

Определение аминокислотного состава коровьего молока методом жидкостной хроматографии с применением предколоночной дериватизации

Айчурок Мажитова^{1*}, Асылбек Кулмырзаев¹

¹Отделения пищевой инженерии, Кыргызско-Турецкий университет «Манас», Бишкек 720044, Кыргызстан

Received: 31-03-2017; Accepted: 20-11-2017

Аннотация: Применение процедуры предколоночной дериватизации с диэтилэтоксиметиленмалонатом в определении содержания аминокислот молока, методом обращенно-фазовой хроматографии с диодно матричным детектированием было исследовано. Установлено влияние pH среды на коэффициент отклика. Оптимизированы условия модификации аминокислот образцов при проведении процедуры пробоподготовки. Было достигнуто полное разделение 18 аминокислот. В молоке коровы преобладала глутаминовая кислота, концентрация которой была в два раза больше чем лейцин и лизин, и в три раза больше чем аспарагиновая кислота.

Ключевые слова: Аминокислота, белки, молоко, хроматография.

Determination of Amino Acid Composition of Cow's Milk by Liquid Chromatography Using Precolumn Derivatization

Abstract: The application of the procedure of pre-column derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate in the determination of the amino acid content of milk by reversed-phase chromatography with diode-matrix detection was investigated. The influence of the pH on the response factor was established. The conditions of modification of amino acids during sample preparation procedure were optimized. A complete separation of 18 amino acids was achieved. The most abundant amino acid in cow's milk was glutamic acid, the concentration of which twice that of leucine and lysine, and three times greater than aspartic acid.

Keywords: Amino acid, protein, milk, chromatography.

^{1*} Corresponding author: Мажитова А., email: mazhitova.aichurok@gmail.com

1. ВВЕДЕНИЕ

Определение аминокислотного состава пищевых продуктов имеет важное значение для качественной оценки белков и пептидов, которые могут влиять на химические и питательные свойства продукта. Ценность белка зависит от того, насколько он богат незаменимыми аминокислотами. Ведь именно из аминокислот, образующихся в результате расщепления белков из пищевых продуктов, и синтезируются в человеческом организме белки. Белки молока по сбалансированности своих аминокислот позволяют значительно улучшать общую сбалансированность аминокислот белков всего пищевого рациона [1].

В настоящее время для разделения и количественного определения белков и аминокислот, а также нуклеиновых кислот, широко используется метод хроматографии – динамического разделения смеси веществ. Существует несколько разновидностей хроматографического метода анализа, различающихся по механизму разделения веществ [2]. Для разделения аминокислот наиболее точным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Самой универсальной и многофункциональной является колонка C18, наполненная силикагелем с привитыми октадецильными группами [3]. Усовершенствование техники ВЭЖХ и её широкое практическое применение решает задачи разделения и количественного определения очень малых количеств определяемых компонентов в сложных объектах. Отсутствие хромофорных групп в большинстве молекул аминокислот требует стадии дериватизации [4]. Для пред- и постколоночной дериватизации предложены различные реагенты. Метод обращенно фазовой ВЭЖХ включающее предколоночную дериватизацию используется чаще, поскольку они быстрее, более чувствительны и менее дорогостоящие для анализа аминокислот. Наиболее часто используемые реагенты в предколоночной дериватизации являются: фенилизотиоцианат (ФИТЦ), что дает производные обнаруживаемые с помощью УФ детектора и о-фталдиальдегид (ОФА), диметиламино нафталин сульфонилхлорид (Дансил-Cl) и 9-флуоренилметил-хлорформиат (ФМХ) которые дают флуоресцентные производные [4, 5, 6, 7, 8].

Использование диэтилэтоксиметиленамалоната (ДЭММ) при предколоночной дериватизации дает производные аминокислот обнаруживаемые с помощью диодно-матричного детектора (УФ и видимый диапазон) (Рисунок 1).

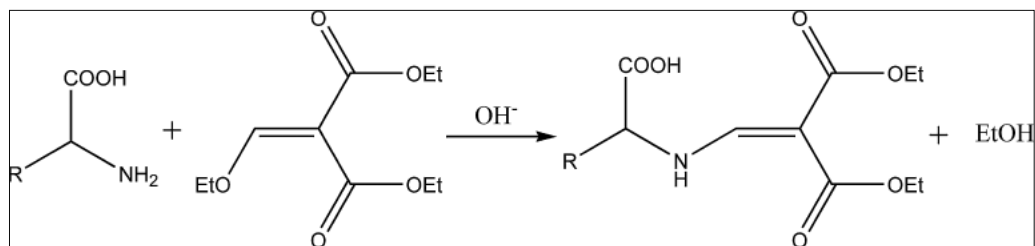


Рисунок 1. Реакция аминокислот с ДЭММ [9].

Целью данной работы является исследование содержания аминокислот в коровьем молоке с применением ДЭММ как дериватирующего агента и установить влияние количества ДЭММ и боратного буфера на процесс дериватизации.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы молока для исследования получали во вторую фазу лактации (продуцирования нормального молока), поскольку изменения химического состава в течении этого периода

незначительны и которая сдается на переработку, в то время как молоко первой (продуцирования молозива) и третьей (продуцирования стародойного молока) фаз лактации не подлежат переработке и нельзя сдавать на молочные заводы [10, 11]. Гидролиз белка проводился в термостате, при температуре 110°C в течение 23 ч после добавления 6Н соляной кислоты в навеску молока [7]. Аликвоту гидролизата дериватизировали ДЭММом в присутствии боратного буфера в щелочной среде [11, 12, 13, 14]. Для определения оптимальной концентрации ДЭММ стандартные растворы аминокислот дериватизировали в разных концентрациях и определяли коэффициент отклика. Влияние концентрации боратного буфера на процедуру дериватизации также определяли. Точность хроматографических результатов проверяли методом “загрязнения” исследуемого образца стандартными растворами аминокислот.

Определение аминокислот в молоке проводили методом ВЭЖХ с применением жидкостного хроматографа Agilent 1200 (США) с диодноматричным детектированием при длине волны 280 нм. Хроматографическое разделение было таким же как описано в [14] и проводился на колонке С18 при температуре термостата колонки 16°C. В качестве подвижной фазы использовался ацетонитрил и ацетатный буфер при рН 6,0 в градиентном режиме элюирования с расходом элюента 1,0 мл/мин [12]. Качественный и количественный анализ проводился при соответствии времени удерживания и метода внутреннего стандарта, соответственно [5].

Были использованы стандартные образцы следующих аминокислот: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, пролин, тирозин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, триптофан, фенилаланин, орнитин, лизин (Мерк, Дармштадт, Германия).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Жидкостная хроматография предоставляет отличные возможности для надежного количественного определения индивидуальных соединений в сложных смесях. Площадь пика на полученной хроматограмме может служить мерой для определения уровня аналита в пробе. В целях надежного количественного определения могут применяться классические подходы аналитической химии: методы добавок, внутреннего и внешнего стандартов. Наиболее часто используемый подход базируется на внутренних стандартах. В этом случае площади характеристических пиков нескольких (или даже всех) целевых аналитов измеряются относительно площади характеристического пика специально добавленного соединения (в известном количестве), называемого внутренним стандартом.

Процедура начинается с приготовления стандартных растворов, содержащих известные количества всех целевых аналитов и внутренних стандартов. Анализ полученные хроматограмм дает возможность рассчитать факторы отклика (response factors, RF):

$$RF = \frac{C_{is} * S_x}{C_x * S_{is}} \quad (1)$$

где RF – фактор отклика, C_{is} – количество аналита в стандартном растворе, S_x – площадь пика аналита, C_x – количество внутреннего стандарта в стандартном растворе, S_{is} – площадь пика внутреннего стандарта.

Фактор отклика может варьироваться в широком диапазоне (01-10) в зависимости от природы аналита и внутреннего стандарта. Чем ближе это величина к 1, тем точнее будут результаты анализа [15].

Результаты полученных данных свидетельствуют о том, что коэффициент отклика остается стабильным при количестве ДЭММ 3, 5, 10, 20 мкл (Рисунок 2).

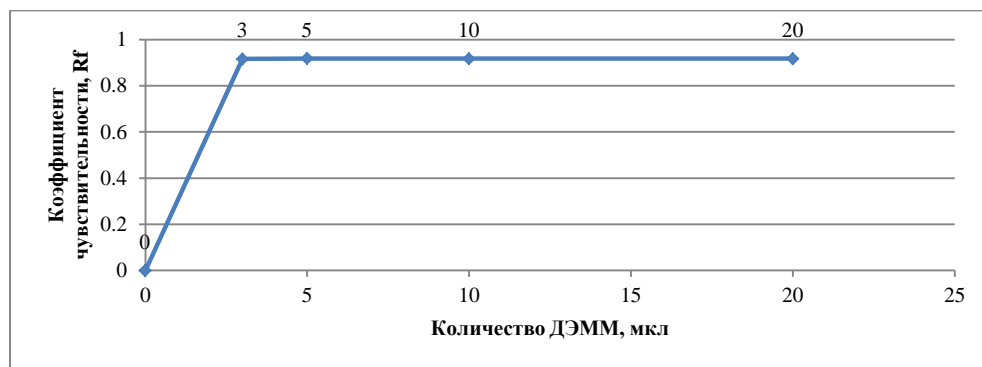


Рисунок 2. Влияние концентрации ДЭММ на дериватизацию аминокислот

Исходя из этого можно сделать вывод о том, что концентрация 3 мкл ДЭММ достаточна для дериватизации аминокислот. Кроме того, увеличение концентрации ДЭММ приводит к увеличению пика производного остатка в полученных хроматограммах исследуемых образцов.

С уменьшением концентрации боратного буфера pH среды переходит в слабощелочную среду, а далее к нейтральной среде, что значительно уменьшает коэффициент отклика (Рисунок 3).

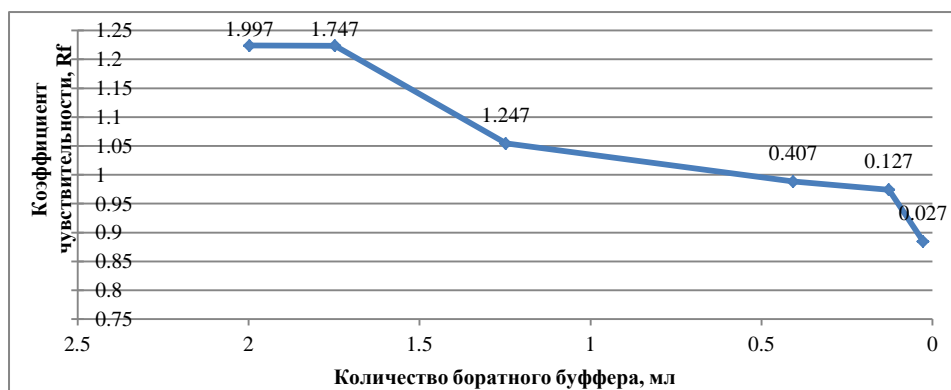


Рисунок 3. Влияние концентрации боратного буфера на дериватизацию аминокислот.

Как видно из рисунка 3 при количестве 1,747 мл боратного буфера коэффициент отклика достигает максимального значения и дальше уже не меняется, что показывает оптимальное количество боратного буфера необходимого для дериватизации.

Были получены хроматограммы стандартных растворов (Рисунок 4, а) и образцов молока (Рисунок 4, б).

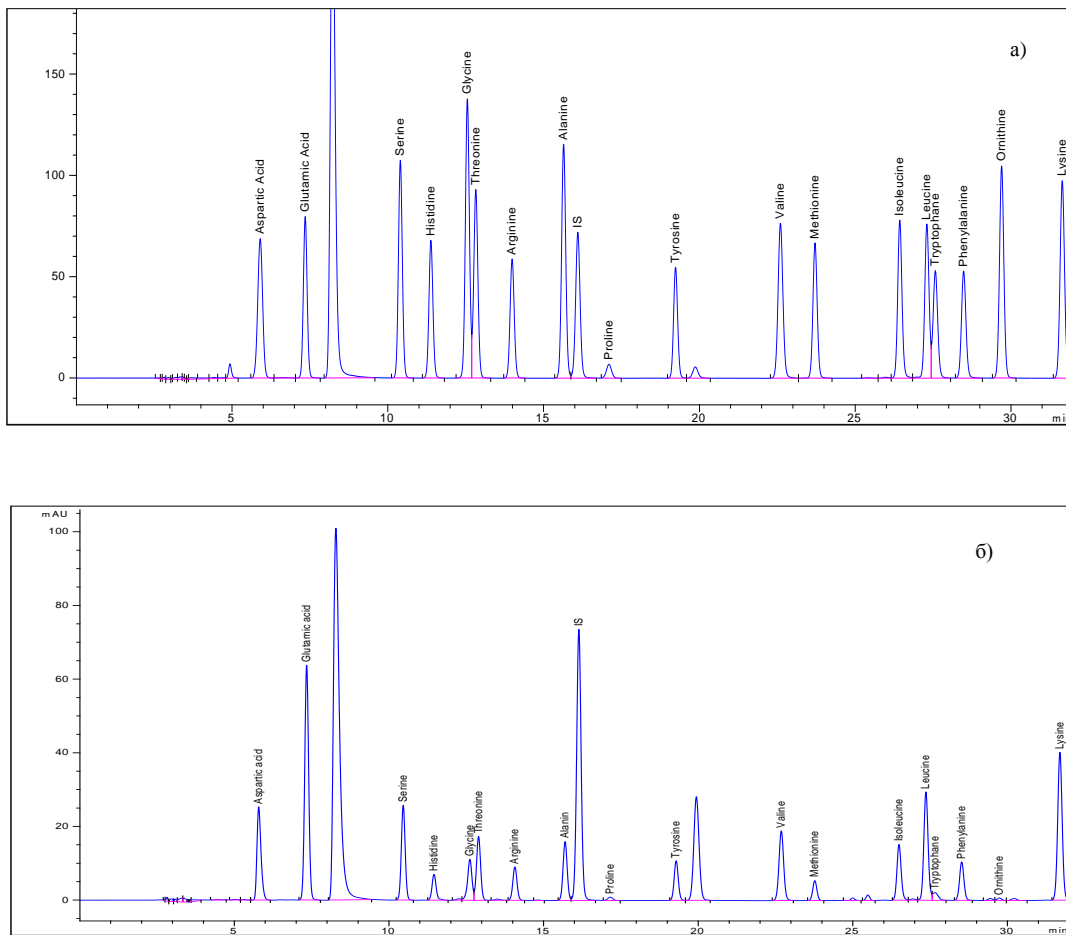


Рисунок 4. Хроматограмма стандартных растворов аминокислот (а) и аминокислот коровьего молока (б)

Полученная хроматограмма анализируемой смеси позволяет определить ее качественный и количественный состав. Качественной характеристикой определяемых веществ являются их времена удерживания. Сопоставление площадей или высот хроматографических пиков позволяет оценить количественный состав смеси. В хроматографии используют три основных метода количественного анализа: метод внутренней нормализации, внутреннего стандарта и абсолютной калибровки [16]. Применение последнего было использовано в данной работе (Рисунок 5).

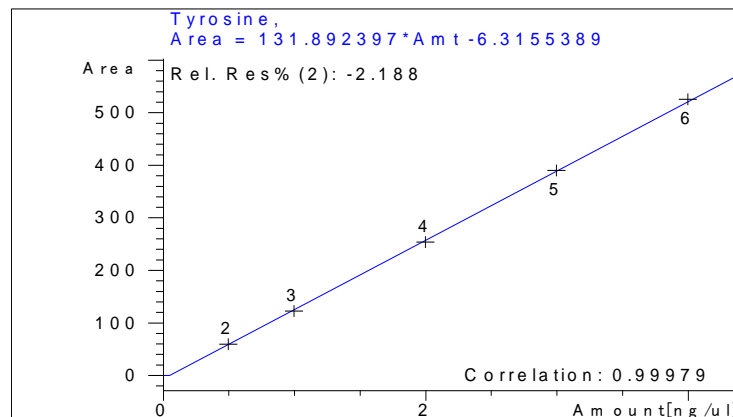


Рисунок 5. Калибровочная кривая для стандартного раствора тирозина

Количественная оценка достигалась с использованием калибровочных кривых, полученных из аминокислот известных концентраций. Использовалась простая линейная регрессия методом наименьших квадратов (Таблица 1).

Таблица 1. Параметры линейной регрессии стандартных растворов аминокислот.

Аминокислота	Линейное уравнение	Коэффициент корреляции, <i>r</i>
Аспарагиновая кислота	$y = 192,5x - 5,73$	0,998
Глутаминовая кислота	$y = 173,32x - 5,47$	0,998
Серин	$y = 242,09x - 7,25$	0,997
Аланин	$y = 278x - 14,92$	0,998
Аргинин	$y = 142,11x - 6,65$	0,997
Глицин	$y = 321,11x - 11,77$	0,998
Лейцин	$y = 191,39x - 10,36$	0,997
Изолейцин	$y = 195,66x - 6,94$	0,991
Лизин	$y = 254,71x - 3,03$	0,989
Метионин	$y = 165,98x - 9,72$	0,996
Орнитин	$y = 266,25x - 13,18$	0,997
Фенилаланин	$y = 138,54x - 8,41$	0,997
Треонин	$y = 221,76x - 9,93$	0,998
Триптофан	$y = 124,56x + 45,03$	0,997
Тирозин	$y = 131,89x - 6,32$	0,999
Валин	$y = 215,84x - 13,31$	0,997
Гистидин	$y = 156,53x - 8,24$	0,998
Пролин	$y = 19,186x - 4,19$	0,943

Стабильность калибровочной кривой была очень хорошей, коэффициенты уравнений калибровки оставались почти постоянными в течение нескольких месяцев.

Одним из следующих показателей валидации методики является – точность. Точность – это близость результатов испытаний, полученных аналитическим методом, к истинному значению. Точность обычно определяется одним из трех способов. Во-первых, точность может быть оценена путем анализа образца известной концентрации (эталонные материалы) и сравнения измеренного значения с истинным значением. Второй подход заключается в сравнении результатов испытаний с новым методом с результатами существующей альтернативной, хорошо охарактеризованной процедуры, которая как известно, является точной. Третий подход, основан на восстановлении известных количеств анализируемого вещества, путем добавления или “загрязнения” исследуемого образца. Уровни аналита в “загрязненных” образцах должны определяться с использованием той же процедуры количественного определения, которая будет использоваться в процедуре окончательного метода, затем вычисляются процентное восстановление [17].

Свободные аминокислоты окисляются при кислотном гидролизе, поэтому анализ восстановления для оценки точности может быть сделан только в этапе дериватизации. К

гидролизованному образцу добавляли известные количества стандартов, в двух разных концентрациях (С1 и С2) от ожидаемого среднего содержания аминокислот. Анализ проводили в трех повторностях. Расчет восстановления проводили определением количества “загрязненного” и “незагрязненного” образца с использованием уравнения (1):

$$R = \frac{C_{\text{загрязненный образец}} - C_{\text{образец}}}{C_{\text{загрязнение}}} * 100\% \quad (2)$$

Где, R – восстановление, $C_{\text{загрязненный образец}}$ – концентрация “загрязненного” образца, $C_{\text{образец}}$ – концентрация “незагрязненного” образца, $C_{\text{загрязнение}}$ – концентрация стандартной аминокислоты которая была добавлена в образец [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Средние показатели восстановления аминокислот варьировались от 87,5 до 107,1% кроме пролина (Таблица 2).

Таблица 2. Точность метода, оцененная методом восстановления аминокислот из коровьего молока, добавлением стандарта аминокислоты.

Аминокислота	Восстановление (С1)	Стд.откл .	Восстановление (С2)	Стд.откл .
Аспарагиновая кислота	97.5	1.6	100.7	1.0
Глутаминовая кислота	96.8	0.1	96.3	0.5
Серин	102.8	0.1	98.1	0.4
Гистидин	104.3	0.6	99.4	0.3
Глицин	100.6	0.1	97.6	0.6
Треонин	96.1	0.2	96.8	0.2
Аргинин	99.1	0.5	98.1	0.9
Аланин	103.9	0.1	95.5	0.2
Пролин	70.0	8.4	67.3	9.2
Тирозин	102.3	0.4	102.7	0.3
Валин	97.9	0.3	94.8	0.1
Метионин	92.6	0.3	96.5	0.8
Изолейцин	107.1	0.1	102.3	0.3
Лейцин	95.1	4.0	98.8	1.8
Триптофан	88.0	0.1	95.0	4.9
Фенилаланин	98.2	0.1	98.4	0.2
Орнитин	87.5	0.4	89.0	2.2
Лизин	95.8	1.1	92.8	0.8

Показатели восстановления пролина в обоих испытаниях были невысокими 70,0% и 67,3%, поскольку скорость реакции пролина с ДЭММ невысокая и нестабильная и зависит от многих факторов [11].

Результаты сравнительного изучения особенностей содержания аминокислот в молоке и соотношения незаменимых и заменимых аминокислот во вторую фазу лактации приведены в таблице 3.

Таблица 3. Аминокислотный состав коровьего молока.

Аминокислота	г/100г молока	Стд. отклонение	мг/г белка	Стд. отклонение
Аспарагиновая кислота	0.225	0.002	7.819	0.063
Глутаминовая кислота	0.624	0.000	21.718	0.016
Серин	0.177	0.000	6.157	0.003
Гистидин	0.081	0.001	2.833	0.023
Глицин	0.065	0.000	2.274	0.009
Треонин	0.139	0.000	4.851	0.008
Аргинин	0.119	0.000	4.142	0.012
Аланин	0.104	0.000	3.604	0.003
Пролин	0.039	0.010	1.356	0.347
Тирозин	0.135	0.000	4.694	0.005
Валин	0.184	0.000	6.402	0.009
Метионин	0.061	0.001	2.120	0.018
Изолейцин	0.144	0.000	4.997	0.015
Лейцин	0.299	0.009	10.410	0.298
Триптофан	0.016	0.015	0.571	0.510
Фенилаланин	0.149	0.000	5.200	0.012
Орнитин	0.005	0.000	0.169	0.002
Лизин	0.307	0.000	10.686	0.011
Сумма незаменимых аминокислот		1.435		49.93
Сумма заменимых аминокислот		1.439		50.07
Сумма всех аминокислот		2.874		100.00
Соотношение незаменимые/ заменяемые			1,003	

Из данных таблицы 3 видно, что из незаменимых аминокислот наибольшее количество в молоке коров составляют лизин (0,307 г/100г молока), лейцин (0,299 г/100г молока), валин (0,184 г/100г молока), ниже оказался уровень триптофана (0,016 г/100г молока). Из заменимых аминокислот наибольшая доля в составе белка молока коров принадлежит глутаминовой (0,624 г/100г молока) и аспарагиновой (0,225 г/100г молока) кислотам, а также серину (0,177 г/100г молока). полученные данные по содержанию незаменимой аминокислоты лизина превосходят данные приведенные в литературе [9, 18, 19], а содержание незаменимых аминокислот валин, изолейцин, лейцин выше чем результаты, сообщенные Csapo et al. [18].

Сумма незаменимых аминокислот почти 50%, а соотношение количества незаменимых к заменимым равно к одному, что показывает высокую биологическую ценность исследуемого образца.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод определения аминокислот в молоке обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией позволил полное разделение 18 основных аминокислот и их количественное содержание. Переметры валидации методики соответствуют данным

приведенных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), Фармакопеей США (USP) и Международной конференции по гармонизации (ICH) [16]. Полученные результаты соответствуют данным приведенных в литературе [9], что доказывает применимость метода. Таким образом, можно сделать вывод о том, что дериватизация диэтил этоксиметиленмалонатом делает возможным определение аминокислот белков молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baranovsky A. Yu. Dietology. 4 th ed. Publishing house "Peter". 2013. (in Russian)
2. Böcker Yu. Chromatography. Instrumental analytics: methods of chromatography and capillary electrophoresis. Litres. (2017). (in Russian)
3. Kharitonov Yu. Ya., Dzhaharov D. N. and Grigorieva V. Yu. Analytical chemistry. Quantitative analysis, physicochemical methods of analysis: practical: textbook: [for universities on specialty 060301.65 "Pharmacy"]. GEOTAR-Media. (2012). (in Russian)
4. Rudenko A. O., Kartsova L. A. and Snarskii S. I. "Determination of the most important amino acids in complex objects of biological origin by reversed-phase HPLC with obtaining phenylthiohydantoin of amino acids". Sorption and chromatographic processes, 10 (2), 223-230. (2010). (in Russian)
5. Bosch L., Alegria A., Farré R. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. Journal of Chromatography B. 831(1) (2006): 176-83.
6. Davis T.A., Nguyen H.V., Garcia-Bravo R., Fiorotto M.L., Jackson E.M., Reeds P.J.. Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. British journal of nutrition. 72(06) (1994): 845-53.
7. Marino R., Iammarino M., Santillo A., Muscarella M., Caroprese M., Albenzio M. Technical note: Rapid method for determination of amino acids in milk. Journal of dairy science. 93(6) (2010):2367-70.
8. Rubio-Barroso S., Santos-Delgado M.J., Martin-Oliver C., Polo-Díez L.M. Indirect chiral HPLC determination and fluorimetric detection of D-amino acids in milk and oyster samples. Journal of dairy science. 89(1) (2006):82-9.
9. Rebane R., Herodes K. A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenmalonate: Application to the honey analysis. Analytica chimica acta. 672(1) (2010): 79-84.
10. Barashkin M. I. "Amino acid composition of milk of cows of black and motley type of breed "Uralsky", depending on lactation phase". Agrarian Bulletin of the Urals 8 (100) (2012): 22-24. (in Russian)
11. Gorbatoва K. K., and Gunkova P. I. Biochemistry of milk and dairy products. GIORД. (2010). (in Russian)
12. Rebane R, Oldekop ML, Herodes K. Comparison of amino acid derivatization reagents for LC-ESI-MS analysis. Introducing a novel phosphazene-based derivatization reagent. Journal of Chromatography B. 904(2012):99-106.
13. Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD. Free amino acid composition and botanical origin of honey. Food Chemistry. 83(2) (2003): 263-8.

14. Lebedev A. Mass spectrometry for the analysis of environmental objects. Litres. (2017). (in Russian).
15. Mazhitova AT, Kulmyrzaev AA. Determination of amino acid profile of mare milk produced in the highlands of the Kyrgyz Republic during the milking season. Journal of dairy science. 99(4) (2016): 2480-7.
16. Shapovalova E. N. and Pirogov A. V. Chromatographic methods of analysis. Methodical manual for a special course. Moscow: Moscow State University Press. (2007). (in Russian)
17. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. Journal of chromatography A. 987(1) (2003): 57-66.
18. Csapó J, Salamon S, Lóki K, Csapó-Kiss Z. Composition of mare's colostrum and milk II. Protein content, amino acid composition and contents of macro-and micro-elements. Acta Univ. Sapient. Ser. Aliment.2(1) (2009): 133-48.
19. Skurikhin I. M. and Volgarev M. N. Chemical composition of food products. Ripol Classic, (1987) (in Russian)