

Биоорганическая химия

УДК 543.545:577.112
DOI 10.26456/vtchem2024.3.11

Определение аминокислотного состава грудного молока методом капиллярного электрофореза

Л.В. Омариева ¹, Ф.О. Исмаилова ², Ф.М. Гусейханова ²,
З.И. Гашимов ¹, М.С. Курбанов ², М.Т. Халилов ²

¹ ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный аграрный университет», Махачкала

² ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет», Махачкала

Исследования направлены на установление качественного состава и количественного содержания аминокислот в грудном молоке. Объектом исследования служило сухое грудное молоко, полученное высушиванием при температуре 150 °С. Предварительную пробоподготовку провели кислотным гидролизом и дальнейшим получением фенилизотиокарбамильных производных аминокислот. Исследование аминокислот проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-105 М», ссылаясь на разделение анионовых форм ФТК-производных ввиду их разной электрофоретической подвижности под действием электрического поля. Детектирование проводили в УФ области спектра при длине волны 254 нм. Для градуировки прибора использовали раствор смеси стандартных образцов аминокислот. Установлено наличие следующих аминокислот; аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, пролин, серин, тирозин, треонин, фенилаланин. Семь из обнаруженных аминокислот относятся к числу незаменимых и восьмая гистидин, аминокислота незаменимая для детей.

Ключевые слова: аминокислотный состав, грудное молоко, капиллярный электрофорез.

Белки – наиболее важная составная часть каждого живого тела. Человек чувствителен не только к количеству белка, но и к его качеству, а как известно, качество белка определяется аминокислотами входящими в его состав [1]. Ребенку аминокислоты необходимы как для восполнения белковых затрат, так и для роста и развития тканей и различных органов ребенка [2]. К белковой недостаточности очень чувствителен растущий организм малышей. Доказано, что дефицит белка в питании малышей сопровождается задержкой развития органов и их роста и систем организма, неблагоприятно влияет на кору головного мозга, точнее, на ее

функцию (недоразвитие), может стать причиной иммуносупрессии и нарушения синтеза гемоглобина [3].

Материнское молоко – полидисперсная система, включающая в себя такие питательные вещества как; белки, углеводы, жиры, витамины, микроэлементы, вода и оно содержит перечисленные вещества в тех соотношениях, которые удовлетворяют потребностям растущего организма младенца [4]. Детальное исследование компонентного состава данного уникального биологического продукта подводит исследователей к восприятию причин и последствий изменения химсостава грудного молока. Вместе с тем, максимально полное представление о составе грудного молока позволяет создавать детские молочные смеси для тех детей, которые лишены возможности его получать.

Метод капиллярного электрофореза – одним из мощных аналитических инструментов, который активно развивается и востребован в аналитическом контроле компонентов окружающей среды [5, 6], продуктов пищевой [7], фармацевтической промышленности [8] и т.д. Метод широко применяется в клинической практике для исследования биологических жидкостей [9] и является одним из наиболее перспективных методов определения аминокислот в различных объектах [10, 11].

Целью работы является определение аминокислотного состава грудного молока методом капиллярного электрофореза.

Обсуждение результатов

По электрофореграмме определили мг/л обнаруженных аминокислот, по которой рассчитали относительные проценты выхода обнаруженных аминокислот от общей суммы.

Данные о составе и количественном содержании аминокислот в белках грудного молока после кислотного гидролиза представлены в виде электрофореграмм (рис 1,2) и приведены в табл.1.

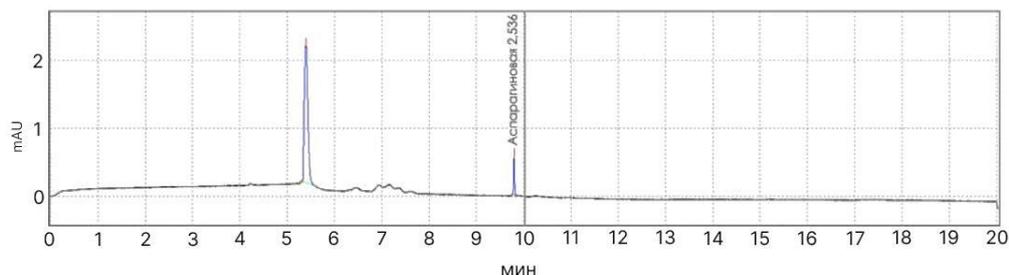


Рис. 1. Электрофореграмма аминокислотного анализа по схеме анализа № 2

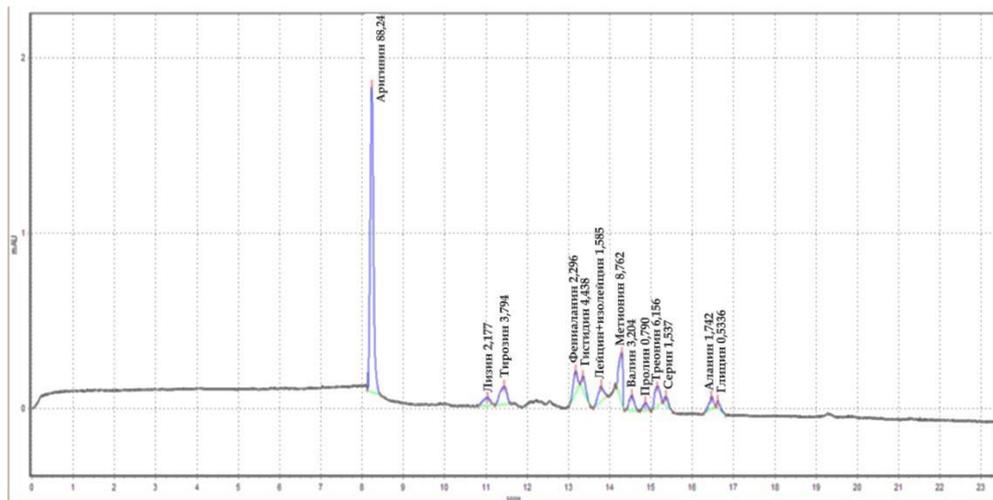


Рис. 2. Электрофореграмма определения аминокислотного состава по схеме анализа № 1

Таблица 1
Относительное процентное содержание аминокислот в белках грудного молока

Наименование аминокислоты	Время выхода, мин	Концентрация мг/л	Выход, %
1	2	3	4
Аланин		16,5	1,4
Аргинин	8	88,24	70,4
Аспарагиновая		9,8	2,0
1	2	3	4
Валин*	14,5	3,204	2,6
Гистидин*	13,4	4,438	3,5
Глицин		16,6	0,4
Лейцин+изолейцин*	13,8	1,585	1,3
Лизин*	11	2,177	1,7
Метионин*	14,2	8,762	7,0
Пролин	14,9	0,790	0,6
Тирозин	11,5	3,794	3,0
Треонин*	15,1	6,156	5,0
Серин		15,3	1,2
Фенилаланин*	13,2	2,296	1,8
Всего			100

*-незаменимые аминокислоты

В исследуемом молоке из 9 незаменимых аминокислот обнаружены 8, в количествах, достаточных ребенку для роста и развития.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали сухое грудное молоко, полученное высушиванием при температуре 150 °С.

Изучение аминокислотного состава проводили методом капиллярного электрофореза с использованием прибора «Капель-105 М» (ОАО «НПФ Люмэкс», Россия) с кварцевым капилляром ($L_{\text{общ}}/L_{\text{эфф}} = 75/65$ см, $\varnothing = 50$ мкм).

Метод основан на разложении проб кислотным гидролизом с переводом аминокислот в свободные формы, получении фенилизотиокарбамильных производных (ФТК-производных) аминокислот и разделении под действием электрического поля ввиду их разной электрофоретической подвижности [12,13]. Детектирование проводили в УФ области спектра при длине волны 254 нм.

Подготовку пробы проводили методом кислотного гидролиза по след схемам: навеску пробы №1 массой ($100 \pm 0,2$) мг поместили в виалу для гидролиза, добавили 10 см³ соляной кислоты 1:1, герметично закрыли завинчивающейся крышкой и перемешали и навеску пробы №2 массой ($100 \pm 0,2$) мг поместили в фарфоровую чашку, добавили 5,0 см³ свежеприготовленной окислительной смеси (1 объёмная часть 30% H₂O и 9 объёмных частей концентрированной муравьиной кислоты) и выпарили при постоянном перемешивании в струе теплого воздуха при температуре 60° досуха. Окисляют раствор, потому что цистин в условиях проведения кислотного анализа неустойчив, а его протеиногенная форма цистеина устойчива. Сухой остаток количественно перенесли в виалу для гидролиза, используя раствор соляной кислоты 1:1 объёмом 10 см³. Завинчивающейся крышкой виалу закрыли герметично и перемешали. Виалы установили в сушильный шкаф и в течение 14-16 ч. при температуре 110°С проводили гидролиз. По завершении гидролиза виалы извлекли из шкафа, и охладили до комнатной температуры. Содержимое виал отфильтровали, используя фильтры синяя лента. Первые порции фильтрата отбросили. Во избежание испарения основные фильтраты собирали в посуду с крышками и использовали для дальнейшего получения ФТК-производных. Для получения ФТК-производных использовали раствор фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. [14,15].

Сухой остаток полученных ФТК-производных растворили, тщательно перемешали и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 5 мин. Исследуемую пробу пневматическим методом под давлением 30 мбар в течение 5 секунд дозировали в капилляр. Перед измерением капилляр подготовили к работе, последовательно промывая его раствором гидроксида натрия, дистиллированной водой, раствором соляной кислоты и раствором соответствующего фонового электролита. Электрофорез проводили под напряжением в 25 кВ и при температуре 30°С. Для градуировки прибора использовали раствор смеси стандартных

образцов аминокислот. Смесь для градуировки готовили смешением исходных растворов аминокислот, раствора карбоната натрия и раствора фенилизотиоцианата в изопропиловом спирте. Для каждого подготовленного раствора регистрировали электрофореграмму. По окончании анализа проверили правильность автоматической разметки и провели идентификацию (по времени миграции) и определили массовую концентрацию аминокислот с использованием градуировочной характеристики. [14, 15].

Выводы

В первые месяцы жизни малыша особо важную роль для нормального развития ребенка имеют и аминокислоты входящие в состав детского питания. Дефицит любой из незаменимых аминокислот в пищевом рационе неизбежно ведет к нарушению синтеза белка. При нарушении сбалансированности аминокислотного состава синтез белков также нарушается, что ведет к задержке роста и развития организма. Полное представление об аминокислотном составе грудного молока позволяет создавать детские молочные смеси идентичные молоку матери для тех детей, которые лишены возможности его получать.

Анализ и обобщение результатов исследования аминокислотного состава грудного молока методом капиллярного электрофореза сделать следующие выводы:

- в пробе анализированного грудного молока обнаружено 15 аминокислот, в том числе аланина 1,4%; аргинина 70,4%; аспарагиновой кислоты 2%; валина 2,56%; гистидина 3,5%; глицина 0,4%; лейцина+изолейцина 1,26%; лизина 1,74%; метионина 6,99%; пролина 0,6%; серина 1,2%; тирозина 3,03%; треонина 4,9%; фенилаланина 1,8%.

- из обнаруженных 15 аминокислот 7 незаменимые и восьмая гистидин, аминокислота незаменимая для детей.

- количественное содержание аминокислот по увеличению содержания располагаются в ряду – глицин < пролин < серин < лейцин+изолейцин < аланин < лизин < фенилаланин < аспарагиновая кислота < валин < тирозин < гистидин < треонин < метионин < аргинин.

Список литературы

1. Быковская Е.И., Минакова И.В. Обогащение продуктов питания белками, микронутриентами как основа оптимизации рациона питания населения // В сборнике: Молодежь и XXI век – 2019. материалы IX Международной молодежной научной конференции. 2019. – С. 215-219.
2. Хамзаева М.Я. Преимущества материнского молока // Интеллектуальный потенциал общества как драйвер инновационного развития науки: сборник статей Международной научно-практической конференции (26 июня 2019 г, г. Тюмень) в 2 ч. ч.2 – Уфа: OMEGA SCIENCE, 2019. – 266 с.

3. Пырьева Е.А., Сафронова А.И., Нетунаева Е.А., Тимошина М.И. Роль и источники белка в питании детей раннего возраста // РМЖ. Мать и дитя. 2021. Т. 4, № 1. – С. 65-69.
4. Лебедев У.М., Прокопьева С.И., Степанов К.М., Грязнухин Н.Н., Дохуноева А.М. Мое чадо – мое чудо (книга 1. Материнское молоко – основа здоровья ребенка, книга 2. От молока к густой пище) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. №3-2. – С. 150-152.
5. Максакова И.Б., Елисеева Л.В., Крылов А.И. Универсальная методика измерений загрязнителей воздушной среды на основе техники капиллярного электрофореза // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. 2022. Т. 17, № 1. – С. 44-56.
6. Максакова И.Б., Елисеева Л.В., Безручко М.М., Крылов А.И. Селективное определение массовой концентрации диоксида хлора в промышленных выбросах методом капиллярного электрофореза // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23, № 2. – С. 201-207.
7. Шелехова Т.М., Абрамова И.М., Шелехова Н.В., Скворцова Л.И., Полтавская Н.В. Исследование аналитических возможностей метода капиллярного электрофореза для определения неорганических анионов в спиртных дистиллированных напитках // Пищевая промышленность. 2023. № 2. – С. 96-101.
8. Езерская А.А., Пивовар М.Л. Капиллярный электрофорез: основные принципы, применение в фармацевтическом анализе // Вестник фармации. 2019. № 1 (83). – С. 35-44.
9. Карцова Л.А., Макеева Д.В. Метод капиллярного электрофореза: Биомедицинские приложения // Лаборатория и производство. 2023. №2 (24) – С. 32-46
10. Сечин Е.Н., Маракаев О.А., Гаврилов Г.Б. Аминокислотный состав вегетативных органов *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) // Химия растительного сырья. 2019. № 2. – С. 135-143
11. Семенова Е.С. Применение метода капиллярного электрофореза для определения аминокислотного состава сыворотки как сырья для производства продуктов функциональной направленности // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. 2020. Т.1, №1- С. 485-491.
12. Брыкалов А.В., и др. Современные методы выделения и исследования биологически активных веществ и микроорганизмов: монография – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 115с.
13. Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству / под ред. Э.В. Макаровой. – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. – 300 с.
14. М 04-38-2009 Корма, комбикорма и сырье для их производства. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» – 2014
15. М 04-63-2016 Кормовые добавки. Методика измерений массовой доли метионина, треонина и триптофана методом капиллярного

электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза
«Капель» – 2016

Об авторах:

ОМАРИЕВА Луиза Ванатиевна – кандидат биологических наук, руководитель испытательного центра, доцент кафедры экологии и защиты растений факультета агроэкологии ФГБОУ ВО Дагестанский ГАУ (367032, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 180). e-mail: lizka78@mail.ru

ИСМАИЛОВА Фариза Османовна – кандидат химических наук, руководитель испытательного центра, доцент кафедры аналитической и фармацевтической химии химического факультета ФГБОУ ВО ДГУ (367023, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 43-А). e-mail: ism-fariza@yandex.ru

ГУСЕЙХАНОВА Фатима Магомедбаговна – кандидат биологических наук, руководитель испытательного центра, доцент кафедры аналитической и фармацевтической химии химического факультета ФГБОУ ВО ДГУ (367023, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 43-А). e-mail: gusena-fat@mail.ru

ГАШИМОВ Зураб Исламович – аспирант 2-го года обучения технологического факультета ФГБОУ ВО Дагестанский ГАУ (367032, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 180). e-mail: gashimov.zurab1@mail.ru

КУРБАНОВ Магомед Сиражутдинович – кандидат биологических наук, доцент кафедры доцент кафедры ихтиологии биологического факультета ФГБОУ ВО ДГУ (367023, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 43-А). e-mail: – labdaggau@mail.ru

ХАЛИЛОВ Маил Тажирович – студент 3 курса химического факультета ФГБОУ ВО ДГУ (367023, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, 43-А). e-mail: – mail100105@mail.ru

Determination of the amino acid composition of breast milk by capillary electrophoresis

L.V. Omarieva ¹, F.O. Ismailova ², F.M. Guseykhanova ²,
Z.I. Gashimov¹, M.S. Kurbanov ², M.T. Khalilov ²

¹Dagestan State Agrarian University, Makhachkala

²Dagestan State University, Makhachkala

Research is aimed at establishing the qualitative composition and quantitative content of amino acids in breast milk. The object of the study was powdered breast milk obtained by drying at a temperature of 150 0C. Preliminary sample preparation was carried out by acid hydrolysis and further preparation of phenylisothiocarbamyl derivatives of amino acids. The study of amino acids was carried out by capillary electrophoresis on a Kapel-105 M device, referring to the separation of anionic forms of FTC derivatives due to their different electrophoretic mobility under the influence of an electric field. Detection was carried out in the UV region of the spectrum at a wavelength of 254 nm. To calibrate the device, a solution of a mixture of standard amino acid samples was used. The presence of the following amino acids has been established; alanine, arginine, aspartic acid, valine, histidine, glycine, leucine, isoleucine, lysine, methionine, proline, serine, tyrosine, threonine, phenylalanine. Seven of the discovered amino acids are essential and the eighth is histidine, an essential amino acid for children.

Keywords: *amino acid composition, breast milk, capillary electrophoresis.*

Дата поступления в редакцию: 12.08.2024.

Дата принятия в печать: 19.08.2024.