virknēm izdalās ātrāk nekā atbilstošie normālie izomēri.

### 13.1. Kustīgā fāze apgrieztās fāzes hromatogrāfijā

Kustīgā fāze parasti sastāv no ūdens ( $H_2O$  saturošiem buferšķīdumiem) un dažādiem ūdenī šķīstošiem šķīdinātājiem.

Metanols	↓ Samazinās polaritāte  Palielinās stiprums
Acetonitrils	
Etanols	
Izopropanols	
Dimetilformamīds	
Propan-1-ols	
Dioksāns	
Tetrahidrofurāns	

Ļoti nepolāru paraugu gadījumā AF metodē lieto neūdens eluentus. Tā kā AF hromatogrāfijā bieži izmanto gradientu, šķīdinātājiem jābūt ārkārtīgi tīriem. Ūdens un organisko šķīdinātāju maisījumiem parasti ir daudz augstāka viskozitāte nekā tīrām vielām.



13.3. att. Viskozitātes atkarība no sastāva ūdens maisījumiem ar organiskiem šķīdinātājiem 25 °C temperatūrā

Metanola ūdens šķīdumiem maksimālā viskozitāte ir pie 40% ūdens un sasniedz 1,62 mPa·s, kas ir trīs reizes vairāk nekā metanolam un divas reizes vairāk nekā ūdenim. Spiediena kritums kolonnā ir proporcionāls viskozitātei; tāpēc tas nav konstants gradienta apstākļos.

Ūdens AEŠH ir jāattīra īpaši. Ar jonu apmaiņu attīrītais ūdens nav pietiekami tīrs, un divkārtējā destilācija pat palielina organisko vielu saturu tajā. Tāpēc ūdens ir vai nu jāpērk ar atzīmi AEŠH, vai jāiegūst daudzu stadiju attīrīšanas procesā. Sterilu ūdeni iegūst, to izfiltrējot cauri 0,2 μm filtram. Metanola trūkums ir tā ūdens šķīdumu augstā viskozitāte, kas nosaka daudz augstāku spiedienu nekā citas kustīgās fāzes.

Ja metanola/ūdens šķīdumus gatavo pašrocīgi (nelietojot gradienta iekārtu maisītāju), abi komponenti ir jāsver vai atsevišķi jāmēra tilpumi. To nosaka kontrakcija – metanola pārākums var sasniegt 50%, ja 500 mL ūdens pievieno metanolu līdz 1000 mL.

Acetonitrils ir ļoti dārgs, jo sevišķi, ja tas ir tīrs “tālajā UV”. Tā viskozitāte problēmas nerada. Ja to attīra ar destilāciju, veidojas acetops, kas vārās 76,7 °C un kurā ir 84% acetonitrila.

Tetrahidrofurānam ir interesantas īpašības saistībā ar atdalīšanas selektivitāti. Tā UV sliksnis (220 nm) ir visai augsts. Kolonnas līdzsvarošanās pēc gradienta izmantošanas ir ilga salīdzinājumā ar CH<sub>3</sub>OH vai CH<sub>3</sub>CN.

Ja AEŠH domāto tetrahidrofurāna trauku atver, tajā notiek strauja peroksīdu veidošanās. Tie var reaģēt ar paraugu un radīt apdraudējumu darba drošībai.

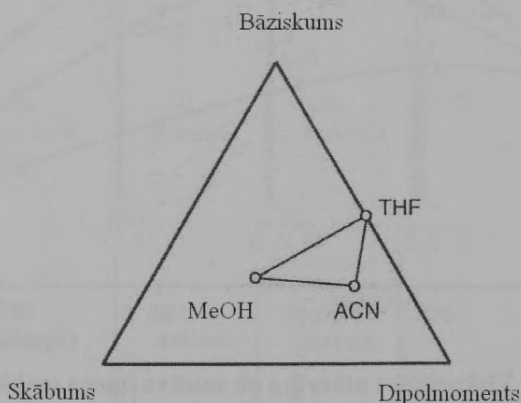
**Vispārēja likumība:** nav iesakāma kustīgās fāzes lietošana ar organisko vielu saturu, kas mazāks par 10%. “Eža kažoka” veida nekustīgās fāzes C<sub>18</sub> alkilķēdes tādos apstākļos iegūst nenoteiktu konformāciju, kas paildzina kolonnas līdzsvarošanās laiku. Gradientu arī nav ieteicams sākt ar 0% B – arī 10% šķīdums ir pietiekami vājš.

Vidē, kur organisko vielu saturs pārsniedz 10%, alkilķēdes ir orientētas vairāk vai mazāk taisni, bet lielāka ūdens satura klātbūtnē to struktūra kļūst nenoteikta. Noteiktā struktūra atjaunojas tīrā ūdenī, kurā nav organisko vielu, kad alkilķēdes ir pilnīgi salocījušās. Pievienojot organisko šķīdinātāju, paiet laiks, līdz atjaunojas “taisnvirziena” alkilķēžu novietojums.

## 13.2. Eluentu selektivitāte un stiprums

Eluentu selektivitāte ir izsakāma ar trijstūri, kura katra virsotne nosaka atbilstošās specifiskās starpmolekulārās mijiedarbības.

$$\Phi_{B1} P'_{B1} = \Phi_{B2} P'_{B2}$$



Trīs šķīdinātāji – metanols, acetonitrils un tetrahidrofurāns AF metodē nodrošina nepieciešamo selektivitāti. Acetonitrilam ir lielākā tieksme uz dipola-dipola iedarbībām, metanols ir labākais protonu donors, bet THF – protonu akceptors.

### 13.4. att. Eluentu īpašības AFH

Parasti šķīdinātājs A ir ūdens vai buferšķīdums. Bināro šķīdumu spēks nav precīzi definēta funkcija no B%, bet ir atkarīgs no analizējamās vielas un nekustīgās fāzes īpašībām. Tomēr labā tuvinājumā var iegūt skaitliskas vērtības kustīgās fāzes sastāvam, ja nepieciešams izmantot vairāk par vienu šķīdinātāju labākās selektivitātes atrašanai, lietojot sakarību:

$$\varphi_B P'_B = \varphi_C P'_C \quad (13.1)$$

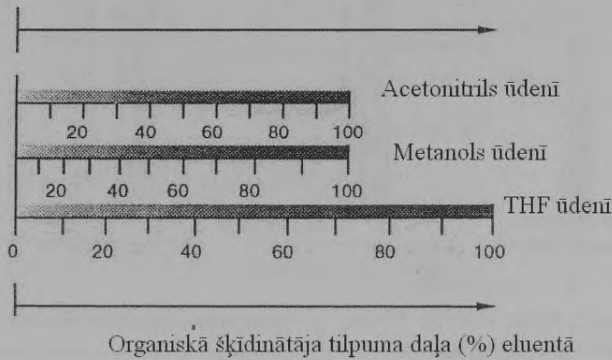
### Snaidera P' vērtības AF hromatogrāfijā

Ūdens 0
Metanols 3,0
Acetonitrils 3,1
Tetrahidrofurāns 4,4

Izteiksmē (13.1)  $\varphi$  ir noteikta šķīdinātāja tilpuma daļa, un  $P'$  ir tā apgrieztās fāzes stiprums, kuru mēdz dēvēt par AF polaritāti, kas neatbilst AF sistēmās notiekošo starpmolekulāro iedarbību dabai.

Kustīgās fāzes stipruma novērtēšanai mēdz lietot arī nomogrammas, kas iegūtas, pamatojoties uz liela skaita mazmolekulāru organisko savienojumu izdalīšanas parametriem.

Faktiski katrs no šiem savienojumiem sniegtu atšķirīgu nomogrammu no tās, kas redzama 13.5. attēlā. Nomogramma nav spēkā lielmolekulāriem savienojumiem.



13.5. att. Bināro maisījumu eluējošais spēks apgrieztās fāzes hromatogrāfijā

**Problēma.** Ar kustīgo fāzi, kuras sastāvā ir 70% metanola, iegūtie izdalīšanas parametri ir pieņemami, bet selektivitāte neapmierinoša. Kāda sastāva citus binārus maisījumus varētu izmēģināt selektivitātes uzlabošanai?

$$\varphi_{ACN} P'_{ACN} = \varphi_{MeOH} P'_{MeOH}$$

$$\varphi_{ACN} = \frac{\varphi_{MeOH} P'_{MeOH}}{P'_{ACN}} = \frac{0,70 \times 3,0}{3,1} = 68\%$$

vai

$$\varphi_{THF} = \frac{\varphi_{MeOH} P'_{MeOH}}{P'_{THF}} = \frac{0,70 \times 3,0}{4,4} = 48\%$$

No nomogrammas var iegūt  $\varphi_{ACN} = 60\%$  vai  $\varphi_{THF} = 45\%$ .

Abas metodes ļauj iegūt tikai tuvinātu sastāva maiņas novērtējumu. Reāliem paraugiem šīs atšķirības var būt ievērojamas. Selektivitātes smalkākai piergulēšanai divu komponentu maisījumam mēdz pievienot trešo komponentu. Šāda pieeja sarežģī metodes izstrādi un tāpēc kategoriska vispārīguma formā netiek ieteikta. Par trešo komponentu izmanto dihlormetānu (ja paraugos ir Cl saturošas vielas) vai N, N-dimetilformamīdu (aromātiskajiem amīniem un N-heterocikliem). Joniskas dabas paraugiem atkarībā no parauga dabas lieto buferšķīdumus ar noteiktu pH vērtību.

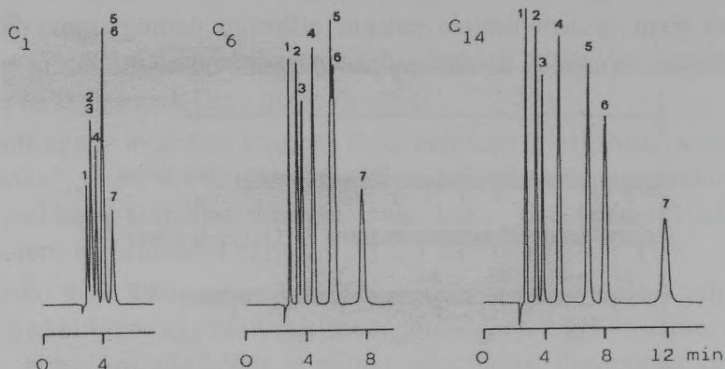
Ja ir jāatdala bāziskas dabas paraugi, kustīgajai fāzei mēdz pievienot “konkurējošo bāzi”, kas stipri iedarbojas ar skābajām silanolgrupām, tādējādi pavājinot parauga iedarbību ar tām. Šādā gadījumā iesakāma īpašu tieši bāziskām vielām domātu nekustīgo fāžu izmantošana. Bāzisku paraugu gadījumā par “universālu piedevu” uzskata  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , kas nav nepieciešama, ja izmanto modernos sorbentu veidus.

### 13.3. Nekustīgās fāzes

**Vispārīga likumība:** izdalīšanas laiki ir lielāki, ja nekustīgajā fāzē ir lielāks C atomu skaits. Tilpums, ko ieņem saistītās nepolārās grupas, ir nekustīgās fāzes sastāvdaļa – tas palielinās, pieaugot C virknes lielumam. Savukārt sadalījuma konstante ir proporcionāla tilpumu attiecībai starp nekustīgo un kustīgo fāzi:

$$K = k' \frac{V_S}{V_M}$$

Šo efektu parāda 13.6. attēls:



Apstākļi: kustīgā fāzē, metanols: ūdens (60:40). Vielas: 1 = acetons; 2 = p-metoksifenols; 3 = fenols; 4-m-krezols; 5 = 3,5-ksilenols; 6 = anizols; 7 = p-fenilfenols.

13.6. att. C atomu virknes garuma ietekme uz izdalīšanas lielumiem (G. E. Berendsen, *J. Chromatography*, 196, 21 (1980))

Tas nozīmē, ka izdalīšanas laiki ir lielāki garākas virknes ( $C_{18}$ ) gadījumā, salīdzinājumā ar īsāku virkni ( $C_8$ ) un augstāka C atomu skaita virkņu blīvuma (grupu daudzums uz  $nm^2$ ) gadījumā, salīdzinot ar zemāku virkņu blīvumu.

*Vispārīnājums*: laiki pieaug, palielinoties organisko vielu saturam nekustīgajā fāzē, ko var noteikt ar elementanalīzi.

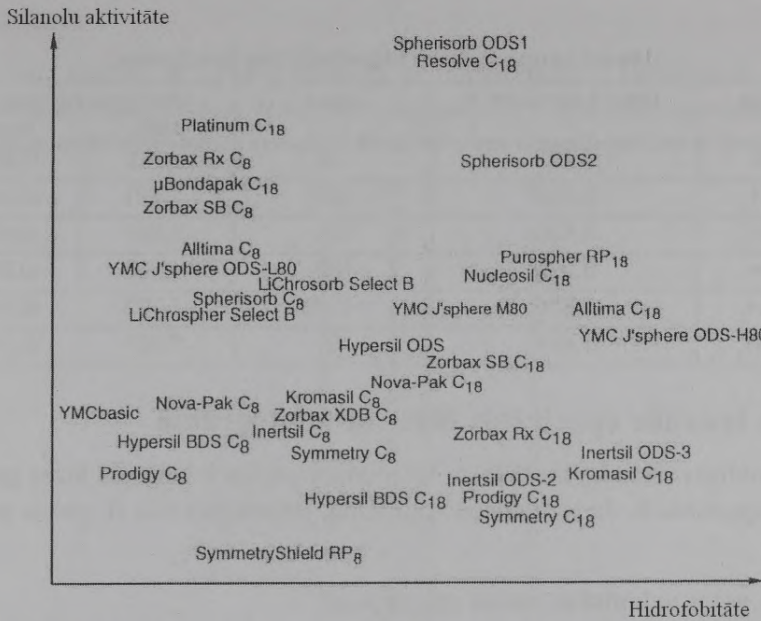
Lielu izdalīšanas laiki nozīmē, ka analīzei tiks patērēts vairāk laika vai būs nepieciešams stiprāks eluents B.

Stipri sorbējošā nekustīgā fāzē ir izmantojama polāriem paraugiem, kuri vāji sorbējas zema oglekļa satura nekustīgajās fāzēs, pat ja kustīgajā fāzē ir augsts ūdens saturs. Napolāriem paraugiem ir iesakāma zema C satura sorbenta lietošana, jo izdalīšanas laiki tad ir mazāki un līdz ar to arī mazāks organiskā šķīdinātāja patēriņš.

Būtiska AF īpašība ir tās silanolu aktivitāte. Kā zināms, visas silikagela virsmas silanolgrupas derivatizēt nav iespējams stērisku apstākļu dēļ. Atlikušās silanolgrupas izreaģē papildu derivatizācijas (*end capping*) procesā vai tiek aizsegtas stēriski. Vairums komerciāli pieejamo AF sorbentu stipri atšķiras ar šo nevajadzīgo silanolgrupu saturu, kuru nav iespējams likvidēt.

Lai gan vairumam analītisko lietojumu aktīvās silanolgrupas nav vajadzīgas (īpaši, atdalot bāziskus paraugus), nekustīgās fāzes ar noteiktu silanolu aktivitāti ir izmantojamas stipri hidrofilu (polāru) vielu analīzē. Šādiem paraugiem iesakāmas AF ar ķīmiski saistītām polārām funkcionālām grupām (kā alkilkarbamāta fāze). Metālu saturam nekustīgajās fāzēs ir jābūt zemam, īpaši, ja analīzē bāziskus paraugus ar tieksmi uz helātu veidošanu.

Ievērojot šos apstākļus kļūst skaidrs, ka komerciāli pieejamām AF ir atšķirīgas īpašības. Tās var izpētīt ar testa maisījumu, kurā ir toluols, etilbenzols (hidrofobo īpašību novērtēšanai), fenols, benzoscābe (polaritātes raksturojumam), anilīns, m-toluidīns un p-toluidīns (silanolfilās īpašības).



13.7. att. Silanolu aktivitātes un hidrofobās īpašības dažādu ražotāju AF sorbentiem  $C_8$  un  $C_{18}$

Liels skaits apgrieztais fāzes sorbentu novietoti koordinātu sistēmā, ko raksturo hidrofobitāte un silanolu aktivitāte. AF  $C_8$  ir mazāk hidrofobas un ir atrodamas grafa kreisajā pusē, kamēr  $C_{18}$  – labajā pusē. Jaunākas (modernās) nekustīgās fāzes ar labām saistības īpašībām un zemu metāla saturu atrodas zemāk, bet “vecās” atrodas augšējā daļā un ir mazāk piemērotas bāziskiem paraugiem. Savukārt “vecajām” nekustīgajām fāzēm piemīt selektivitāte, kas var atrisināt īpašas atdalīšanas problēmas. Ja atdalīšanas uzdevums ir “grūts”, piemērotākā fāze jāizvēlas empiriskā ceļā.

Bāzisku paraugu atdalīšanai iesakāms lietot sorbentus, kas ir īpaši izstrādāti šādam nolūkam. Pretējā gadījumā joslas būs asimetriskas (ar “astēm”). “Astes” gan var novērst ar piedevām kustīgai fāzei, bet šāda metode netiek uzskatīta par ieteicamu sarežģītā kustīgās fāzes sastāva dēļ.

AF metodē ātri iestājas līdzsvars starp kustīgo un nekustīgo fāzi, tāpēc gradienta lietošana ir viegli un ērti izpildāma. Līdzsvara atjaunošanās laiku jānosaka eksperimentāli, lai gan vairumā gadījumu nepieciešami pieci kolonnas tilpumi jaunā eluenta, lai rezultātu atkārtojamība būtu laba.

### 13.3.1. Izdalīšanas secības vadlīnijas AF hromatogrāfijā

Vielas izdalās hidrofobo īpašību pieauguma secībā. Tas atbilst polaritātes samazināšanās secībai. Hidrofobitātes kvantitatīvs rādītājs ir iegūts, balstoties uz sadalījuma koeficientu vērtību sistēmā *oktanolu/ūdens* saistību ar dažādu molekulas fragmentu un funkcionālo grupu īpašībām:

$$\lg P = \sum_{i=1}^{i=N} f_R(i) \quad (13.2)$$

kur  $f_R$  ir molekulas fragmenta (i) Rekeras konstante.

Savukārt kapacitātes faktors  $k'$  ir saistīts lineārā sakarībā ar  $\lg P$ :

$$\lg k' = a + b \lg P \quad (13.3)$$

13.1. tabulā parādītas dažādu organisko vielu uzbūves fragmentu Rekeras hidrofobitātes konstantes. Polārajām grupām tās ir ar (–) zīmi, jo to atrašanās vietas sastāvā samazina izdalīšanas laikus. Oglūdeņražu grupām zīme ir (+), jo tās, būdamas vielu sastāvā, izdalīšanas laikus palielina. Vielu kopējo hidrofobitāti iegūst, summējot visu fragmentu Rekeras konstantes. Vielu izdalīšanās secība atbilst hidrofobitātes pieauguma secībai.

Atomu grupu Rekeras hidrofobitātes konstantes

Grupa	Rekeras konstante, <i>f</i>	Grupa	Rekeras konstante, <i>f</i>	
			Alifāt.	Arom.
-H	0,175	-Cl	0,061	0,922
-CH <sub>3</sub>	0,702	-OH	-1,491	-0,343
>CH <sub>2</sub>	0,530	-O-	-1,581	-0,433
>CH-	0,235	-NH-	-1,825	-0,964
-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,886	>C=O	-1,703	-0,842
>C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	1,431	-S-	-0,501	0,110

### 13.3.2. Metodes izstrāde apgrieztās fāzes hromatogrāfijā

Pirmais solis analīzes metodes izstrādē ar AF hromatogrāfiju ir kustīgās fāzes gradients no 10 līdz 100% stiprākā komponenta B. Ja rezultāts neapmierina, jāizmēģina cits B, pirms nomaina nekustīgo fāzi.

#### Metodes izstrādes gaita nejoniskas dabas paraugiem

Jālieto nekustīgā fāze ar C<sub>8</sub> vai C<sub>18</sub> un nebuferēts H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN šķīdums 40 °C, ja ir iespējama kolonnas termostatēšana. Ja nav, – istabas temperatūra.

1. Izvēlēties B gradienta apgabalu, lai parauga izdalīšanas faktori *k'* būtu robežās no 1 līdz 10 (vai no 1 līdz 20 sarežģītākiem maisījumiem). Ja atdalīšana nav apmierinoša, jāmaina selektivitāte šādā secībā:
2. Nomainīt organisko šķīdinātāju B.
3. Lietot maisījumu no vairākiem šķīdinātājiem B.
4. Nomainīt nekustīgo fāzi pret tādu, kuras īpašības ir maksimāli atšķirīgas (13.7. att.) un sākt no jauna ar 1. punktu.
5. Mainīt analīzes temperatūru.
6. Optimizēt fizikālos parametrus – kolonnas izmērus, sorbenta daļiņu lielumu vai plūsmas ātrumu.

#### Metodes izstrādes gaita jonizētiem paraugiem

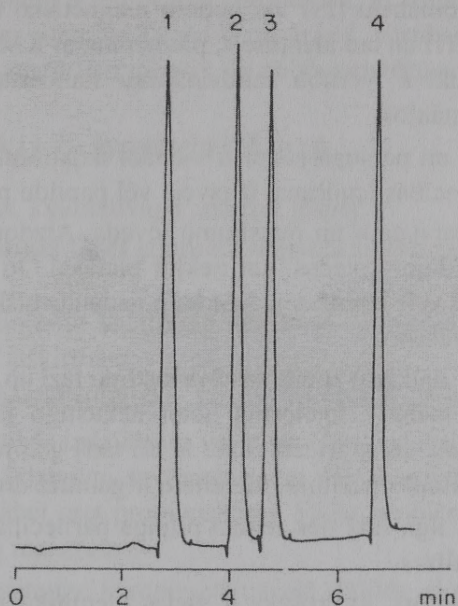
Sākt ar C<sub>8</sub> vai C<sub>18</sub> kā nekustīgo fāzi, kas domāta bāziskiem paraugiem. Par kustīgo fāzi izmantot buferšķīduma ar pH 2,5/metanola maisījumu 40 °C.

1. Izvēlēties % B gradienta apgabalu. Ja atdalīšana nav sasniegta:
2. (a) Mainīt pH vai  
(b) pāriet uz jonu pāra hromatogrāfiju.
3. Iestādīt % B.
4. Nomainīt organisko šķīdinātāju B.
5. (a) mainīt pH vai  
(b) mainīt pH un jonu-pāra reaģentu.
6. Mainīt temperatūru.
7. Mainīt nekustīgo fāzi uz fenilfāzi vai cianofāzi.
8. Optimizēt fizikālos parametrus.

Ja iegūtais rezultāts joprojām neapmierina, jālieto cita hromatogrāfijas metode (jonu apmaiņas, adsorbcijas, eksklūzijas).

### 13.3.3. Izmantošana

Visai parasta lieta analīzē ar AFH ir šķīdumi uz ūdens bāzes – bioloģiskas izcelsmes paraugi, zāļu formas, dzērieni utt. Tā kā ūdens ir vājākais eluents, H<sub>2</sub>O šķīdumus iespējams ievadīt tieši bez jebkādas iepriekšējas apstrādes (lai arī parauga filtrēšana vai centrifugēšana ir ļoti vēlama).



Apstākļi: kolonna 25 cm × 4 mm; nekustīgā fāze; LiChrosorb-8,10 μm, eluenta gradients: no 30% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O līdz 90%, 16 min; UV detektors, 254 nm. Joslas: 1 = bromurāls, 2 = karbromāls, 3 = acetobromāls; 4 = benzilmandelāts.

#### 13.8. att. Trankvilizatoru hromatogramma (Hewlett-Packard)

Trankvilizatoru tabletes izšķīdina ūdenī, filtrē un ievada hromatogrāfā. Šā tipa savienojumu analīze ar citām metodēm patērē daudz vairāk laika.

## 14. Analītiskā AEŠH

Kvalitatīvās analīzes mērķis ir noteikt, kāda viela atbilst hromatogrāfiskajai joslai. Ja joslai atbilstošā viela ir pilnīgi nezināma, lieto kādu no metodēm, kurā AEŠH ir sapārota ar masspektrometriju (MS) infrasarkanu staru spektrometriju (IS) vai kodolu magnētisko rezonansi (KMR). Ja vielas ir pietiekami, to var iegūt preparatīvi un tad identificēt, piemēram, ar KMR. Ja viens vai vairāki parauga komponenti ir zināmi, var veikt  $k'$  vērtību salīdzināšanu standartam un parauga komponentam identiskos hromatogrāfiskos apstākļos.

Ja standarta savienojumam un parauga joslai ir vienādi izdalīšanas laiki, abas vielas varētu būt identiskas. Tomēr pilnīgas pārlicības iegūšanai ir jāveic vēl papildu pārbaudes.

- Standartu pievieno paraugam un maisījumu ievada. Aizdomās turamajai joslai vajadzētu kļūt augstākai, neveidojot "plecus" un nekļūt platākai. Jo lielāks ir kolonnas teorētisko šķīvju skaits, jo lielākas ir izredzes atdalīt kaut nedaudz atšķirīgus komponentus ar līdzīgu hromatogrāfisko izturēšanos.
- Tāda pati pārbaude ir jāatkārto ar cita sastāva kustīgo fāzi un, ieteicams, arī ar citu nekustīgo fāzi (un atbilstošu eluentu). Ieteicams lietot nekustīgo fāžu pāri ar pilnīgi atšķirīgām īpašībām, kādas ir tiešā un apgrieztā fāze. Ja arī tādā gadījumā parauga komponentam un standartam nav atdalīšanās pazīmju, identitāte ir gandrīz droša.

Nosakāmo joslu analizē tik ilgi, līdz tiek iegūta pilnīga pārlicība par tās identitāti, un tikai tad var ķerties pie kvantitatīvās analīzes.

- Jo selektīvāks ir detektors, jo drošāka ir vielas identifikācija. Refraktometrs uztver visus komponentus, bet ar UV detektoru var noteikt tikai UV absorbējošas vielas. Savukārt selektīvais fluorescences detektors nosaka savienojumus, kas fluorescē. Augsto selektivitāti var palielināt, mainot ierosināšanas un emisijas viļņu garumus.
- Nomainot UV detektora viļņa garumu, jānovēro vienāda signāla maiņa gan paraugam, gan standartam – signāla pastiprināšanās vai pavājināšanās būs vienāda identiskuma gadījumā.
- Signālu attiecība, kas iegūta ar UV un RI detektoriem (vai citu detektoru pāri), ir raksturīgs lielums katram savienojumam noteiktos apstākļos.

Vēl pilnīgākai pārlicībai, jālieto kāda no citām fizikālajām metodēm, kas kombinēta ar hromatogrāfiju un pierāda vielas struktūru. Diožu matricas detektors ir lieliska ierīce kvalitatīvās analīzes veikšanai.

Visieteicamāk ir paraugu šķīdināt kustīgajā fāzē, lai izvairītos no neīstajām joslām. Ja tas tomēr nav iespējams, jāveic "tukšais" mērījums ar izmantoto šķīdinātāju (bez parauga).

Izdalīšanas laiku salīdzināšana lielā mērā ir atkarīga no kustīgās fāzes padeves pastāvības un ir mazāk droša nekā parauga un standarta maisījuma hromatogrammas izvērtēšana. Sarežģītiem paraugiem papildu problēmas rada "matricas efekts", kas var nedaudz izmainīt parauga  $t_R$  vērtības. Īpaši tas attiecas uz joslām, kas izdalās pārāk ātri vai pilnīgi neatdalās. Šādā gadījumā ir jālieto standartpiedevu metode.

Tās būtība ir šāda:

- vispirms analizē paraugu un nosaka interesējošās vielas joslas augstumu  $h_y$ ;
- pēc tam paraugam pievieno noteiktu komponenta  $y$  masu  $m_y$  un izmēra augstumu  $h'_y$ ;
- nosaka kalibrācijas faktoru  $S_y$ :

$$S_y = \frac{h'_y - h_y}{m_y} \quad (14.1)$$

Kalibrācijas faktors nedrīkst būt atkarīgs no pievienotās masas  $m_y$ , ja abas vielas ir vienādas. Sākotnējai parauga joslai  $t_R$  vērtībai pēc pārbaudāmā savienojuma pievienošanas nevajadzētu mainīties, ja abi šie savienojumi ir identiski.

Literatūrā parādās arvien jauni izdalīšanas laiku  $t_R$  mērījumi dažādās sistēmās dažādiem savienojumiem. Tomēr šiem datiem ir ierobežota lietojamība, jo izmantotajām kolonnām ir visai vāja atkarīgā pat vienas partijas robežās. Tāpēc literatūras  $t_R$  vērtības ir uzskatāmas par aptuvenām. Taču pastāv metodes, kas ļauj saistīt literatūras  $t_R$  ar vēlāk izmērītām vērtībām.

## 14.1. Izdalīšanas laiku $t_R$ paredzēšana

Bez  $t_R$  vērtību paredzēšanas, kvalitatīvajai analīzei jāspēj:

- paredzēt pareizu kustīgās fāzes stiprumu noteiktā savienojuma izdalīšanai ar optimālām  $k'$  vērtībām;
- paredzēt divu savienojumu atdalīšanu noteiktajā hromatogrāfiskajā sistēmā, balstoties uz relatīvās izdalīšanas atšķirībām;
- paredzēt iekšējā standarta struktūru, kura  $t_R$  vērtībai ir jāatšķiras no nosakāmās vielas.

Vieglāk paredzamas ir relatīvās izdalīšanas vai  $\alpha$  vērtības, nekā absolūtās  $k'$  vērtības. Relatīvās  $t_R$  vērtības ir vieglāk nosakāmas līdzīgiem savienojumiem vai atvasinājumiem (piemēram, naftalīnam pret 2-nitronaftalīnu vai etiķskābei pret propionskābi). Šādas problēmas jārisina praktiski, jo parasti paraugā ir līdzīgu savienojumu maisījums.

Lai paredzētu  $t_R$  vērtības parauga komponentiem kā dažādu eksperimentālu apstākļu funkciju, būtu precīzi jāzina sorbcijas mehānisms dotajā hromatogrāfiskajā sistēmā. Izņemot eksklūzijas hromatogrāfiju, precīzs mehānisms citās metodēs nav zināms.

Tomēr vispārzināma ir patiesība, ka pieredzējis hromatogrāfists spēj paredzēt sorbcijas lielumus, balstoties uz intuitīvu struktūras-izdalīšanas parametru sakarību.

**Vispārējais likumības.** Vielu  $t_R$  vērtības parasti mainās regulārā un paredzamā veidā līdzīgu savienojumu rindās, kas cits no cita atšķiras ar noteikta struktūras elementa “ $i$ ” skaitu, kā tas ir homologos, benzologos vai oligomēros. Visai bieži  $t_R$  vai  $k'$  ir lineāra funkcija no “ $n$ ” – grupu “ $i$ ” skaita parauga molekulā, piemēram,  $-\text{CH}_2-$  grupu skaita homologu rindā. Izokrātiskos analīzes apstākļos to izsaka sakarība, kuru sauc par Martina likumu:

$$\lg k' = A + B \cdot n$$

kur A un B ir konstantes kādai savienojumu rindai, noteiktā sistēmā – kolonnā, kustīgajā fāzē un citos apstākļos. Lielums  $\lg k'$  lineāri mainās atkarībā no grupu “ $i$ ” skaita molekulā. Šāda sakarība ir zināma karbonskābju ( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ ) un n-alkānu homologiem, atdalot šos savienojumus AF sistēmās. Martina vienādojums labāk izpildās AF sistēmās, taču arī adsorbcijas metodē tas ir apstiprinājies.

Piemēram,  $\lg k'$  mainās lineāri līdz ar dubultsaišu skaitu ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ) dažādos aromātiskajos ogļūdeņražos, kas atdalīti uz silikagela. Ir zināma lineāra sakarība starp  $\lg k'$  un stirola oligomērim.

Martina vienādojuma logaritmiskā formā ir spēkā izokrātiskos apstākļos. Gradianta apstākļos tā vienkāršojas un iegūst formu:

$$t_R = A' + B' \cdot n$$

Iepriekšējais izklāsts norāda, ka noteiktas funkcionālās grupas “ $i$ ” ievadīšana molekulā izmaina savienojuma  $k'$  vērtību par noteiktu lielumu  $\alpha_p$ , kas ir *konstants dotajai sistēmai* (noteiktai kolonnai, kustīgai fāzei utt.).

## 14.2. Mikropiemaisījumu analīze

- Jālieto kolonna ar mazu iekšējo diametru. Divkārtējs diametra samazinājums dod četrkārtēju  $C_{\max}$  palielinājumu.
- Jālieto īsa kolonna.
- Jālieto kolonnas pildījums ar mazu vienam teorētiskajam šķīvim atbilstošu augstumu. Tas panākams ar maza izmēra sorbeta daļiņām, augsti viendabīgā pildījumā un ar nekustīgo fāzi, kurai ir labas masas pārneses īpašības. Kolonnai jāstrādā van Demtera līknes minimumā.
- Analizējamai vielai ir ātri jāizdalās no kolonnas (mazas  $k$  vērtības).

Lai arī ieteicamāka ir īsāka kolonna, atdalīšanas efektivitātei jābūt pietiekami augstai, lai atdalīšana būtu pilnīga. Metodi nepieciešams optimizēt attiecībā uz mikropiemaisījumu, kura masai jābūt iespējami lielākai. Kolonna var būt pārslogota attiecībā pret galveno piemaisījumu, ja vien tas neietekmē mikropiemaisījuma izšķiršanu.

Ja parauga ir pietiekami daudz (kā tas ir pārtikas vielu analīzē), var ievadīt  $V_{i,\max}$ , pat ja ātrāk izdalījušās joslas ir ar palielinātu platumu un kolonna attiecībā pret galveno komponentu ir pārslogota (ja vien tas neietekmē mikropiemaisījuma izšķiršanu).

Piemaisījumu analīzē jāievēro arī citi parametri.

- a) Jānovērš joslu asimetrija. Asimetriskas joslas ir platākas, tāpēc zemākas par simetriskajām.
- b) Gradients joslas “saspiež”, tāpēc tās kļūst augstākas. Gradientu iesaka lietot, ja piemaisījumu neizdodas izdalīt ar zemām kapacitātes faktora vērtībām.
- c) Detektora noteikšanas sliekšnim jābūt pēc iespējas mazam. Kopējās īpašības noteicošie detektori, piemēram, refraktometri, mikropiemaisījumu noteikšanai nav piemēroti. Atbilstošākie ir fluorescences un elektroķīmiskie detektori. Ar UV detektoru, izvēloties atbilstošo viļņa garumu, ir iespējams novērst traucējošos piemaisījumus. Ar atvasināšanu iespējams iegūt vairākas kārtas zemāku noteikšanas sliekšni.

Lai arī kvantitatīvai analīzei nepieciešamā  $S/N$  attiecība ir 10, kvalitatīvajai analīzei pietiek ar 3.

Mikropiemaisījumu analīzē liela nozīme ir parauga sagatavošanai (ja iespējams, tai jānotiek vienlaicīgi ar nosakāmās vielas koncentrācijas pieaugumu). AEŠH kā tāda ir efektīva koncentrēšanas metode, jo parauga molekulas koncentrējas kolonnas ieejā, ja eluenta stiprums ir pārāk mazs.

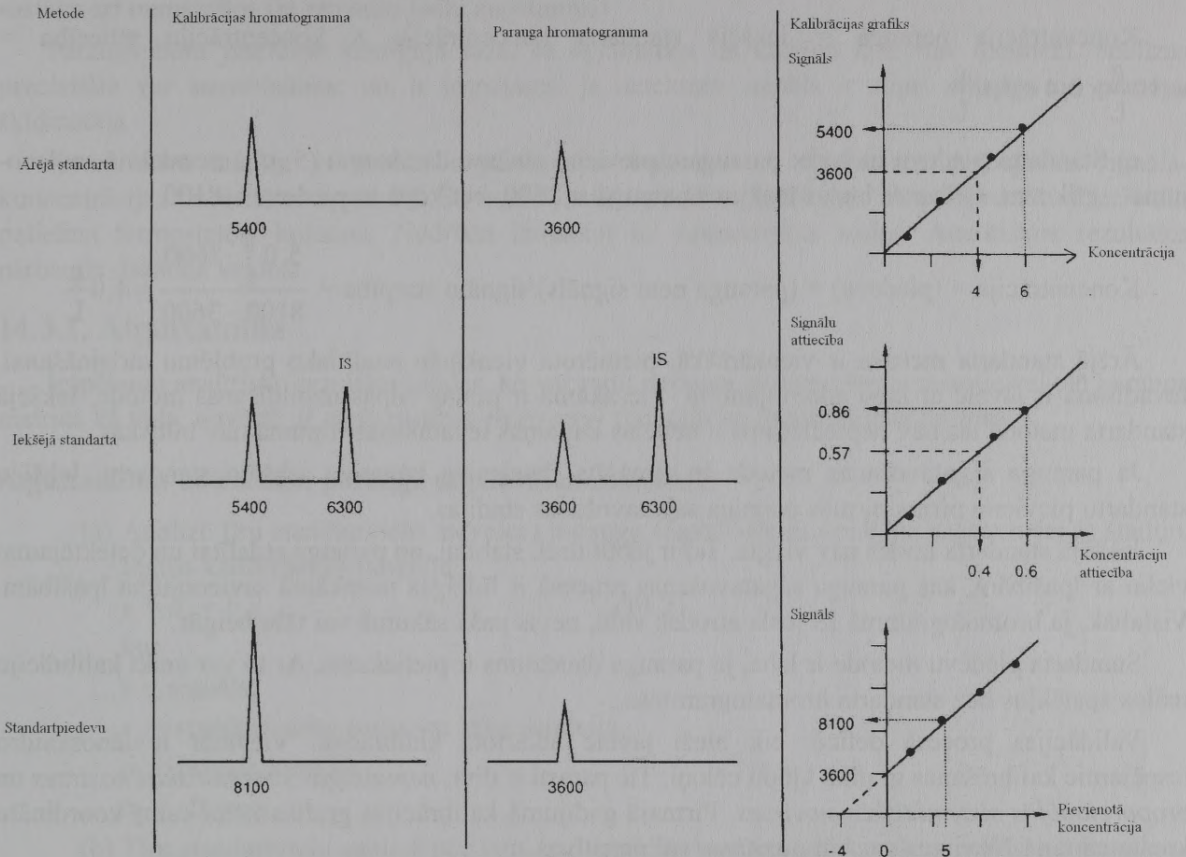
Ja izdalīšanai izmanto stipru kustīgo fāzi, joslas neizplūst un parauga koncentrācija eluātā ir augsta. Visefektīvāk tas notiek, ja eluāciju veic pie  $k=0$  ar šķīdinātāja fronti. To sauc par aizvietošanas hromatogrāfiju. Ar tās palīdzību ir izdevies uz stirola – divinilbenzola sveķiem palielināt hlorofenolu koncentrāciju ūdenī 4000 reizes.

## 14.3. Kvantitatīvā analīze

Attiecībā pret noteiktiem savienojumiem AEŠH detektora signāls ir daudz vairāk atkarīgs no savienojumu īpašībām nekā gāzu hromatogrāfijā. Piemēram, UV detektora signāls ir funkcija no vielas molārās absorbcijas, kas dažādām vielām var būt robežās no 0 līdz  $10\,000\ L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Molārā absorbcija un absorbcijas maksimums atšķiras pat homoloģiem. Tāpēc katrai kvantitatīvajai analīzei ir jāiegūst vismaz viena kalibrācijas hromatogramma.

Kalibrācijai izmanto kādu no trim metodēm: ārējā standarta, iekšējā standarta vai standartpiedevu metodi. Vienkāršākā kalibrācija ir viena punkta metode. Precīzāka ir kalibrācija ar vismaz trijiem punktiem. Aprēķinu pamatā ir kalibrācijas taisnes virziena koeficienta aprēķināšana, kas jāveic, izmantojot mazāko kvadrātu metodi. Kalibrācijas grafikam ir jābūt taisnei un jāiet cauri koordinātu krustpunktam. Katrai analīžu grupai jāveic sava kalibrācija. Ja izmanto “vecas” kalibrācijas datus, ir iespējams, ka apstākļi ir nedaudz mainījušies, un tāpēc rezultātos būs sistemātiskā kļūda.

Tā kā kvantitatīvās analīzes pamatā mēdz būt joslu augstumi vai laukumi, jēdziens “signāls” ir attiecināms uz abiem rādītājiem.



14.1 att. Iekšējā un ārējā standarta un standartpiedevu metodes salīdzinājums

**Piemērs:** noteikt glikozes koncentrāciju sulā, kur tās ir ap 5 g/L.

**Ārējā standarta metode.** Pagatavo standarta šķīdumu ar precīzi zināmu koncentrāciju 6,00 g/L un pēc hromatogrammas iegūšanas nosaka laukumu – 5400 kontu. Tāda paša tilpuma sulas parauga ievadīšana ļauj iegūt laukumu 3600 kontu.

$$\text{Kalibrācijas faktors CF} = \frac{6,00 \text{ g} \times \text{L}^{-1}}{5400 \text{ konti}} = 1,11 \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{L} \times \text{konti}}$$

$$\text{Koncentrācija paraugā} = \text{joslas laukums paraugā} \times \text{CF} = 3600 \text{ konti} \times 1,11 \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{L} \times \text{konti}} = 4,0 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

**Iekšējā standarta metode.** Gan parauga, gan standarta šķīdumam vienādā daudzumā pievieno savienojumu, kura nav paraugā – iekšējo standartu. Tā var būt fruktoze, kuras šķīduma koncentrācija ir 10 g/L. Joslu laukumi – glikozei paraugā 3600, glikozei standartā 5400; fruktozei abos šķīdumos 6300. Daudzumu attiecību iegūst, salīdzinot ar signālu attiecību.

$$\text{CF} = (\text{standartu koncentrāciju attiecība}) / (\text{standartu signālu attiecība}) =$$

$$\begin{aligned} & \frac{6,00}{10,0} = \frac{6,00 \times 6300}{10,0 \times 5400} = \frac{0,600}{0,860} = 0,70 \\ & \frac{6300}{5400} \end{aligned}$$

$$\text{Koncentrāciju attiecība paraugā} = \text{signālu attiecība} \times \text{CF} = \frac{3600}{6300} \times 0,7 = 0,4$$

$$\begin{aligned} \text{Koncentrācija paraugā} &= \text{iekšējā standarta koncentrācija} \times \text{koncentrāciju attiecība} = \\ &= 10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0,4 = 4,0 \frac{\text{g}}{\text{L}} \end{aligned}$$

c) Standarta piedevu metode: paraugam pievieno zināmu daudzumu (5 g/L) nosakāmā savienojuma – glikozes. Glikozes joslas laukums paraugā ir 3600, bet kopā ar piedevu – 8100.

$$\text{Koncentrācija} = (\text{piedeva}) \times (\text{parauga neto signāls}) / \text{signālu starpība} = \frac{5,0 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 3600}{8100 - 3600} = 4,0 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

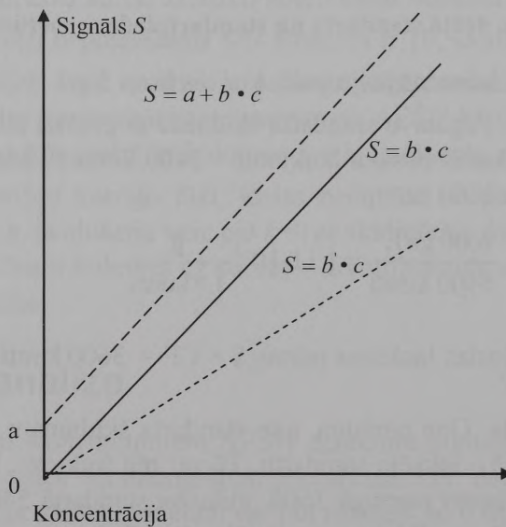
Ārējā standarta metode ir vienkāršākā, piemērota vienkāršo analītisko problēmu atrisināšanai. Ievadīšana ir jāveic ar labu atkārtojamību – iesakāma ir pilnas cilpas uzpildīšanas metode. Iekšējā standarta metodē tas nav nepieciešams – nelielas izmaiņas ievadīšanas tilpumā nav būtiskas.

Ja parauga sagatavošanas metode ir sarežģīta, ieteicams izmantot iekšējo standartu. Iekšējo standartu pievieno pirms pirmās parauga sagatavošanas stadijas.

Iekšējā standarta izvēle nav viegla. Tai ir jābūt tīrai, stabilai, no parauga atdalītai un detektējamai vielai ar īpašībām, kas parauga sagatavošanas procesā ir līdzīgas nosakāmā savienojuma īpašībām. Vislabāk, ja hromatogrammā IS josla atrodas vidū, nevis pašā sākumā vai tālu beigās.

Standarta piedevu metode ir laba, ja parauga daudzums ir pietiekams. Ar to var veikt kalibrāciju reālos apstākļos bez standarta hromatogrammas.

Validācijas procesā definē, cik bieži jāveic atkārtota kalibrācija. Vienmēr ir jānoskaidro iespējamie kalibrēšanas grafika kļūdu cēloņi. Tie parasti ir divi: *nemainīgas sistēmātiskas novirzes* un *proporcionālās sistēmātiskās novirzes*. Pirmajā gadījumā kalibrācijas grafiks neiet cauri koordinātu krustpunktam. Novirzes var būt pozitīvas vai negatīvas.



Pareizā taisne iet cauri koordinātu krustpunktam, un tās virziena koeficients ir  $b$ .

Apakšējai taisnei ir proporcionāli sistēmātiskā kļūda ar nepareizu virziena koeficientu  $b'$ .

Augšējai taisnei ir pareizs slīpums, bet tā signāla asi šķērso punktā  $a$ , tāpēc analīzes rezultāts būs ar konstantu sistēmātisko kļūdu.

#### 14.2. att. Pareizā un kļūdainā kalibrācijas taisne

Konstanto sistēmātisko kļūdu var noteikt ar standarta piedevu metodi. Proporcionālās sistēmātiskās kļūdas gadījumā slīpums var būt pārāk mazs vai pārāk liels. Abu veidu kļūdas var būt vienlaicīgi, un tās nosaka ar **atgūstamības** funkciju.

Analīze gradientā ir papildu kļūdu avots, tāpēc, ja iespējams, tā ir jāveic izokrātiskos apstākļos. Nepieciešams, lai plūsmas ātrums būtu nemainīgs (ja izmanto joslu laukumus) un kustīgās fāzes sastāvs arī nemainītos (ja izmanto joslu augstumus)

Paraugs būtu jāšķīdina kustīgajā fāzē. Ja šķīdinātājs un kustīgā fāze nav identiski, analīzes precizitāte var samazināties; tas ir iespējams, ja detektora signāls ir stipri atkarīgs no parauga šķīdinātāja.

Kvantitatīvā analīze ir jāveic, nepārslogojot kolonnu un detektoram darbojoties signāla-koncentrācijas linearitātes apgabālā. Šo nosacījumu izpilde ir jāpārbauda eksperimentāli. Precizitāti palielina termostatēta kolonna. Nedrīkst izmantot uz asimetriskas joslas. Analītiskos rezultātus pārbauda dažādos veidos.

### 14.3.1. Atgūstamība

Iespējamo analītisko rezultātu kļūdas, ko var radīt parauga sagatavošanas metode vai pat parauga matrica kā tāda, novērtē ar atgūstamības (*recovery*) funkciju un atgūstamības ātrumu.

#### Atgūstamības noteikšana parauga sagatavošanas metodei

- (a) Analīzē tīru standartvielu, neveicot parauga sagatavošanu vai kādu sagatavošanas stadiju. Iegūst kalibrēšanas funkciju:

$$y = a_0 + b_0 x_0 \quad (14.2)$$

kur

$y$  = signāls,

$x_0$  = standartvielas masa vai koncentrācija,

$a_0$  = brīvais loceklis,

$b_0$  = slīpums.

- (b) Tīru standartvielu analīzē pēc tam, kad izpildīta parauga sagatavošana atbilstoši metodei – analītisko rezultātu aprēķina saskaņā ar kalibrācijas funkciju:

$$x_p = \frac{y - a_0}{b_0} \quad (14.3)$$

kur  $x_p$  = standartvielas masa vai koncentrācija, kas iegūta, veicot parauga sagatavošanas procedūru.

- (c) Lielumus  $x_p$  izsaka kā funkciju no masas vai koncentrācijas  $x_0$  un aprēķina atgūstamības funkciju:

$$x_p = a_p + b_p x_0 \quad (14.4)$$

(indekss  $p$  norāda, ka lielums ir atrasts, veicot parauga sagatavošanas procedūru).

- (d) Aprēķina atgūstamību:

$$R = \left( \frac{a_p}{x_0} + b_p \right) \times 100 \quad (14.5)$$

Atgūstamības funkcijai vajadzētu būt lineārai ar brīvo locekli uz  $y$  ass  $a_p = 0$  un slīpumu  $b_p = 1$ .

Ja  $a_p \neq 0$ , tad pastāv konstanta sistemātiskā kļūda. Ja  $b_p \neq 1$ , pastāv proporcionālā parauga sagatavošanas kļūda. Atgūstamības funkciju un ātrumu jānosaka katrai atsevišķai sagatavošanas stadijai. Tā var noskaidrot kritisko stadiju. Pēc tam tāda pati procedūra ir jāveic ar paraugu, kuram ir pievienota standartviela, lai noskaidrotu matricas efektus.

**Problēma:**

Neveicot parauga sagatavošanu, aflatoksīnu šķīdumu joslu laukumi ir šādi:

10 ng	2432 konti
20 ng	4829 “
30 ng	7231 “
40 ng	9628 “

Pēc parauga sagatavošanas ar cietfāzes ekstrakcijas palīdzību, iegūti šādi dati:

10 ng	1763 konti
20 ng	4191 “
30 ng	6617 “
40 ng	9050 “

Aprēķināt atgūstamības funkciju un atgūstamības ātrumu.

*Atrisinājums:*

- a) Kalibrācijas taisni apraksta lineārās regresijas vienādojums:

$$y = 32,5 + 240x_0 \quad (14.6)$$

Funkcijas  $y$  ass brīvais loceklis (konstantā sistemātiskā kļūda) nav nulle. Tā iemesls var būt AEŠH atdalīšanas process, kas ir jānosaka.

b)  $x_p(10) = \frac{1763 - 32,5}{240} = 7,2 \text{ ng} \quad (14.7)$

Tādā pašā veidā nosaka, ka:  $x_p(20) = 17,3 \text{ ng}$ ,  $x_p(30) = 27,4 \text{ ng}$ ,  $x_p(40) = 37,6 \text{ ng}$

- c) Atgūstamības funkciju atrod kā lineāro regresiju no datu pāriem (7,2;10), (17,3;20), (27,4;30) un (37,6;40):

$$x_p = -2,92 + 1,01x_0 \quad (14.8)$$

Slīpums ir gandrīz pareizs, tomēr norāda uz mazu (1%) proporcionālo sistemātisko kļūdu. Savukārt  $y$  ass brīvais loceklis norāda uz konstanto sistemātisko novirzi – aflatoksīna noteiktais saturs būs par 2,9 ng mazāks par patieso.

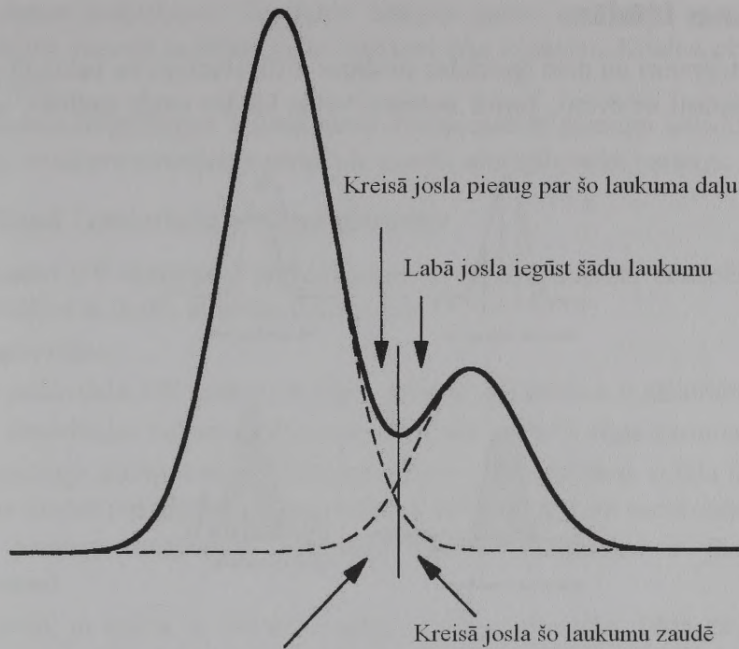
Šādas kļūdas dēļ atgūstamības ātrums ir atkarīgs no absolūtās parauga masas:

$$RR(10) = \left( \frac{-2,91}{10} + 1,01 \right) \times 100\% = 71,9\% \quad (14.9)$$

Tāpat var noteikt, ka:

$$RR(20) = 86,5\%, \quad RR(30) = 91,3\% \quad \text{un} \quad RR(40) = 93,7\%$$

Joslu daļēja pārklāšanās ir nozīmīgs kļūdu avots kvantitatīvajā analīzē. Iemeslu atklāj 14.3. attēls.



14.3. att. Pārklājušos joslu pāru sadalīšana ar vertikāli

Ja integrators divas joslas sadala ar vertikālu līniju, daļa no abiem laukumiem kļūst par kļūdaino joslu sastāvdaļām. Tāpat laukumu sadalījums ir nepareizs, ja laukumu atdalīšana ir veikta nevis ar vertikālajām līnijām, bet ar pieskarēm (metodi lieto mazo josliņu atdalīšanai).

Efeki uz laukumu vērtībām ir vispārināmi:

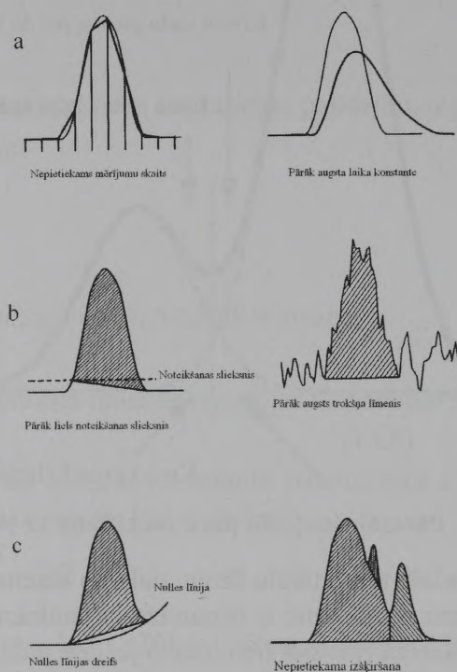
- Gausa formas joslām (simetriskām) neatkarīgi no izdalīšanās secības lielās joslas ir pārāk lielas un mazās – pārāk mazas. Tikai tad, ja divas simetriskas joslas ir vienāda lieluma, tās atdalot ar vertikālu līniju, nav mērījuma kļūdas;
- neatkarīgi no lielumu attiecības asimetriskām joslām pirmā ir pārāk maza, bet otrā – pārāk liela;
- relatīvo kļūdu attiecība ir apgriezti proporcionāla joslu laukumu attiecībai. Mazākās joslas atrodas stiprākā atkarībā.

#### Dažas vadlīnijas minēto kļūdu novēršanai

- Joslām ir jābūt pilnīgi izšķirtām! Nepieciešamā izšķiršanas vērtība ir atkarīga no joslu lielumu attiecības. Izšķiršanas vērtība  $R_s = 1,5$  ir pietiekama, ja joslas ir līdzīga lieluma. Tomēr tas var būt nepietiekami pie lielām atšķirībām, kad joslu laukumu attiecība ir 20:1 vai vairāk.
- Joslu augstumu noteikšana bieži vien ir precīzāka par laukumu integrāciju. Kvantitatīvā analīze pēc joslu augstumiem ir gandrīz brīva no kļūdām, pat ja joslas ir asimetriskas un mazākā josla izdalās pirms lielākās.
- Jānovērš joslu asimetrija. Asimetrija samazina izšķiršanu, un tai ir nevēlams iespaids uz mazo joslu, kas izdalās pēc lielajām, integrēšanas pareizību. Jāpanāk iekārtas mazākie iespējamie ārpus kolonnas tilpumi, pareizi piepildīta kolonna, atbilstoša fāžu sistēma, kas nodrošina ātru masas pārnešanu starp kustīgo un nekustīgo fāzi, piemērots parauga šķīdinātājs, vienlaikus nepieļaujot kolonnas pārslodzi.

### 14.3.2. Integrēšanas kļūdas

Elektroniskie integratori un datu apstrādes sistēmas ir tik svarīgas un neaizstājamas ierīces, ka to iespējamās kļūdas parasti neievēro. Tomēr noteikta veida kļūdas mēdz gadīties, un tās ir apkopotas 14.4 attēlā.



Nepietiekams mērījumu punktu skaits un pārāk augsta laika konstante (a).

Pārāk augsts noteikšanas sliekšnis un pārāk augsts trokšņa līmenis (b).

Nulles līnijas dreifs un nepietiekama izšķiršana (c).

14.4. att. Iespējamās integrēšanas kļūdas

#### Kļūdu veidi

1. *Nepietiekams punktu skaits.* Lai iegūtu patieso joslas formu, nepieciešams reģistrēt vismaz 10 mērījumus. Ja datu reģistrācijas ātrums ir pārāk mazs, joslu laukumi un, iespējams, arī augstumi tiks izmērīti nepareizi. Neapstrādāto datu „piegludināšana”, ko veic integrators, šajā gadījumā nav pretlīdzeklis. Datu reģistrācijas ātrumu var izvēlēties, un iespējams, ka tas ir jāmaina hromatogrammas iegūšanas laikā.
2. *Laika konstante ir pārāk maza.* Pārāk lēna detektoru vai integratoru apkalpojošā elektronika var izkropļot signālu – joslas laukums nemainās, bet augstums samazinās. Pastāv iespējamība, ka joslas laukums ir samazināts un arī blakusesošu joslu izšķiršana ir mazāka.
3. *Pārāk augsts sliekšnis.* Integrators atpazīst joslu, ja signāls ir lielāks nekā nulles līnijai. Sliekšņa vērtība ir jāuzstāda augstāka par trokšņa līmeni. Jebkurā gadījumā joslu augstumi un laukumi būs samazināti.
4. *Pārāk augsts trokšņa līmenis.* Saprotams, ka nav iespējams veikt pareizu integrēšanu, ja signāla/trokšņa attiecība ir pārāk zema. Rezultāts būs nejaušs, pat lietojot datu apstrādes sistēmas, kas spēj atskaitīt nulles līniju pēc hromatogrammas uzņemšanas. Nosakot joslu laukumus, signāla/trokšņa attiecībai jābūt vismaz 10.
5. *Nulles līnijas dreifs.* Integrators vienmēr velk taisnu nulles līniju. Ja patiesā nulles līnija ir ieliekta vai izliekta, noteiktais laukums būs mazāks vai lielāks par patieso.

6. *Nepietiekama izšķiršana.* Nepilnīgi izšķirtu joslu gadījumā gan ar pieskares, gan perpendikula metodi atdalītie joslu laukumi būs kļūdaini. Kļūdas pieaugs, ja joslas būs asimetriskas.

Daudzos gadījumos integrēšanas kļūdas nevar kompensēt ar paraugu ievadīšanu un kalibrācijas faktoru noteikšanu, standartu maisījums parasti ir mazāk sarežģīts nekā paraugs.

### 14.3.3. Detektēšanā izmantotais viļņa garums

Ja izmanto parasto UV detektoru, nepieciešams izvēlēties noteiktu detektēšanas viļņa garumu (tas nav jādara, strādājot ar diožu matricas detektoru).

Jāievēro šādi apsvērumi:

- parauga sastāvdaļu UV spektri un viļņu garumi, pie kuriem ir absorbcijas maksimumi;
- molārās absorbcijas lielumi maksimumos un pie izvēlēta viļņa garuma;
- dažādu parauga komponentu izdalīšanas faktori, ja atdalīšana veikta izokrātiskos analīzes apstākļos (joslas pakāpeniski kļūst platākas, bet to augstumi samazinās);
- dažādo parauga sastāvdaļu nozīmība (dažos gadījumos ir jānosaka tikai viens komponents).

Jo mazāka ir josla, jo vairāk to ietekmē *signāla/trokšņa* attiecība. Tādā gadījumā kvantitatīvās analīzes pareizība un, iespējams, arī precizitāte samazināsies. Tāpēc ir jāpanāk, lai nosakāmā josla izdalītos hromatogrammas sākumā un tiktu noteikta tās absorbcijas maksimumā.

**Vispārēja likumība:** veicot detektēšanu pie maziem viļņu garumiem, rezultāti ir aptuvenāki, lielāka kļūst varbūtība parādīties sistēmas joslām, un nulles līnijai gradienta apstākļos būs novērojams dreifs.

Protams, ka izvēlētais viļņa garums iekārtā ir jāpārbauda, veicot regulārus aparāta testus, lai nodrošinātu precizitātes saglabāšanos mēnešu un gadu garumā. Pat neliela novirze no pareizā viļņa garuma var stipri ietekmēt analītisko rezultātu.

## 14.4. Aparatūras testēšana, validācija un sistēmas atbilstības tests

Jebkurā laboratorijā, kurā notiek kvalitātes kontrole, nepieciešams nodrošināt analīžu ticamību, precizitāti un pareizību.

Mērķa sasniegšanai ir triju veidu kvalitātes novērtējums:

- aparātūras pārbaude, kas pierāda instrumenta vispārīgu darbības pareizību;
- validācija, kas pierāda metodes atbilstību prasībām;
- sistēmas atbilstības tests, kas ir summa no pārējiem diviem kvalitātes rādītājiem.

Aparātūras testā iekļauti protokoli par sūkņa, inžektora un detektora funkcijām un atbilstību prasībām, kas atrodamas 14.1. tabulā.

14.1. tabula

Aparatūrai izvirzītās prasības

<b>Sūknis:</b>	
Plūsmas precizitāte	< 5% rel.
Īslaicīgā pastāvība	<0,5%
Ilgtermiņa nemainība	<0,2%
<b>Inžektors:</b>	
Atkārtojamība (uz 10 µL)	<0,5%
<b>Detektors:</b>	
Troksnis	<0,04 mAU
Viļņa garuma pareizība	<2 nm

Mūsdienu AEŠH iekārtām šīs prasības ir visai viegli izpildāmas, īpaši, ja iekārtas ir jaunas. Aparatūras tests ir jāveic pēc noteikta laika intervāla vai pēc katras sastāvdaļu nomaiņas. Aparatūras tests ir priekšnoteikums metodes validācijai.

**Validācija** ir procedūra, kas pierāda, ka metode ļauj iegūt ticamus, pareizus un precīzus gaidītos rezultātus. Stingras vadlīnijas metodes validācijai nav iespējams nospraust. Tomēr visos gadījumos jāizpilda vairāki (vai visi) nosacījumi.

- *Selektivitāte (specifiskums)*. Iespējamība atrast un noteikt interesējošo savienojumu citu vielu klātbūtnē. Hromatogrāfiskajai metodei tas nozīmē, ka analizējamo vielu ar vajadzīgo izšķiršanu var atdalīt no pārējām un noteikt ar prasībām atbilstošu instrumentu.
- *Linearitāte*. Kalibrācijas grafikam ir jābūt taisnei un jāiet cauri koordinātu krustpunktam. Ja atgadās kādas novirzes, tām ir jābūt zināmām.
- *Precizitāte*. Iespējamība atkārtot analīzi ar mazu standartnovirzi. Tā ir atšķirīga no reproducējamības (analīzi ir jāvar atkārtot pēc ilga laika, citam cilvēkam, ar citu iekārtu un citā laboratorijā) un atkārtojamības, kam atbilst pretējais iepriekš minētajam.
- *Pareizība*. Spēja veikt analīzi ar nelielu atšķirību starp noteikto un patieso vērtību.
- *Jūtība*. Spēja analizēt paraugus ar zemu nosakāmās vielas saturu. Jāatceras atšķirības starp noteikšanas sliekšni (LOD – *limit of detection*) kvalitatīvajā analizē un kvantitatīvās noteikšanas sliekšni (LOQ – *limit of quantitation*), kas ir stipri augstāks.
- *Noturība (ruggedness)*. Metodes nejutība pret ārējo apstākļu maiņu. Tā ir atkarīga no konkrētās metodes un no tā, cik daudz parametru nepieciešams kontrolēt: temperatūru, kustīgās fāzes sastāvu, detektora īpašības, parauga sagatavošanu, personālu (vai analīzi var veikt jebkurš vai tikai speciālists?), laboratoriju (analīzes veikšanas iespējamība kaut kur citur). Šis uzskaitījums nav galīgs. Attiecībā uz metodes noturību, nav izslēgta negaidīto apstākļu ietekme, īpaši, ja analīzi ir jāveic citā laboratorijā.

Metodes validācijai nepieciešams definēt piemērotu procedūru, kas atbilst kompānijas vai valsts laboratoriju prasībām. Procedūrai jābūt dokumentētai, un tā stingri jāievēro, izstrādājot jaunu metodi vai adaptējot zināmo.

Sistēmas atbilstību (*suitability*) garantē gan aparatūras testa, gan validācijas atbilstība prasībām. Tas ir viegli paveicams, ja AEŠH iekārta ir apgādāta ar datorizētu rezultātu apstrādes sistēmu. Tad katrā analizē vai noteiktā intervālā var iegūt nepieciešamos parametrus: šķīvju skaitu, izšķiršanu, precizitāti, izdalīšanas laikus, relatīvos izdalīšanas laikus un joslu asimetrijas rādītājus. Ja vajag – arī linearitāti un kvantitatīvās noteikšanas sliekšni. Rezultātiem seko ar statistiskiem palīgīdzekļiem, ieskaitot viegli izsekojamo grafisko dokumentāciju ar kontroles kartēm.

## Literatūra

- Baltes, W.** *Pārtikas ķīmija*. Tulk. no vācu val. I. Jākobsone, M. Jākobsons. Rīga: Latvijas Universitāte, 1998, 478 lpp.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P.** *Food chemistry*. Translation from the 5-th German Edition by M. M. Burghagen. Berlin etc.: Springer, 2004, 1070 p.
- Brown, T. L., LeMay, H. E., Bursten, B. E., Burdge, J. R.** *Chemistry the Central Science*. Pearson Education, Inc., 2003, 1045 p.
- Chemical Markers for Processed and Stored Foods / *ACS Symposium Series*. Ed by Tung-Ching Lee, Hie-Joon Kim. Washington: American Chemical Society, 1996, 290 p.
- Greenfield, H., Southgate, D. A. T.** *Food composition data / production, management and use*. Rome: FAO, 2003, 288 p.
- Gunstone, F. D.** *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. London etc., Blackie Academic&Profesional, 1996, 252 p.
- Health Benefits and Safety Evaluation of Certain Food Components*. Brussels: International Dairy Federation, 2002, 42 p.
- Kennedy, J. F., Alanís, R. M.** Book Reviews Richard Owusu-apenten, Editor. *Introduction to Food Chemistry*. CRC Press, Florida. *USA Carbohydrate Polymers*, 2005, 62, 3, 302.
- Macromolecular Interactions in Food Technology. Ed. N. Parris et al. *ACS symposium series*. Washington: American Chemical Society, 1996, 304 p.
- Malone, M. E., Appelqvist, I. A. M., Norton, I. T.** Oral Behaviour of Food Hydrocolloids and Emulsions. Part 2. Taste and Aroma Release. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 6, 775–784.
- Martinez, I., James, D., Loréal, H.** Application of Modern Analytical Techniques to Ensure Seafood Safety and Authenticity. Rome: FAO, 2005, 73 p.
- Matiseks, R., Šnēpels F. M., Šteinerte, G.** *Pārtikas analītiskā ķīmija: pamati, metodes, lietošana*. Tulk. no vācu val.: I. Jākobsone, M. Jākobsons. Rīga: Latvijas Universitāte, 1998, 456 lpp.
- Renard, D., Velde, F., Visschers, R. W.** The Gap between Food Gel Structure, Texture and Perception. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20, 4, 423–431.
- Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Ed.by T.M. Devlin. New York, etc.: Wiley-Liss, 1997, 1186 p.
- Walstra, P.** *Physical Chemistry of Foods*. New York – Basel: Marcel Dekker, 2003, 807 p.
- Yeshajahu, P., Clifton E. M.** *Food Analysis: Theory And Practice*. New York etc.: Chapman and Hall, 1994, 778 p.
- Пищевая химия*. Учеб. для студ. вузов; под ред. А.П. Нечаева, 2-е изд., перераб. и испр. Санкт-Петербург: ГИОРД, 2003, 631 с.
- Skoog, D., Holler, F. Niemann, T.** *Principles of Instrumental Analysis*. Philadelphia etc.: Saunders College Publishing, 1998, 849 p.
- Meyer, V.** *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Chichester etc.: John Willey & Sons, 2000, 338 p.
- Snyder, L., Kirkland, J., Glaych, J.** *Practical HPLC Method Development*. New York etc.: Willey-Interscience, 1997, 745 p.



LATVIJAS NACIONĀLĀ BIBLIOTĒKA



0308104077

15147



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Ut  
664

Mācību materiāls  
Latvijas starpaugstskolu akadēmiskajai  
maģistra studiju programmai "Uzturzinātne"

ISBN 978-9984-825-82-3



9 789984 825823