

Существующие проблемы и пути их решения при анализе аминокислотного состава

Артём П. Санжеев	¹	a.sanzheev@sevko.net
Александра А. Михина	¹	mikhina@sevko.net
Дарья А. Севко	¹	daria@sevko.net
Александр В. Севко	¹	alexander@sevko.net
Сергей Б. Ворожейкин	²	deliverer@mail.ru
Екатерина П. Анохина	³	katya_anoh@mail.ru
Алиса А. Коротаева	³	alisa-korotaeva@mail.ru

¹ НПК «Sevko&Co», г. Москва, Россия² Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова, г. Элиста, Россия³ Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, Россия

Аннотация. При анализе белковых препаратов для получения точных результатов анализа содержания аминокислот необходимо уделять внимание как выбору метода анализа аналитов, так и методу пробоподготовки образцов. В настоящее время известно несколько основных подходов для решения такой задачи: кислотный и щелочной гидролиз. В данной статье проведено сравнение методов анализа аминокислот с их пред- и постколоночной дериватизацией на примере определения содержания лизина в образцах сульфата лизина с известным содержанием целевого вещества. Для предколоночной дериватизации использовали ортофталевый ангидрид, и нингидрин для постколоночной дериватизации. Экспериментально нами было показано преимущество использования постколоночной дериватизации, т.к. были получены более точные результаты. Хроматографическое разделение, дериватизацию и детектирование выполняли на аминокислотных анализаторах фирм Hitachi (Япония) и Sykam (Германия). Далее были рассмотрены виды пробоподготовки белковых и пептидных препаратов с последующим определением в них валина и треонина методом постколоночной дериватизации. Изучено влияние метода доведения pH до 2.2 после кислотного гидролиза. Добавление щелочи к жидкому образцу показало лучшие результаты, чем метод упаривания и перерастворения образца в буфере с соответствующим pH. В итоге, для анализа исследуемых препаратов был выбран оптимальный подход для определения аминокислот в гидролизатах белков. Полученные данные сравнивали с данными, полученными в европейской аккредитованной лаборатории.

Ключевые слова: аминокислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, капиллярный электрофорез, аминокислотный анализ, кислотный гидролиз

Existing problems and ways of their solution in the analysis of amino acid composition

Artem P. Sanzheev	¹	a.sanzheev@sevko.net
Aleksandra A. Mikhina	¹	mikhina@sevko.net
Daria A. Sevko	¹	daria@sevko.net
Alexander V. Sevko	¹	alexander@sevko.net
Sergey B. Vorozheykin	²	deliverer@mail.ru
Ekaterina P. Anokhina	³	katya_anoh@mail.ru
Alisa A. Korotaeva	³	alisa-korotaeva@mail.ru

¹ Research and development "Sevko&Co", Moscow, Russia, 117246, Nayechniy proezd, 20-9² Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov, Elista, Russia³ Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

Abstract. For obtain accurate aminoacids analysis results for peptide samples it is need to pay attention for method of analysis and method of sample preparation. Now some samplepreparation methods are known: acid and basic hydrolysis. In this article the comparison of two methods of aminoacids analysis were observed: pre-column or post-column derivatization. Analysis of lysine in lysine sulphate was studied, results were compared with control samples. For pre-column derivatization o-phthalic anhydride was used, and for post-column derivatization ninhydrin reagent was used. In experimental part advantages of post-column derivatization was shown and more accurate results were obtained. Chromatographic separation, derivatization and detection were carried out on aminoacids analisators Hitachi (Japan) и Sykam (Germany). Samplepreparation methods were observed on valine and threonine analysis using postcolumn derivatization with ninhydrin reagent. The effect of pH adjustment after acid hydrolysis was studied. Basic solution addition best results in comparison with sample evaporation and reconstitution were shown. For final sample analysis optimal methods of analysis and samplepreparation were chosen. Results were compared with results of European Accredited Laboratory.

Keywords: amino acids, high-efficiency liquid chromatography, ion-exchange chromatography, capillary electrophoresis, amino acid analysis, acid hydrolysis Amino acids, high-efficiency liquid chromatography, ion-exchange chromatography, capillary electrophoresis, amino acid analysis, acid hydrolysis

Для цитирования

Санжеев А.П., Михина А.А., Севко Д.А., Севко А.В., Ворожейкин С.В., Анохина Е.П., Коротаева А.А. Существующие проблемы и пути их решения при анализе аминокислотного состава // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 4. С. 185–189. doi:10.20914/2310-1202-2018-4-185-189

For citation

Sanzheev A.P., Mikhina A.A., Sevko D.A., Sevko A.V., Vorozheykin S.V., Anokhina E.P., Korotaeva A.A. Existing problems and ways of their solution in the analysis of amino acid composition. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2018. vol. 80. no. 4. pp. 185–189. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2018-4-185-189

Введение

Аминокислоты играют огромную роль в процессах жизнедеятельности живых организмов, являясь структурной единицей белков. Они отвечают за транспорт и хранение питательных веществ, функционирование и восстановление различных тканей, в том числе мышц, костей, волос. В природе обнаружено уже более 700 аминокислот, 21 из них протеиногенная, то есть кодируется генетическим кодом.

Анализ аминокислот важен для различных областей: пищевой промышленности, производства лекарств, клинических анализов и т. д. Среди большого числа разработанных подходов (тонкослойная, ионообменная, газовая хроматография) наиболее чувствительными являются методики, основанные на хроматографическом разделении целевых аналитов с использованием различных видов дериватизации: пред- и постколоночной. Использование дериватизирующих агентов позволяет решить проблемы, возникающие при их хроматографическом разделении:

- высокая полярность молекул аминокислот за счет наличия карбоксильной и аминогрупп не позволяет разделить их хроматографически без использования ионообменных неподвижных фаз;
- низкие коэффициенты поглощения аминокислот в ультрафиолетовой области [1]

затрудняют их детектирование и не позволяют достичь низких пределов обнаружения.

При предколоночной дериватизации используют ортофталевый ангидрид (рисунок 1), а дериватизаты после ВЭЖХ-разделения детектируют с использованием УФ-детектора. Недостатком этого метода является наблюдаемое в ряде случаев разложение дериватизатов до завершения анализа.

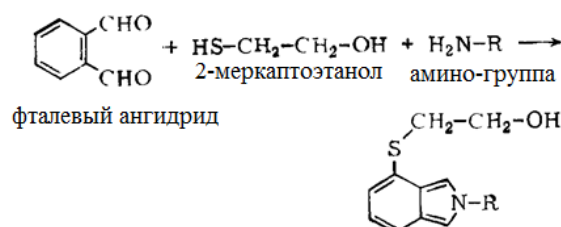
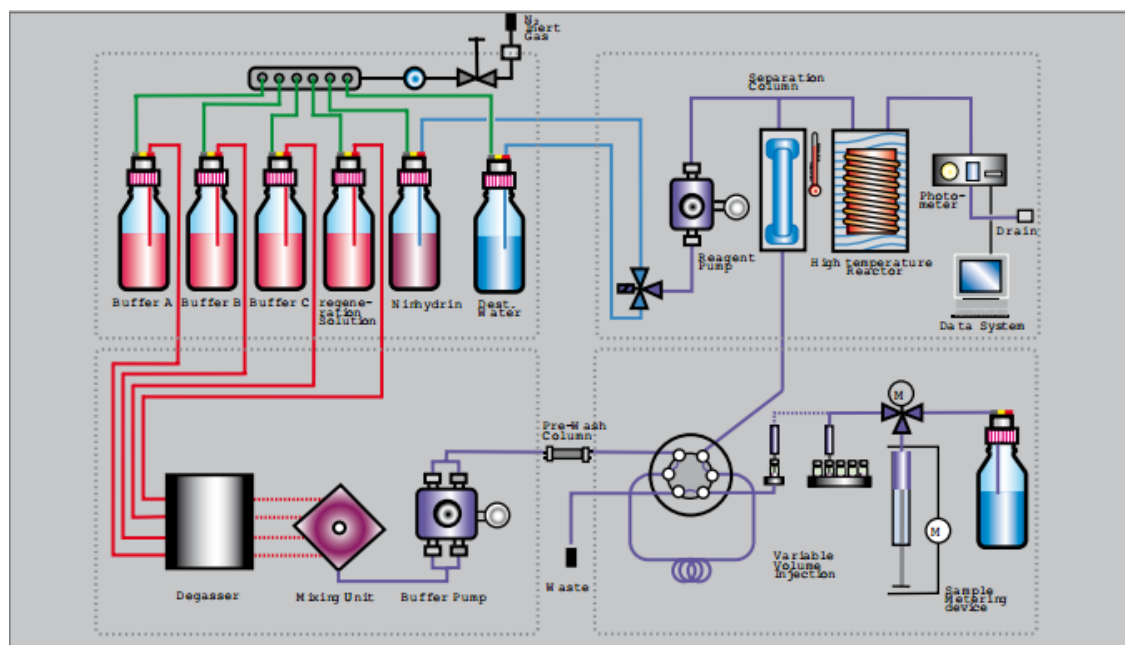


Рисунок 1. Реакция фталевого ангидрида с аминогруппой аминокислот

Figure 1. The reaction of the phthalic anhydride with amino acid group

При постколоночной дериватизации в качестве реагента используют нингидрин (рисунок 2), позволяющий получить стабильные дериватизаты после разделения аминокислот на ионообменной колонке. Дериватизаты при этом детектируются спектрофотометрически.



Flow Diagram S 433

Рисунок 2. Постколоночная дериватизация аминокислот нингидрином

Figure 2. Post-column ninhydrin derivatization of aminoacids

Для анализа на аминокислотный состав белковых и пептидных препаратов важным является выбор пробоподготовки, необходимо

сначала провести исчерпывающий гидролиз этих полимеров до отдельных аминокислот и учесть при этом все возможные потери.

Стандартная процедура разложения белка до аминокислот – кислотный гидролиз (6М раствор соляной кислоты при температуре 110 °С [1–6]) – позволяет в дальнейшем определить все аминокислоты, кроме серосодержащих (цистеин и метионин).

Серосодержащие аминокислоты при кислотном гидролизе частично разлагаются, поэтому для точного определения их количества в пробе необходимо предварительно перевести их в стабильные соединения (рисунок 3) – цистеиновую кислоту и метионинсульфон соответственно. Для этого проводят окисление указанных аминокислот путем охлаждения (0 – 5 °С) с надмуравьиной кислотой в течение 18 ч. Далее уже можно проводить кислотный гидролиз и количественное определение цистеиновой кислоты и метионинсульфона с последующим пересчетом на исходные аминокислоты [1, 2, 5, 6].

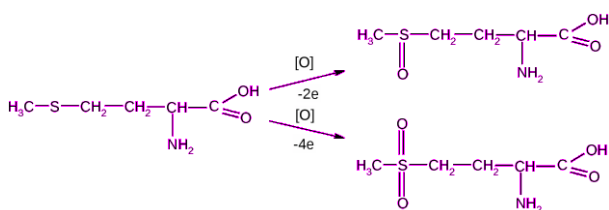


Рисунок 3. Реакция окисления метионина

Figure 3. Reaction of methionine oxidation

Отдельно отметим, что при кислотном гидролизе триптофан полностью разлагается, поэтому для его определения используют щелочной гидролиз (гидроксид бария, 110 °С, 20 ч [7]).

Цель работы – сравнение методов с пред- и постколоночной дериватизацией на примере

анализа образца сульфата лизина. Метод, который покажет наилучшую точность, будет в дальнейшем использован для отработки методов пробоподготовки образцов белков и пептидов на содержание валина и треонина.

Материалы и методы

Реактивы и материалы

Соляная кислота (ХИММЕД, ХЧ), гидроксид натрия (БЕКТОН, ХЧ), гидроксид бария 8-водный (AppliChem Panreac, pure), дисульфит натрия (AppliChem Panreac, USP-NF, BP, Ph. Eur., pure, pharma grade), муравьиная кислота (ЗАО «База № 1 Химреактивов», 85%-ная), перекись водорода (ХИММЕД, 37%, мед), ортофосфорная кислота («КОМПОНЕНТ-РЕАКТИВ, особо чистая 12–3»), набор буферов для аминокислотного анализа методом ВЭЖХ («Sevko&Co»), орто-фталевый ангидрид (Sigma aldrich, ACS reagent)

Оборудование

Анализатор аминокислотный HITACHI L-8900 (Япония); анализатор аминокислотный Sykam S 433 (Германия); хроматограф жидкостной 1290 Infinity II LC (Agilent Technologies, Германия); весы неавтоматического действия Mettler Toledo XPE 204 (Швейцария); электропечь сопротивления низкотемпературная лабораторная SNOL 67/350 (Литва)

Результаты и обсуждение

В образцах сульфата лизина было проведено определение содержания указанной аминокислоты в свободной форме. Как заявляет производитель, содержание лизина в продукте должно быть не меньше 55%. Испытания проводились двумя методами анализа: с пред- и постколоночной дериватизацией (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты анализа сульфата лизина

Table 1.

Results of analysis of lysine sulfate

Название, номер пробы Sample name, sample number	Содержание лизина, % Lysine content, %					Заявлено Control
	Дериватизация Derivatization				Европейская ак- кредитованная ла- боратория [9] European Accred- ited Laboratory	
	Пред- колоночная Pre-column	Δ от независимого определения Δ to control	Пост- колоночная [8] Post-column	Δ от независимого определения Δ to control		
Сульфат лизина № 1 Lysine sulphate № 1	42,5	16,3	56,1	2,8	58,8	≥55
Сульфат лизина № 2 Lysine sulphate № 2	49,8	6,4	54,9	1,3	56,2	≥55
Сульфат лизина № 3 Lysine sulphate № 3	50,9	7,0	58,3	0,4	57,9	≥55

Экспериментально показано, что при постколоночной дериватизации результаты согласуются с теми, что измерены в независимой Европейской аккредитованной лаборатории. Таким образом, этот метод был выбран для дальнейшей работы.

Для определения оптимальной пробоподготовки образцов белков и пептидов на валин и треонин в качестве первой стадии был выбран кислотный гидролиз, т. к. целевые аналиты не являются серосодержащими и не требуется определения триптофана.

После процесса кислотного гидролиза перед анализом pH в образце необходимо довести до 2,2. Для этого возможно использование двух подходов:

— полностью выпарить соляную кислоту и перерастворить образец в буфере с соответствующим pH;

— довести pH в образце после гидролиза до нужного значения путем добавления щелочи.

Экспериментально было установлено, что при использовании первого подхода гидрофобные аминокислоты (например, валин) не полностью перерастворяются после упаривания, и итоговые результаты анализа получаются заниженными (таблица 2). Предположительно, это связано с частичным «запеканием» целевых аналитов с углеводами.

Второй же подход, несмотря на большой расход дополнительного реактива (0,3 г щелочи на 1 пробу), дает более точные результаты.

Таблица 2.

Сравнение результатов разных способов пробоподготовки

Table 2.

Comparison of results of different methods of sample preparation

Аминокислота в пробе Aminoacid in sample	Содержание аминокислот, % Aminoacids content, %				Европейская аккредитованная лаборатория [9] European Accredited Laboratory
	Метод перерастворения Reconstitution method	Δ от независимого определения Δ to control	Метод добавки щелочи Basic addition method	Δ от независимого определения Δ to control	
Валин Valine	0,64	0,33	0,96	0,01	0,97
Треонин Threonine	0,79	0,05	0,84	0	0,84

Заключение

Проведено сравнение методов анализа аминокислот с пред- и постколоночной дериватизацией на примере определения содержания сульфата лизина. Экспериментально доказано преимущество использования постколоночной дериватизации с нингидрином.

Рассмотрены виды пробоподготовки для белковых и пептидных препаратов на примере валина и треонина. Показано, что для дальнейшего определения аминокислот важным является выбранный подход для доведения pH до 2,2. Оптимальным является добавление щелочи (вместо использования выпаривания и перерастворения).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Fallon A., Booth R.G.F., Bell L.D. Applications of HPLC in Biochemistry. Elsevier Science Publisher B.V. (Biomedical Division), 1987. 314 p.
- 2 Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки; под ред. Ю.В. Митина. М.: Мир, 1985. 455 с.
- 3 Joergensen L., Thestrup H.N. Determination of amino acids in biomass and protein samples by microwave hydrolysis and ion-exchange chromatography // Journal of Chromatography A. 1995. № 1-2. P. 421–428.
- 4 Csapo J., Kiss-Csapo Z., Albert C., Loki K. Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids // Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria. 2008. № 1. P. 31–48.

- 5 Boardman N.K. Ion-Exchange Chromatography // In: Biemann K. et al. Modern Methods of Plant Analysis. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Heidelberg: Springer, 1962. V. 5. P. 159–204.

- 6 Fountoulakis M., Lahm H.-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins // Journal of Chromatography A. 1998. № 795 (2). P. 263–275.

- 7 ГОСТ 13496.21–2015 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения лизина и триптофана. М.: Стандартинформ, 2016.

- 8 ГОСТ 33428–2015. Корма, премиксы. Определение содержания лизина, метионина и треонина. М.: Стандартинформ, 2016.

- 9 Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.

REFERENCES

- 1 Fallon A., Booth R.G.F., Bell L.D. Applications of HPLC in Biochemistry. Elsevier Science Publisher B.V. (Biomedical Division), 1987. 314 p.
- 2 Jakubke H.-D., Eshkrite H. Aminoacids, peptides, proteins. Moscow, Mir, 1985. 455 p. (in Russian).
- 3 Joergensen L., Thestrup H.N. Determination of amino acids in biomass and protein samples by microwave hydrolysis and ion-exchange chromatography. Journal of Chromatography A. 1995. no. 1-2. pp. 421–428.
- 4 Csapo J., Kiss-Csapo Z., Albert C., Loki K. Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids. Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria. 2008. no. 1. pp. 31–48.
- 5 Boardman N.K. Ion-Exchange Chromatography. In: Biemann K. et al. Modern Methods of Plant Analysis.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Артем П. Санжеев инженер-химик, НПК «Sevko&Co», Научный проезд 20, стр. 9, г. Москва, 117246, Россия, a.sanzheev@sevko.net

Александра А. Михина инженер, НПК «Sevko&Co», Научный проезд 20, стр. 9, г. Москва, 117246, Россия, mikhina@sevko.net

Дарья А. Севко к.х.н., химик, НПК «Sevko&Co», Научный проезд 20, стр. 9, г. Москва, 117246, Россия, daria@sevko.net

Александр В. Севко руководитель, НПК «Sevko&Co», Научный проезд 20, стр. 9, г. Москва, 117246, Россия, alexander@sevko.net

Сергей Б. Ворожейкин к.х.н., доцент, кафедра химии, Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова, г. Элиста, ул. Пушкина, 11, Россия, deliverer@mail.ru

Екатерина П. Анохина к.т.н., инженер-исследователь, Центр коллективного пользования «Контроль и управление энергоэффективных проектов», Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, katya_anoh@mail.ru

Алиса А. Коротаева к.т.н., инженер-исследователь, Центр коллективного пользования «Контроль и управление энергоэффективных проектов», Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, alisa-korotaeva@mail.ru

КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА

Все авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут ответственность за плагиат

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ПОСТУПИЛА 04.09.2018

ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 16.10.2018

Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Heidelberg, Springer, 1962. vol. 5. pp. 159–204.

6 Fountoulakis M., Lahm H.-W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography A. 1998. no. 795 (2). pp. 263–275.

7 GOST 13496.21–2015. Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredeleniya lizina i triptofana [State Standard 13496.21–2015. Feeds, mixed feeds and raw material. Methods for determination of lizin and tryptophane]. Moscow, Standardinform, 2016. (in Russian).

8 GOST 33428–2015. Korma, premiksy. Opredelenie soderzhaniya lizina, metionina i treonina [State Standard 33428–2015. Feeds, premixtures. Determination of lysine, methionine and threonine]. Moscow, Standardinform, 2016. (in Russian).

9 Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Artem P. Sanzheev chemical engineer, research and development “Sevko&Co”, Moscow, Russia, a.sanzheev@sevko.net

Aleksandra A. Mikhina engineer, research and development “Sevko&Co”, Moscow, Russia, mikhina@sevko.net

Daria A. Sevko Cand. Sci. (Chem.), chemist, research and development “Sevko&Co”, Moscow, Russia, daria@sevko.net

Alexander V. Sevko director, Research and development “Sevko&Co”, Moscow, Russia, alexander@sevko.net

Sergey B. Vorozheykin Cand. Sci. (Chem.), associate professor, chemistry department, Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov, Elista, Russia, deliverer@mail.ru

Ekaterina P. Anokhina Cand. Sci. (Engin.), engineer-researcher, Center for Collective Use "Monitoring and Management of Energy Efficient Projects", Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, katya_anoh@mail.ru

Alisa A. Korotaeva Cand. Sci. (Engin.), engineer-researcher, Center for Collective Use "Monitoring and Management of Energy Efficient Projects", Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, alisa-korotaeva@mail.ru

CONTRIBUTION

All authors equally took part in writing the manuscript and are responsible for plagiarism

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

RECEIVED 9.4.2018

ACCEPTED 10.16.2018