



УДК 543.544

Определение аминокислот в сухом экстракте мозга коров, пробах мяса телят и кур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Захарова А.М., Гринштейн И.Л.

ООО «Аналит», Санкт-Петербург

Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 3.07.2012 г.

Аннотация

Методом ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием исследовано содержание общих аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой, гидроксипролина, серина, глицина, гистидина, аргинина, треонина, аланина, пролина, тирозина, валина, изолейцина, лейцина, фенилаланина, лизина) в пробах сухого экстракта мозга коров, мяса кур-несушек и содержание свободных и общих аминокислот в мясе телят. При определении общих аминокислот проводили кислотный гидролиз белков 6 N раствором соляной кислоты. Свободные аминокислоты экстрагировали из образцов этанолом. Для спектрофотометрической регистрации аминокислот проводили их дериватизацию фенилизотиоцианатом. Хроматографическое разделение фенилтиокарбаматных производных проводили на колонке с обращенной фазой в режиме градиентного элюирования.

Ключевые слова: ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, аминокислоты, сухой экстракт мозга коров, мясо телят и кур.

Determination of total amino acids in dry extract of cow brain, chicken meat and free and total amino acids in cow meat was investigated. The method allows quantitative determination of glutamic acid, asparaginic acid, hydroxyproline, serine, glycine, histidine, arginine, thryanine, alanine, praline, thyrasine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine.

Hydrolysis of protein is necessary for analysis of total amino acid composition of samples. Acid hydrolysis 6 N hydrochloric acid was used. Nitrogen was introduced in the headspace of the reaction vessel for prevent the oxidations of amino acids during hydrolysis. Free amino acids were extracted by ethanol. Precolumn derivatization of amino acids with phenylisothiocyanate (PITC) was applied. HPLC separation of the derivatives was performed using an ODS column with gradient mobile phase system and UV detector (254 nm).

Keywords: RP HPLC with spectrofotometric detection, amino acids, dry extract of cow brain, cow and chicken meat

Введение

Анализ аминокислотного состава мяса – важная аналитическая задача. Аминокислоты в мясе могут находиться как в свободном, так и в связанном состоянии.

Количественное содержание аминокислот в организме может служить показателем различных патологических состояний. Для лечения и профилактики различных заболеваний современное здравоохранение использует препараты, представляющие собой очищенные аминокислоты, пептиды или белки. Как правило, они изготавливаются из органов животных. Контроль качества сырья для изготовления подобных фармацевтических препаратов – также актуальная аналитическая задача.

Свободные аминокислоты выделяют из образцов с помощью экстракции. Для разложения белков наиболее часто используется кислотный гидролиз 6 М соляной кислотой [1, 2, 3].

Традиционные методы определения этих аналитов - хроматографические [4], спектрофотометрические [5], электрохимические [6]. Наибольшее распространение для разделения и количественного определения аминокислот получил метод жидкостной хроматографии [7].

Отсутствие хромофорных групп в большинстве молекул аминокислот требует стадии дериватизации для их определения при использовании оптических детекторов. Наиболее распространенные способы ВЭЖХ определения аминокислот - катионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией [8] и обращенно-фазовая хроматография - с предколоночной. В случае предколоночной дериватизации наиболее часто используют *o*-фталевый альдегид [9], фенилизотиоцианат [10], дансилхлорид [11], 9-флуоренилметилхлорформиат [12], нафталиндальдегид и др. В системах с постколоночной дериватизацией обычно применяют *o*-фталевый альдегид и нингидрин [13].

Получение предколоночных дериватов аминокислот с фенилизотиоцианатом (ФИТЦ) имеет ряд преимуществ перед другими производными: в реакцию вступают все важнейшие аминокислоты; реакция проходит количественно и за короткое время с получением стабильных производных; побочные продукты, мешающие определению фенилтиокарбаматных производных аминокислот, не образуются. Использование для детектирования спектрофотометрического детектора, наиболее распространенного детектора в системах жидкостного хроматографа, делает метод общедоступным.

Объектом нашего исследования явились различные образцы мяса: мясо телят, подвергнутое воздействию различной температуры: парное, охлажденное до температуры +4°C; замороженное до - 18°C и - 35°C, а также парное мясо кур-несушек.

Кроме того, нами проведены специальные эксперименты по определению содержания аминокислот в сухом экстракте мозга коров.

Эксперимент

Аппаратура. Анализ дериватов аминокислот проводили на жидкостном хроматографе LC-20 Prominace производства фирмы Shimadzu со спектрофотометрическим детектором (254 нм); колонка с обращенной неподвижной фазой C18 (Supelco 250 x 4,6 мм, 5 мкм, производства фирмы Supelco) и соответствующей предколоночкой; подвижная фаза – смесь 6 мМ раствора ацетата натрия, рН=5,5 (компонент А), 1%-ный раствор изопропилового спирта в ацетонитриле (компонент В) и 6 мМ раствор ацетата натрия рН=4,05 (компонент С).

Хроматографический анализ проводили в режиме градиентного элюирования. Скорость потока подвижной фазы – 1,2 мл/мин.

Реагенты. Стандартные образцы аминокислот (Sigma), фенилизотиоцианат (Fluka), ацетонитрил (о.с.ч., Криохром, изопропиловый спирт, ацетат натрия (х.ч.), соляная кислота (х.ч.), гидроксид натрия (о.с.ч.).

Методика выполнения эксперимента. Навески стандартных образцов растворяли в 1 М растворе соляной кислоты. Аликвоты стандартного раствора 15, 25, 50, 100 и 150 мкл помещали в пять пробирок.

Для удаления соляной кислоты аликвоты высушивали досуха на водяной бане при температуре 60°C в токе воздуха, поступающем через капилляр при разряжении, создаваемом электрическим вакуумным насосом. К высушенным аминокислотам добавляли 0,10 мл 0,15 М раствора гидроксида натрия, перемешивали, а затем добавляли 0,35 мл раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте и 0,05 мл бидистиллированной воды.

Раствор тщательно перемешивали и оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего высушивали досуха при температуре 60° С. Сухой остаток растворяли в 1 мл бидистиллированной воды. Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу (Рис.1)

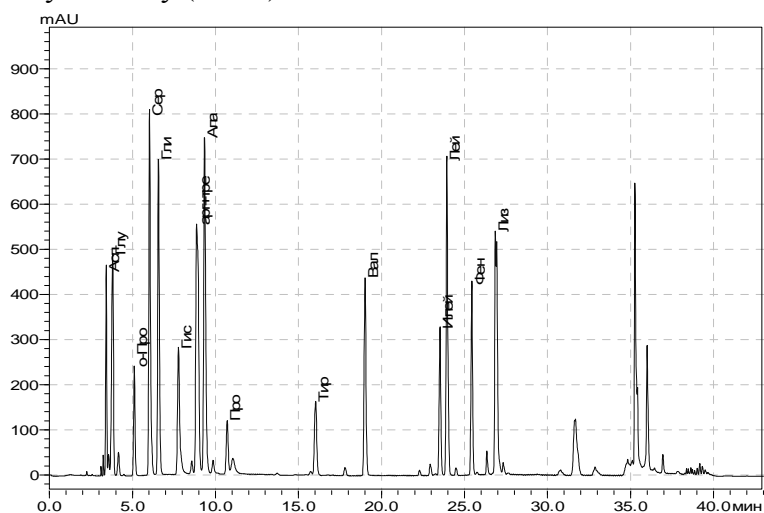


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот после дериватизации ФИТЦ

Условия хроматографического анализа: жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 254$ нм), колонка Supelco C18 250 x 4,6 мм, 5 мкм, элюент: ацетатный буфер – смесь ацетонитрила с изопропиловым спиртом, режим градиентного элюирования

Пробоподготовка образцов сухого экстракта мозга коров, мяса телят и кур-несушек для определения общего количества аминокислот включала кислотный гидролиз 6 М раствором соляной кислоты при 110°C в течение 16-18 ч.

Навески образцов (~ 0,2 г) помещали в виалы, снабженные герметично закупоривающимися крышками, заливали раствором соляной кислоты. Для предотвращения окисления аминокислот кислородом воздуха, продували паровую фазу в течение 3 мин азотом, затем плотно закрывали виалы крышками.

После охлаждения гидролизаты фильтровали, отбирали аликвоты (0,2-0,3 мл) и помещали их в пробирку. Высушивали досуха на водяной бане при температуре 60°C в токе воздуха аналогично стандартным растворам. К высушенным аликвотам добавляли 0,10 мл 0,15 М раствора гидроксида натрия, перемешивали. Затем прибавляли 0,35 мл раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте и 0,05 мл бидистиллированной воды.

Раствор вновь тщательно перемешивали и оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего высушивали досуха при температуре 65°C. Сухой остаток растворяли в 1 мл бидистиллированной воды. Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу.

Для определения свободных аминокислот в образцах мяса телят, образцы измельчали блендаром, 5 г образца помещали в стеклянный стаканчик, заливали 50 мл этилового спирта, перемешивали с помощью магнитной мешалки и отфильтровывали небольшое количество жидкости через мембранный фильтр. Аликвоты (0,2 мл) отбирали, помещали в пробирку и высушивали досуха на водяной бане при температуре 60°C в токе воздуха. Затем проводили дериватизацию ФИТЦ, высушивали и растворяли в 1 мл воды аналогично стандартным растворам и растворам после кислотного гидролиза. Полученные образцы подвергали хроматографическому анализу.

Обсуждение результатов

На растворах стандартных образцов оптимизировали условия хроматографического разделения производных аминокислот. Установлено, что полному разделению аналитов способствует аминокислот обеспечивается уменьшение pH подвижной фазы, т.е. переход от ацетатного буфера с pH 5,5 к буферу с более низким значением (pH 4,05). Предложена процедура кислотного гидролиза (6М раствор HCl) для определения общего количества аминокислот и жидкостной экстракции этанолом аналитов из образцов мяса при определении свободных аминокислот.

Результаты количественного анализа свободных аминокислот и общего их содержания представлены в табл. 1-2.

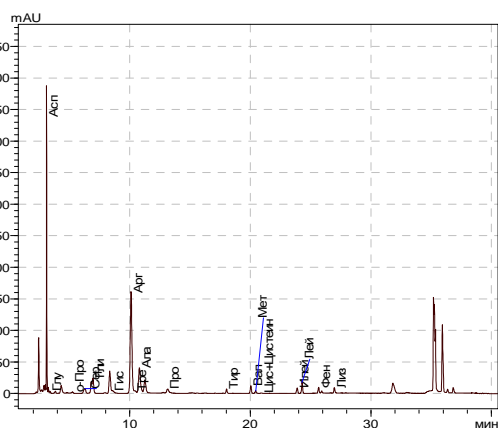


Рис. 2. Хроматограмма пробы телятины охлажденной; определение свободных аминокислот.

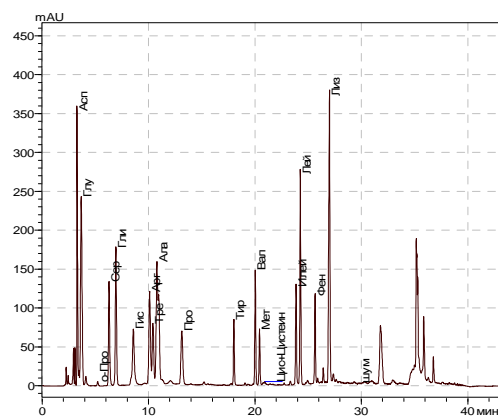


Рис. 3. Хроматограмма пробы телятины охлажденной; определение общего содержания аминокислот

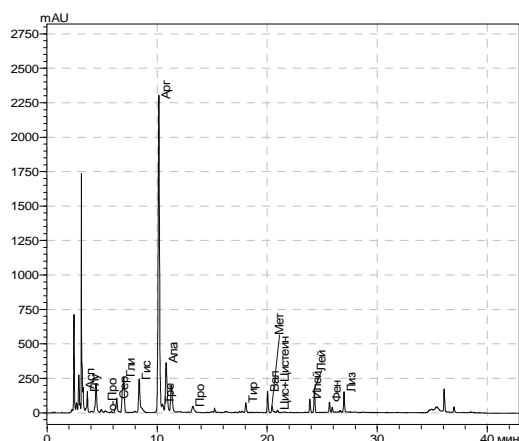


Рис. 4. Хроматограмма пробы телятины после заморозки до -18°C , свободные аминокислоты

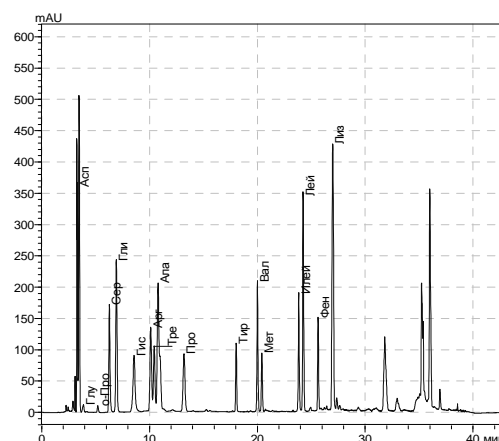


Рис. 5. Хроматограмма пробы телятины после заморозки до -18°C , общие аминокислоты

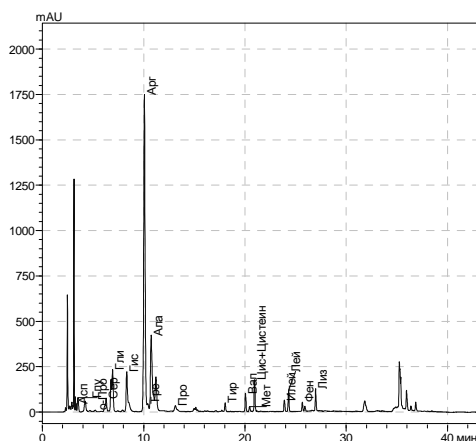


Рис. 6. Хроматограмма пробы телятины после заморозки до -35°C ; определение свободных аминокислот

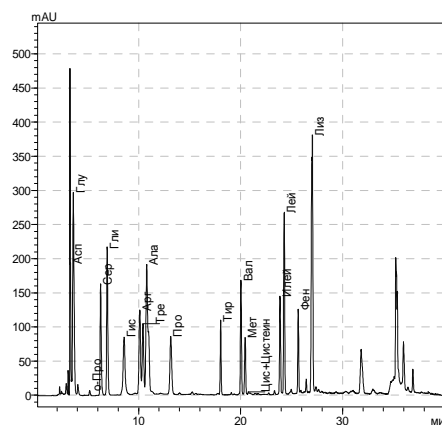


Рис. 7. Хроматограмма пробы телятины после заморозки до -35°C ; определение общего содержания аминокислот

Условия хроматографического анализа: жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 254 \text{ нм}$), колонка Supelco C18 250 x 4,6 мм, 5 мкм; элюент: ацетатный буфер – смесь ацетонитрила с изопропиловым спиртом; режим градиентного элюирования

Таблица 1. Содержание свободных аминокислот в мясе телят ($n=3$)

Аминокислота	Массовая доля, г/кг		
	Заморозка -35°C	Заморозка -18°C	Охлажденное мясо
1	2	3	4
Аспаргиновая кислота + аспарагин (Асп)	0.28 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.49 ± 0.04
Глутаминовая кислота + глутамин (Глу)	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.46 ± 0.04
Гидроксипролин (О-Про)	0.09 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Серин (Сер)	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Глицин (Гли)	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.03
Гистидин (Гис)	0.21 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.28 ± 0.03
Аргинин (Арг)	2.25 ± 0.20	2.91 ± 0.20	2.11 ± 0.20

(продолжение табл. 1)

1	2	3	4
Треонин (Тре)	0.11±0.01	0.14±0.02	0.06±0.01
Аланин (Ала)	0.45±0.04	0.33±0.03	0.21±0.03
Пролин (Про)	0.04±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01
Тирозин (Тир)	0.05±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01
Валин (Вал)	0.08±0.01	0.09±0.01	0.05±0.01
Изолейцин (Иле)	0.05±0.01	0.06±0.01	0.03±0.01
Лейцин (Лей)	0.09±0.01	0.12±0.02	0.06±0.01
Фенилаланин (Фен)	0.04±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01
Лизин (Лиз)	0.12±0.02	0.14±0.02	0.04±0.01

Таблица 2. Общее содержание аминокислот в мясе телят (n=3)

Аминокислота, сокращенное наименование	Массовая доля, г/кг		
	Заморозка - 35°C	Заморозка -18°C	Охлажденное мясо
Аспаргиновая кислота + аспарагин (Асп)	16.2±0.9	14.2±0.8	12.8±0.8
Глутаминовая кислота + глутамин (Глу)	14.1±0.8	12.2±0.8	8.2±0.5
Гидроксипролин (О-Про)	0.71±0.03	0.73±0.03	0.24±0.01
Серин (Сер)	13.4±0.8	15.9±0.9	13.5±0.8
Глицин (Гли)	11.7±0.8	13.4±0.8	10.2±0.5
Гистидин (Гис)	15.6±0.9	20.8±1.3	19.0±1.2
Аргинин (Арг)	14.5±0.8	17.5±1.1	13.2±0.8
Треонин (Тре)	20.1±1.2	24.1±1.4	14.1±0.8
Аланин (Ала)	14.9±0.8	18.7±1.1	10.4±0.8
Пролин (Про)	8.6±0.5	9.2±0.5	6.9±0.6
Тирозин (Тир)	9.5±0.5	10.6±0.8	8.0±0.5
Валин (Вал)	10.6±0.8	12.7±0.8	9.6±0.5
Изолейцин (Иле)	9.3±0.6	11.1±0.8	8.3±0.5
Лейцин (Лей)	20.2±1.2	23.6±1.4	17.3±1.0
Фенилаланин (Фен)	10.1±0.6	11.2±0.6	8.2±0.5
Лизин (Лиз)	22.1±1.3	29.4±1.8	20.7±1.3

Результаты количественного анализа аминокислот в сухом экстракте мозга коров и мясе кур-несушек представлены в табл. 3.

Таблица 3. Содержание общих аминокислот в сухом экстракте мозга коров и мясе кур-несушек (n=3)

Аминокислота	Массовая доля, г/кг	
	Сухой экстракт мозга коров	Мясо кур- несушек
1	2	3
Аспаргиновая кислота + аспарагин (Асп)	1.95±0.11	21.1±1.2
Глутаминовая кислота + глутамин (Глу)	1.16±0.11	37.1±2.1

(продолжение табл. 3)

1	2	3
Гидроксипролин (О-Про)	7.26±0.44	0.80±0.08
Серин (Сер)	0.41±0.05	8.4±0.4
Глицин (Гли)	2.07±0.12	8.8±0.4
Гистидин (Гис)	0.62±0.05	10.1±0.5
Аргинин (Арг)	0.94±0.09	1.30±0.09
Треонин (Тре)	1.13±0.09	9.00±0.5
Аланин (Ала)	0.93±0.09	11.4±0.6
Пролин (Про)	10.0±0.60	7.4±0.4
Тирозин (Тир)	0.38±0.04	5.5±0.3
Валин (Вал)	0.26±0.03	8.1±0.4
Изолейцин (Иле)	0.21±0.03	8.7±0.4
Лейцин (Лей)	0.59±0.07	15.3±0.8
Фенилаланин (Фен)	0.96±0.09	7.9±0.4
Лизин (Лиз)	0.51±0.05	23.8±1.4

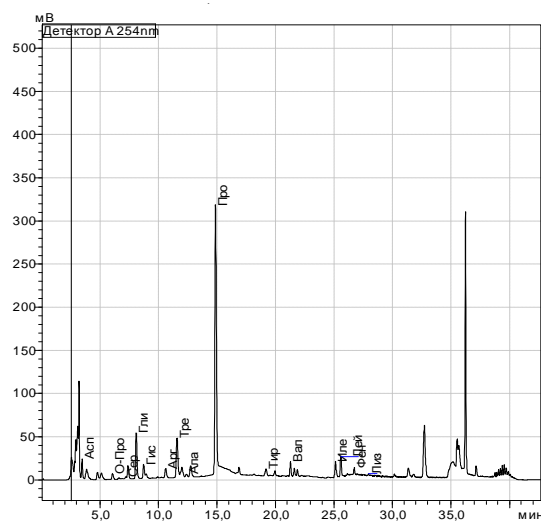


Рис. 8. Хроматограмма пробы сухого экстракта мозга коров, общие аминокислоты

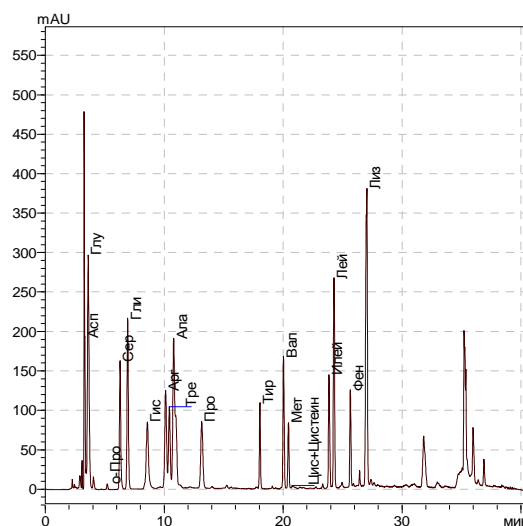


Рис. 9. Хроматограмма пробы мяса кур-несушек, общие аминокислоты

При определении общего количества аминокислот были оценены пределы обнаружения (табл. 4)

Таблица 4. Пределы обнаружения при определении общего количества аминокислот

Аминокислота	Предел обнаружения (мг/мл·10 ⁻⁴)	Аминокислота	Предел обнаружения (мг/мл·10 ⁻⁴)
1	2	3	4
Аспаргиновая кислота	10.4	Аланин	1.5
Глутаминовая кислота	6.1	Пролин	1.5
Гидроксипролин	1.7	Тирозин	2.8

(продолжение табл. 4)

1	2	3	4
Серин	2.3	Валин	1.8
Глицин	1.2	Изолейцин	1.8
Гистидин	2.9	Лейцин	1.9
Аргинин	2.4	Фенилаланин	2.4
Треонин	10.4	Лизин	1.5

Заключение

Методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием ($\lambda = 254$ нм, $T = 55^{\circ}\text{C}$, градиентный режим элюирования) предложен способ количественного определения свободных аминокислот и их общего содержания в образцах мяса телятины, кур-несушек и сухого экстракта мозга коров. Пробоподготовка включала проведение кислотного гидролиза 6 М раствором HCl при определении общего содержания аминокислот и экстракцию этанолом при определении свободных аминокислот с последующей дериватизацией фенилизотиоцианатом.

Список литературы

1. Adebisi A.P., Dong-Hao Jin, Ogawa T., Muramoto K. Acid Hydrolysis of protein in a micricapillary tubes// Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005, V. 69(1), P. 255-257.
2. Fountoulakis, Hans-Werner Lahm, Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins// J. Chromatography A. 1998, V. 826, P. 109-134.
3. Tsugita A., Scheffler J-J. A Rapid Method for Acid Hydrolysis of Protein with a Mixture of Trifluoroacetic Acid and Hydrochloric Acid// Eur. J. Biochem. 1982, V. 124, P. 585-588.
4. Bueno-Solano C., Lopez-Cervantes J.. HPLC Determination of Histamine, Tyramine and Amino Acids in Shrimp By-Products// J. Braz.Chem. Soc. 2012, V.23, No 1, 96-102.
5. Государственная Фармакопея, XII редакция.
6. Чернобровкин М.Г., Шунина М.В., Ананьева И.А. и др. Определение аминокислот в лекарственных препаратах методом обращено-фазовой ВЭЖХ с амперометрическим детектированием// «Заводская лаборатория. Диагностика материалов» 2007, № 4, Том 73, С. 23-28.
7. Japanese Pharmacopea, Fifteenth Edition, 2006, Amino Acid Analysis, P. 1814-1822.
8. Pickering M.V., Ofitserova M. On the Persistence of Cation-exchange Chromatography for Analysis of Free Amino Acids// Materials of Pickering Laboratories Incorporated
9. Brent L., Frederick W. A Method for Quantitative Amino Acid Analysis Using Precolumn o-Phthalaldehyde Derivatization and High Performance Liquid Chromatography// J. Chromatographic Science 1981, V. 19 (5), P. 259-265.
10. Tatar E., Khalifa M., Zaray E., GMalnar-Perl I. Comparison of the recovery of amino acids in vapor-phase hydrolysates of proteins performed in a Pico Tag workstation and in a microwave hydrolysis system// J. of Chromatography A 1994, V. 672, P. 109-115.
11. Kang X., Xiao J., Huang X., Gu Z. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples// Clinica Chimica Acta 2006, V. 366, P. 352 – 356.

12. Zhou W., Zhang Xiao-Yan, Duan Geng-Li Liquid-Chromatography Quantitative Analysis of 20 Amino acids after Derivatization with FMOC-Cl and Its Application to Different Origin Radixidis isatidis// J. Chinese Chemical Society 2011, V. 58, P. 509-515.

13. Другов Ю.С., Родин А.А. Пробоподготовка в экологическом анализе// Санкт-Петербург, «Анатолия», 2002. — 755 с.

Карцова Людмила Алексеевна - д.х.н. профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, С-Петербург, тел. (812) 428-40-44

Гринштейн Илья Львович – к.х.н. руководитель группы компаний «АНАЛИТ», член Научного Совета РАН по аналитической химии, С-Петербург, тел. (812) 325-55-02

Захарова Анна Михайловна - аспирант кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного университета, инженер-химик лаборатории ООО «Аналит Продактс», С-Петербург

Kartsova Ludmila A. - Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg, e-mail: kartsova@gmail.com

Grinshein Ilya L. - Cand.Sc. Chem., head of the Analit group, member of RAS Analytical Chemistry Scientific Committee, St. Petersburg

Zaharova Anna M. - the post-graduate student of analytical chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, engineer of Analytical Laboratory Analyt Ltd St. Petersburg, , St. Petersburg, e-mail: za@analit-spb.ru