

Zlúčeniny vyvolávajúce sladkú chuť. VIII. N-Acylaspartylové sladidlá s vysokou sladivosťou

ALŽBETA KRUTOŠÍKOVÁ - MICHAL UHER - MILAN KOVÁČ

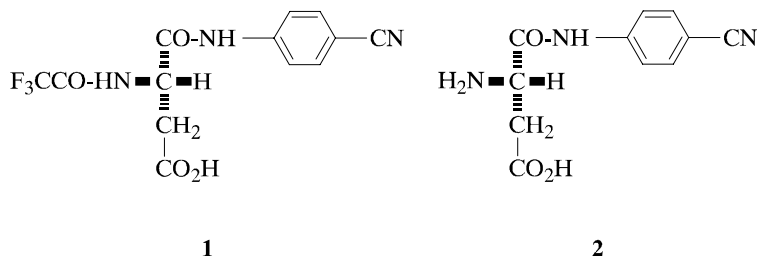
SÚHRN. V prehľade sa uvádzajú najnovšie poznatky o extrémne sladkých látkach na základe kyseliny asparágovej. Sem patrí najúčinnšie sladidlo *N*-[1-(5,6,7,8-tetrahydronaftoyl)]- α -*L*-aspartyl-6-kyano-3-pyridylamid-(tetrahydronaftamát), ktorý je 70 000-krát sladší ako sacharóza. Teória multibodového pripojenia pôvodne navrhovaná na vysvetlenie sladkej chuti vysoko sladkých sladidiel, sa uvádza v súvislosti so štúdiom vzťahu štruktúry a aktivity tohoto sladidla.

V posledných dvadsiatich rokoch medzi najviac študované sladidlá patria deriváty kyseliny *L*-asparágovej. V jednej z našich predchádzajúcich prác [1] sme uviedli prehľad zlúčenín vyvolávajúcich sladkú chuť, založených na dipeptidoch. Sem patrí predovšetkým aspartám - metylester α -*L*-aspartyl-*L*-fenylnalanínu.

Skupinu sladkých látok - amidov založených na kyseline *L*-asparágovej publikovali Lapidus a Sweeney [2]. V tejto skupine je najúčinnjšiou zlúčeninou *N*-triflóracetyl- α -*L*-aspartyl-4-kyanoanilid (**1**), ktorý je 3000-krát sladší ako sacharóza (na molekulovom základe), odpovedajúca voľná aminozlúčenina (**2**) je iba 12-krát sladšia ako sacharóza na molekulovom základe (18-krát sladšia na hmotnostnom základe). Sladkú chuť **1** (podobne ako chuť aspartámu) objavili náhodne [2]. Až r. 1978 [3] sa objavil názor, že systém AH-B (v ktorom A aj B sú elektronegatívne atómy; AH je donorom vodíkovej väzby, zatiaľ čo B je akceptorom [4]) je nevyhnutný najmä na fixáciu molekuly na aktívnom povrchu receptora. Podľa toho jedna vodíková väzba tvorená karboxylovou skupinou môže byť dostatočná na udržanie molekuly, ak má vhodné sterické hodnoty, ktoré sú v zhode s povrchom receptora [3].

Ďalším štúdiom sa dokázalo, že zmena substituentov výrazne vplyva

Prof. Ing. Alžbeta KRUTOŠÍKOVÁ, DrSc., Doc. Ing. Michal UHER, CSc., Katedra organickej chémie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.
Ing. Milan KOVÁČ, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

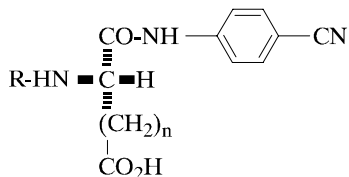


na intenzitu sladkej chuti. Často sa uvádza, že prítomnosť uhľovodíkových skupín výrazne zvyšuje intenzitu sladkej chuti v sérii týchto zlúčenín [5,6]. *N*-Alkylácia v zlúčenine **2** (a následne na jej *L*-glutamylovom analógu) viedla k veľmi sladkým zlúčeninám dosahujúcim až 20 000-násobnú sladivosť sacharózy [7].

Náhrada *N*-trifluóracetylovej skupiny v zlúčenine **1** *N*-propylovým zvyškom spôsobuje zníženie intenzity sladkej chuti. Naopak, rozvetvenie na tomto zvyšku v polohe 2 s jednou alebo dvomi metylovými skupinami

TABULKA 1. Vplyv uhľikátého substituenta R na intenzitu sladkej chuti substituovaných α -*L*-aspartylanilidov.

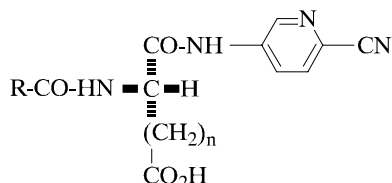
TABLE 1. Influence of the hydrocarbon substituent on sweetness potency of substituted α -*L*-aspartylanilides.



Zlúčenina ¹ R	Intenzita sladkosti ²		Literatúra ³
	n = 1	n = 2	
(CH ₃) ₃ CCH ₂	700	5 000	[8]
CH ₃ (CH ₂) ₅	600	5 000	[6]
(<i>RS</i>)-CH ₃ (CH ₂) ₂ CH(CH ₃)CH ₂	1 500	5 000	[6]
C ₆ H ₁₁ -(CH ₂) ₃	7 000	7 000	[6]
CH ₃ (CH ₂) ₆	2 000	7 000	[6]
2-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂	2 000	10 000	[8]
4-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂	3 000	15 000	[8]
1-naftylCH ₂	4 000	15 000	[8]
3-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂	5 000	20 000	[8]

Intenzita sladkej chuti je udávaná na hmotnostnom základe v porovnaní s 2 %-ným roztokom sacharózy.

1 - compound, 2 - sweetness potency, 3 - references. Sweetness potency is given on a weight basis relative to 2 % sucrose solution.

TABULKA 2. Intenzita sladkosti niektorých sladkých derivátov kyseliny *N*-acyl *L*-asparágovej a *L*-glutámovej.TABLE 2. Sweetness potency of some sweet derivatives of *N*-acyl-*L*-aspartic and *L*-glutamic acid.

Zlúčenina ¹ R	n	Intenzita sladkosti ²	Literatúra ³
(<i>R</i>)-C ₆ H ₅ CH(OCH ₃)	2	11 000	[6]
(<i>RS</i>)-C ₆ H ₅ OCH(CH ₃)	2	13 000	[6]
(<i>S</i>)-CH ₃ (CH ₂) ₃ CH(CH ₃)	2	20 000	[6]
CH ₃ (CH ₂) ₃ C(CH ₃) ₂	2	22 000	[6]
(<i>R</i>)-C ₆ H ₅ OCH(CH ₃)	2	25 000	[6]
1-naftyl	2	30 000	[6]
(5,6,7,8)-tetrahydro-1-naftyl	2	40 000	[6]
3-C ₂ H ₅ O-C ₆ H ₅	1	10 000	[8]
2,3-diCH ₃ C ₆ H ₄	1	20 000	[8]
1-naftyl	1	35 000	[8]
(5,6,7,8)-tetrahydro-1-naftyl	1	70 000	[9]

Intenzita sladkej chuti je udávaná na hmotnostnom základe v porovnaní s 2 %-ným roztokom sacharózy.

1 - compound, 2 - sweetness potency, 3 - references. Sweetness potency is given on a weight basis relative to 2 % sucrose solution.

intenzitu sladkej chuti zvyšuje až na úroveň 5000 (tabuľka 1.).

Ďalšia skupina sladkých látok kyseliny *N*-acylasparágovej a kyseliny *N*-acylglutámovej sa získa pripojením uhlíkatej skupiny k zlúčenine **2** (alebo jej glutámového analógu) amidovou väzbou. Takto sa získali veľmi sladké zlúčeniny, medzi ktorými vyniká *N*-[1-(5,6,7,8-tetrahydronaftoyl)]-α-*L*-aspartyl-6-kyano-3-pyridylamid-(tetrahydronaftamát) (tabuľka 2.), ktorý so 70 000-násobnou sladivosťou v porovnaní so sacharózou je doteraz najsladšou zlúčeninou spomedzi sladidiel založených na kyseline *L*-asparágovej [8,9].

Analógia sa pozorovala medzi *N*-aspartylovými sladidlami a predchádzajúcimi *N*-alkylanalógmi. Napr. pozorovalo sa také isté zvýšenie intenzity sladkej chuti spôsobené rozvetvením na polohe 2 jednou alebo dvomi metylovými skupinami. Avšak je pozoruhodný rozdiel, že *N*-2,2-

dimetylpropanoyl analóg bol bez chuti, zatiaľ čo korešpondujúci *N*-2,2-dimetyl propyl analóg mal sladivosť na úrovni 5000.

Menší rozdiel v sladivosti sa pozoroval pri zisťovaní optimálnej dĺžky uhlíkového reťazca. Dĺžka je najlepšie reprezentovaná hexanoylovou skupinou namiesto heptanoylového zvyšku pre predchádzajúce aspartylové sladidlá. Avšak pridanie resp. odstránenie iba jednej metylénovej skupiny na hexanoylovom zvyšku spôsobuje predtým pozorovaný efekt t. j. silný pokles intenzity sladkej chuti. Napr. *N*-butanoyl alebo *N*-pentanoylové analógy majú intenzitu sladkej chuti okolo 100, zatiaľčo *N*-hexanoylový analóg vykazoval hodnotu 1000.

Rozvetvenie na polohe 2 spojené s predĺžením reťazca sa ukázali ako základné požiadavky pre tvorbu sladkej chuti vysokej intenzity. Napr. nízka hodnota 150 pre *N*-pentanoylový analóg sa zvýšila iba na 2800 po pripojení metylovej skupiny do polohy 2 a ďalšie zvýšenie na hodnotu 9000 sa pozorovalo, ak tento pentanoylový zvyšok bol predĺžený o ďalšiu metylénovú skupinu.

Podobný, sladkú chuť umocňujúci efekt, sa pozoroval pri zavedení aromatických zvyškov. Monometylácia na polohách 2- a 3-benzoylového zvyšku zvyšuje intenzitu zo 400 na 2500. Dimetylácia na týchto polohách kumuluje obidva efekty a dosahuje sa intenzita 6000. Substitúcia v polohe 2 a 3- používajúc 1-naftoyl resp. 1-(5,6,7,8)-tetrahydronaftoyl skupinu sa podieľa na zvýšení intenzity na hodnotu 70 000 (tabuľka 2.).

Teória viacbodového pripojenia - model pre recepciu sladkej chuti

V protiklade k autorom [10,11], ktorí vysvetľovali interakciu sladkej látky s receptorom jednoduchými, dobre akceptovateľnými modelmi predpokladajúcimi jestvovanie dvoch resp. troch kontaktných miest, autori [5,12] navrhli teóriu mnohobodového pripojenia (multipoint attachment - MPA). Tento model predpokladá osem voliteľných, ale interagujúcich, rozpoznávajúcich miest schopných interagovať so sladkou zlúčeninou iónovými a vodíkovými väzbami ako aj hydrofóbnymi interakciami. Z toho vyplýva, že na vyvolanie sladkej chuti nie je potrebná interakcia všetkých rozpoznávajúcich miest receptora. Vyššia intenzita sladkej chuti môže byť súhrnným výsledkom ich prítomnosti.

Ako dôsledok pozorovanej väčšej dôležitosti tvaru a dĺžky uhlíkatého reťazca, autori predpokladajú, že na receptore sú štyri rozpoznávajúce mies-

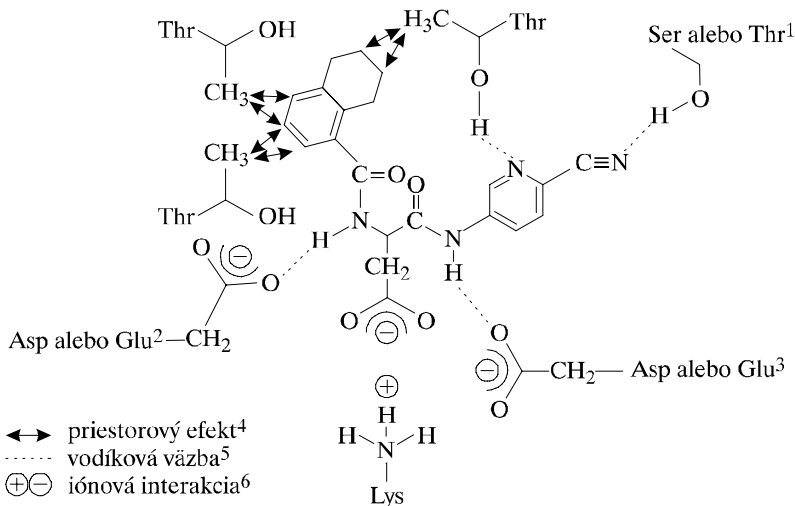
ta: G1, G2, G3 a G4, každé veľkosti metylovej skupiny. Dôsledok veľkosti a nešpecifických hydrofóbných interakcií, ako sa pôvodne predpokladalo, nie je ďalej dôležitý. Význam správnej dĺžky a rozvetvenia uhlíkatej časti sa vysvetľuje existenciou jej priestorovej zhodnosti s receptorom. Vzťahy štruktúra - aktivita odhalili, že uhlíkatá skupina, ktorá premoštuje dve alebo viac (G1, G2, G3 alebo G4) rozpoznávajúcich miest receptora, spôsobuje zvýšenie intenzity sladkej chuti. Tento fenomén je favorizovaný rigidnejšími štruktúrami, ako sú naftylový a tetrahydronaftylový zvyšok. Sterická zhodnosť sladidla s miestom na receptore sa vysvetľuje ako nevyhnutný krok konformačnej zmeny sladkého receptora z inaktívnej zúženej na rozšírenú - aktívnu konformáciu. Považujúc sladidlo za „klin“, ktorý mení receptor na aktívnu expandovanú formu, hladina voľnej energie tohto procesu musí byť nízka. Bodová interakcia CH₃ skupiny medzi uhlíkovým substituentom a dvomi alebo viacerými rozpoznávajúcimi miestami receptora môže byť dostatočná na iniciovanie konformačnej zmeny receptora. Ostatné miesta receptora označené ako AH, B, XH a D, sú totožné s tými, ktoré už boli postulované autormi [10,11]. Iónová interakcia sa predpokladá pre interakciu karboxylovej skupiny s receptorom sladkej chuti (B miesto), vodíková väzba pre aromatickú amidovú skupinu (AH miesto), (-amóniová resp. amidová skupina (XH miesto) a kyanová skupina (D miesto).

Rozpoznávajúce miesta receptora

Ak uvažujeme, že receptor sladkej chuti má proteínovú podstatu, tak rozpoznávajúce miesta receptora sú konštruované bočnými reťazcami každej špecifickej aminokyseliny prítomnej na aktívnej úrovni.

Napr. iónová triáda, pozostávajúca z amóniovej skupiny pochádzajúcej z lyzinylového bočného reťazca a z dvoch karboxylátových skupín pochádzajúcich z aspartylového alebo glutamylového zvyšku, je považovaná za receptorového partnera pre B, AH a XH skupiny sladidiel, ako je znázornené pre tetrahydronaftamát (obr. 1.).

Všeobecnou charakteristikou bočných reťazcov receptora je ich schopnosť účinne posilňovať iónovú väzbu s doplnkovými skupinami sladidla - amóniovou a karboxylátovou (iónová väzba sa zosilňuje dvomi vodíkovými väzbami). Tiež sú schopné vytvoriť slabšie vodíkové väzby s neionizovanými skupinami, ako sú hydroxylová alebo amidová skupina, ktoré sa pravidelne vyskytujú v sladidlách. Ďalej existencia vodíkových väzieb s dvomi kyslíkovými atómami karboxylovej skupiny receptora vysvetľuje nezmenenú sladkosť



OBR. 1. Predpokladané interakcie tetrahydronaftamátu (70 000-krát sladší ako sacharóza) s bočnými reťazcami aminokyselín receptora sladkej chuti.

FIG. 1. Postulated interaction of tetrahydronaphthamate (70 000 times sweeter than sucrose) with the amino acid side chains of the sweetness receptor.

1 - Ser or Thr, 2 - Asp or Glu, 3 - Asp or Glu, 4 - steric effect, 5 - hydrogen bond, 6 - ionic interaction.

v prípade, ak sa kyselina *L*-asparágová nahradí kyselinou *L*-glutámovou v bežných sladidlách.

Priestorovú podobnosť G1 až G4 miest receptora majú tiež aminokyseliny obsahujúce metylovú skupinu (alanín, treonín, valín alebo prolín s jeho pyrrolidínovým kruhom).

Avšak bočné reťazce treonínu sú prednostne selektované, pretože duálna štruktúra jeho bočného reťazca stericky súhlasí s metylovou skupinou, donorová - akceptorová vodíková väzba s hydroxylovou skupinou a biformná interakcia bola dokázaná inými hyperintenzívnymi sladidlami. Ku kyanovej skupine (D-miesto sladidiel) sa prejaví donorový charakter vodíka hydroxylovej skupiny treonínu alebo serínu.

Sumárne, bežný model predpokladá jestvovanie sady troch rozlišovacích miest receptora (AH, B a XH), ktoré zahrňujú iónové a vodíkové väzby, druhú skupinu štyroch dodatočných rozpoznávajúcich miest (G1 až G4), ktoré participujú najmä na sterickej zhodnosti so sladkými molekulami a D rozpoznávajúce miesto, ktoré priestorovo patrí k miestu G4 a ktoré vystupuje ako skupina poskytujúca vodík.

Literatúra

1. KRUTOŠÍKOVÁ, A. - UHER, M. - KOVÁČ, M. - KOVÁČ, J.: Zlúčeniny vyvolávajúce sladkú chuť. II. Aspartám a jeho analógy. Bull. potrav. Výsk., 25(5), 1986, č. 1, s. 15-25.
2. LAPIDUS, M. - SWEENEY, M. J.: *L*-4'-Cyano-3-(2,2,2-trifluoroacetamido) succin-anilic acid and related sweetening agents. J. med. Chem., 16, 1973, č. 2, s. 163-166.
3. TEMUSSI, P. A. - LELJ, F. - TANCREDI, T. J.: Tree-dimensional mapping of the sweet taste receptor site. J. med. Chem., 21, 1978, č. 11, s. 1154-1158.
4. KRUTOŠÍKOVÁ, A. - UHER, M. - KOVÁČ, M.: Sladkosť - stereochemická vlastnosť. Bull. potrav. Výsk., 29(9), 1990, č. 3-4, s. 237-250.
5. TINTI, J. M. - NOFRE, C.: Why does a sweetener taste sweet? A novel model. In: Sweetener: discovery, molecular design, and chemoreception. ACS Symposium Series. Ed. Walters, D. E. - Orthoefer, F. T. - Du Bois, G. E. American Chemical Society, Washington, D.C. 450, 1991, s. 88.
6. US Pat. 4,921 939. NOFRE, C. - TINTI, J. M. - OUAR, CH. F.: Preparation of glycine- and D-alanine-derived phenyl-substituted guanidine and ethanamidine sweetening agents. 1.5.1990.
7. Eur. Pat. Appl. EP 338,946. NOFRE, C. - TINTI, J. M.: *L*-Aspartic-and glutamic acid-*N*-hydrocarbon derivatives as sweetening agents. 25.10.1989.
8. TINTI, J. M. - NOFRE, C.: New high-potency sweeteners. In: The contribution of low- and nonvolatile materials to the flavor of food. Ed. Pickenhagen, W. - Chi-Tang-Ho - Spanier, A. M. Illinois, USA, Allured Publishing Corp. 1996, s. 77-93.
9. Fr. Demande FR 2,690,315. NOFRE, C. - TINTI, J. M.: Preparation of aspartic acid derivative artificial sweetener. 29.10.1993.
10. SHALLENBERGER R. S. - ACREE, T. E.: Molecular theory of sweet taste. Nature, 216, 1967, s. 480-482.
11. KIER, L. B.: A molecular theory of sweet taste. J. pharm. Sci., 61, 1972, s. 1394-1397.
12. NOFRE, C. - TINTI, J. M.: In quest of hyperpotent sweeteners. In: Sweet-taste chemoreception. Ed. Mathlouthi, M. - Kanters, J. A. - Birch, G. G. London, Elsevier Science Publishers Ltd., 1993, s. 205-236.

Do redakcie došlo 19.12.1997.

Compounds developing sweet taste. VIII. New high-potency *N*-acylaspartyl sweeteners

KRUTOŠÍKOVÁ, A. - UHER, M. - KOVÁČ, M.: Bull. potrav. Výsk., 36, 1997, p. 257-263.

SUMMARY. The present work describes the most potent *L*-aspartic acid-based sweetener, *N*-[1-(5,6,7,8-tetrahydronaphthoyl)]-*L*-aspartic acid α -4-cyano-3-pyridinamide („tetrahydronaphthamate“) which exhibits a sweetness potency of 70,000 times that of sucrose. The multipoint attachment (MPA) theory previously proposed to explain the sweet taste of potent sweeteners is reviewed in connection with a structure-activity relationship study performed on this sweetener.