



Аналитические возможности жидкостного хроматографа МаэстроВЭЖХ с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD на примере определения аминокислот в гидролизате яичного белка и в лекарственном препарате

Яшин А. Я. к. х. н., ведущий инженер отдела исследований и разработок, ООО Интерлаб, Россия, Москва

Ключевые слова

Жидкостная хроматография, недериватизированные аминокислоты, гидролизат белка, лекарственные препараты, низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния

Резюме

Показаны аналитические возможности жидкостного хроматографа МаэстроВЭЖХ с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD на примере определения аминокислот в гидролизате яичного белка и в лекарственном препарате. Рассчитаны СКО по высотам и площадям определяемых компонентов. Определено содержание некоторых аминокислот в гидролизате яичного белка и в лекарственном препарате.

Введение

Аминокислоты – это «кирпичики», из которых состоят все белки человеческого организма. Роль аминокислот для человеческого организма является очень многогранной, поскольку действуют они на различных уровнях. Некоторые из них помогают организму вырабатывать пищеварительные ферменты и гормоны. Другие являются антиоксидантами и энергетиками. Существуют также аминокислоты, нормализующие работоспособность сердца, почек, печени, центральной нервной системы и головного мозга. Аминокислоты, поступающие с пищей подразделяются на незаменимые и заменимые. Заменимые аминокислоты могут синтезироваться в организме человека. Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме человека, но необходимы для нормальной жизнедеятельности. Они должны поступать в организм с пищей. Отсутствие или недостаток незаменимых аминокислот приводит к остановке роста, падению массы, нарушениям обмена веществ, при острой недостаточности - к гибели организма. Однако в первую очередь, аминокислоты необходимы для того, чтобы из них синтезировались белки, входящие в состав органов организма и его тканей. Из белков формируются все органы и железы, связки, мышцы, сухожилия, ногти, волосы и т.д. Каждый белок предназначен для своих целей.

Основным критерием определения биологической ценности и физиологической роли аминокислот является способность их поддерживать рост и таким образом входить в комплекс обязательных веществ, без которых невозможен синтез белка в организме.

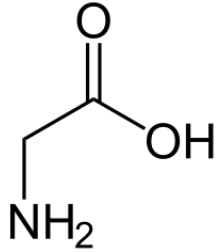
Контроль качества аминокислот – актуальная задача фармации и пищевой промышленности.

Несмотря на многообразие методик для анализа аминокислот, наиболее экспрессным и доступным является обращено-фазовый вариант ВЭЖХ со спектрофотометрическим или флуориметрическим детектированием. Для успешного разделения и детектирования аминокислоты переводят в поглощающие свет производные, т.е. проводят до- или послеколоночную дериватизацию. Однако, при этом страдает точность определения, увеличивается общее время и стоимость анализа.

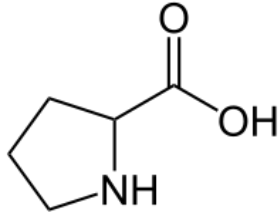
Чтобы избавиться от этой стадии предлагается использовать низкотемпературный испарительный детектор светорассеяния, который определяет аминокислоты напрямую, без дериватизации.

Жидкостный хроматограф МаэстроВЭЖХ с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD был применен для разделения и детектирования следующих аминокислот:

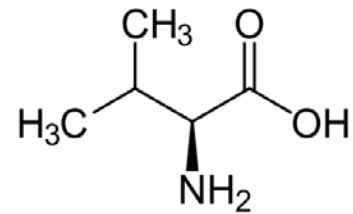
Глицин



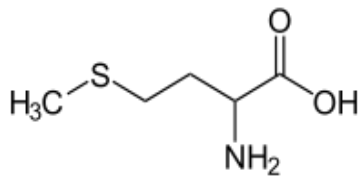
Пролин



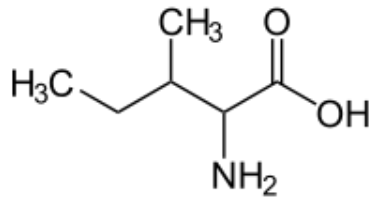
Валин



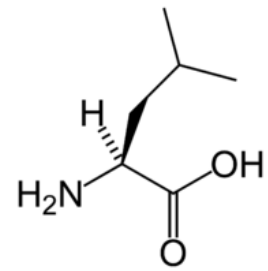
Метионин



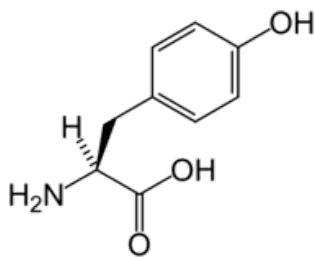
Изолейцин



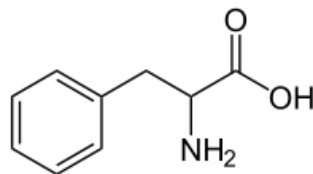
Лейцин



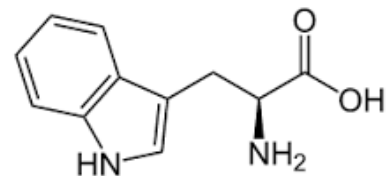
Тирозин



Фенилаланин



Триптофан



Экспериментальная часть

Для анализа использовали чистые вещества фирмы Fluka:

Глицин (стандарт, не менее 99%);
L-пролин (стандарт, не менее 99%);
L-валин (стандарт, не менее 99%);
L-метионин (стандарт, не менее 99%);
L-изолейцин (стандарт, не менее 99%);
L-лейцин (стандарт, не менее 99%);
L-тирозин (стандарт, не менее 99%);
L-фенилаланин (стандарт, не менее 99%);
L-триптофан (стандарт, не менее 99%);
Ацетонитрил для ВЭЖХ;

Инструменты:

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD

Колонка: Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x4.6 мм

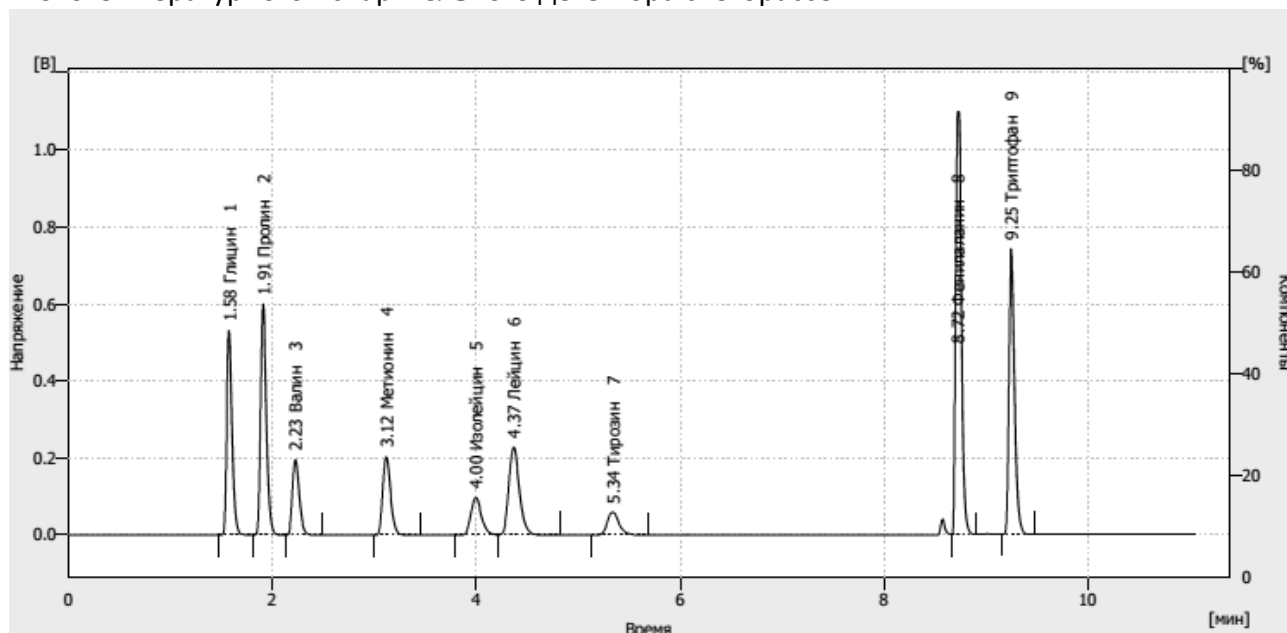
Скорость потока 1 мл/мин

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – бидистиллированная вода. Градиент:

Время [мин]	А [%]	В [%]
Исходный	0	100
4.50	0	100
5.50	20	80
8.00	10	90
9.00	0	100
10.00	0	100
11.00	0	100

Результаты и обсуждения

Типичная хроматограмма стандартной смеси аминокислот с использованием низкотемпературного испарительного детектора светорассеяния



Дериватизация анализируемых соединений не требуется

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – глицин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	1.579	1891.534	524.939
СКО %	0.17	3.41	3.43
1	1.578	1817.471	505.906
2	1.577	1861.08	519.23
3	1.583	1866.603	515.432
4	1.58	1980.949	552.725
5	1.577	1931.565	531.404

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – пролин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	1.911	2286.076	570.458
СКО %	0.17	2.51	3.28
1	1.907	2263.228	563.214
2	1.909	2218.493	548.355
3	1.916	2292.372	568.442
4	1.913	2280.939	572.66
5	1.91	2375.348	599.62

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – валин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	2.228	892.419	195.794
СКО %	0.14	1.56	2.06
1	2.223	884.348	192.071
2	2.227	895.608	200.291
3	2.232	872.589	191.484
4	2.229	905.157	199.301
5	2.227	904.393	195.825

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – метионин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	3.111	1054.999	203.18
СКО %	0.25	2.41	3.2
1	3.099	1041.323	204.027
2	3.106	1067.147	204.634
3	3.114	1016.792	192.996
4	3.116	1076.502	211.122
5	3.118	1073.23	203.12

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – изолейцин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	3.993	676.048	94.407
СКО %	0.2	1.88	1.89
1	3.982	665.222	94.664
2	3.989	672.741	94.577
3	3.998	664.205	92.618
4	4.001	684.506	93.016
5	3.997	693.563	97.158

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – лейцин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	4.365	1633.837	227.665
СКО %	0.12	1.64	1.89
1	4.362	1628.018	227.161
2	4.358	1601.309	222.626
3	4.371	1623.553	226.119
4	4.368	1674.018	234.468
5	4.368	1642.288	227.953

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – тирозин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	5.286	464.345	59.132
СКО %	0.83	1.54	2.2
1	5.231	466.888	60.99
2	5.257	468.581	59.345
3	5.291	458.688	58.915
4	5.31	455.175	57.338
5	5.342	472.394	59.073

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – фенилаланин)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	8.721	4324.047	1099.529
СКО %	0.03	1.29	0.03
1	8.721	4389.593	1099.531
2	8.72	4278.115	1099.686
3	8.725	4279.994	1099.617
4	8.718	4292.967	1099.786
5	8.721	4379.565	1099.028

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – триптофан)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	9.236	2786.492	732.363
СКО %	0.1	1.66	1.51
1	9.227	2741.133	723.21
2	9.229	2795.226	745.136
3	9.239	2767.452	730.802
4	9.234	2766.911	720.473
5	9.25	2861.74	742.192

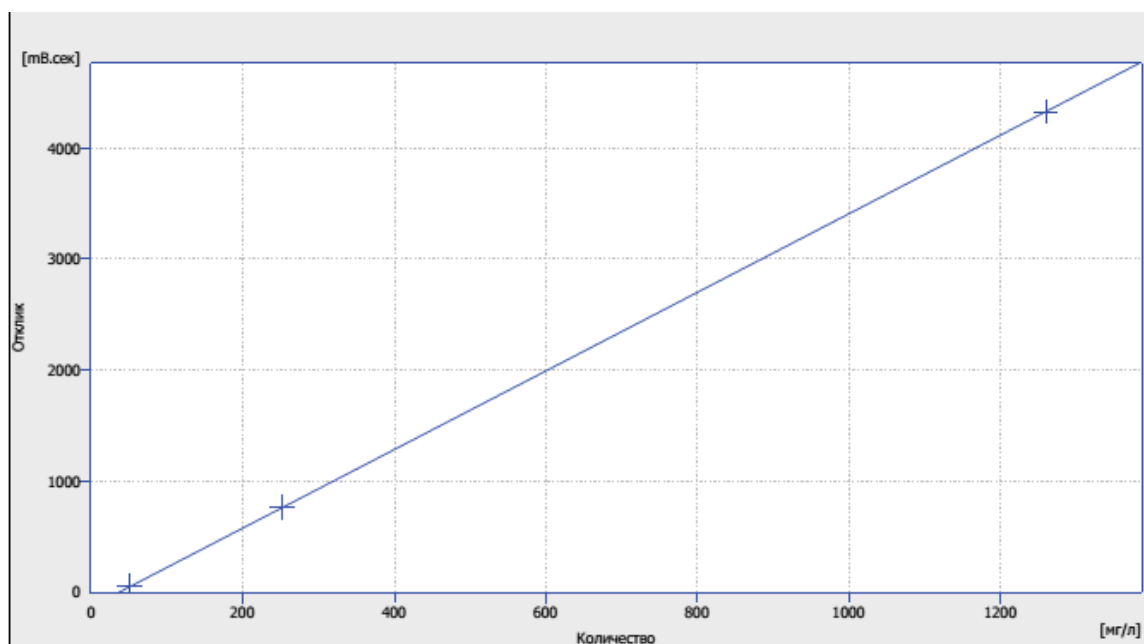
Для определения аминокислот были построены градуировочные графики

Ниже приведен в качестве примера градуировочный график фенилаланина

Отклик	Количество
36.5	0.4
362.8	4.0
3620.3	40.0

Уравнение градуировочного графика $Y = 3.5393 \cdot X - 129.92175$

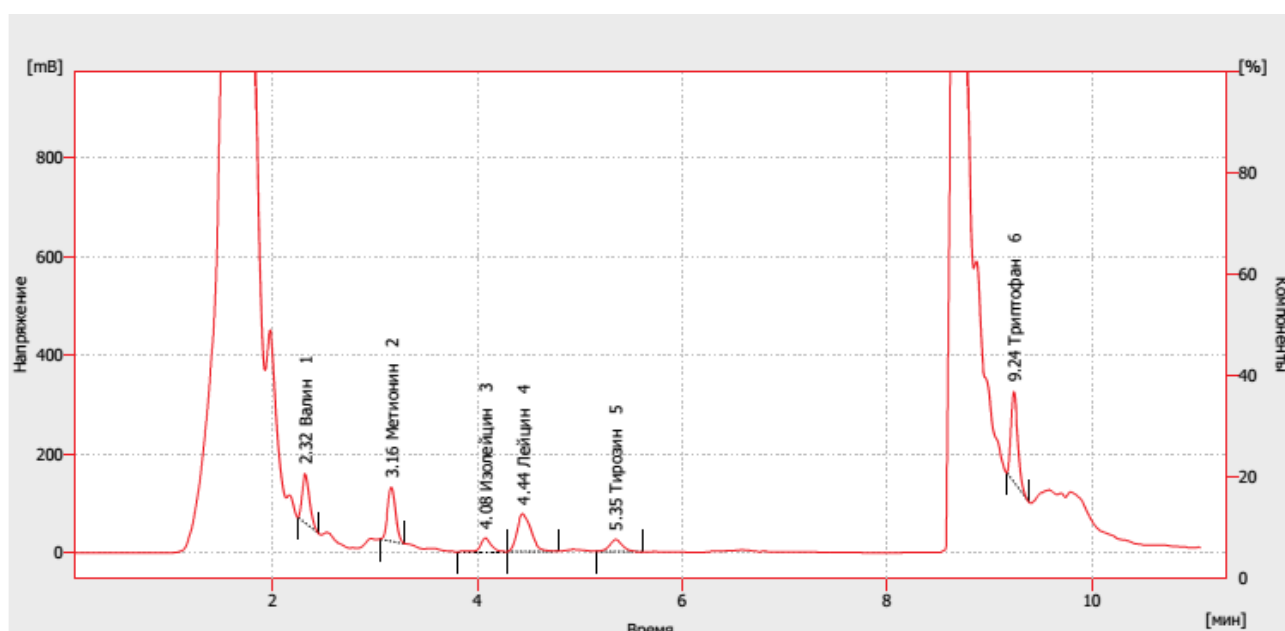
Коэфф. корреляции 1.00



Расчетный предел детектирования (ПД) определяемых аминокислот

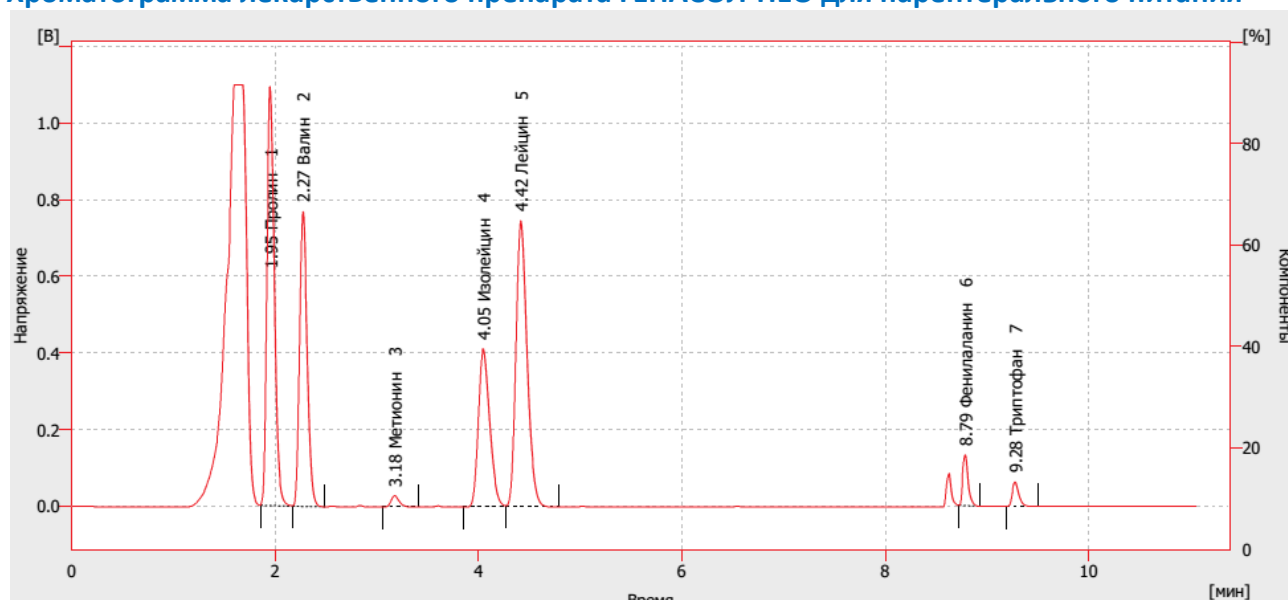
Название	Предел детектирования, г/мл
Глицин	$1,6 \times 10^{-6}$
Пролин	$1,6 \times 10^{-6}$
Валин	$2,4 \times 10^{-6}$
Метионин	$2,4 \times 10^{-6}$
Изолейцин	$3,3 \times 10^{-6}$
Лейцин	$1,9 \times 10^{-6}$
Тирозин	6×10^{-6}
Фенилаланин	5×10^{-7}
Триптофан	$1,1 \times 10^{-6}$

Хроматограмма гидролизата яичного белка



	Время уд. [мин]	Площадь [mB.сек]	Высота [mB]	Количество [мг/л]	Название вещества
1	1.951	5533.862	1092.739	71556.358	Пролин
2	2.274	3990.967	768.411	104870.178	Валин
3	3.176	163.604	29.825	6089.676	Метионин
4	4.047	3190.98	412.799	111672.989	Изолейцин
5	4.416	5715.468	747.383	104100.672	Лейцин
6	8.789	493.335	132.533	6126.755	Фенилаланин
7	9.279	279.424	63.496	3816.107	Триптофан

Хроматограмма лекарственного препарата ГЕПАСОЛ-НЕО для парентерального питания



	Время [мин]	уд.	Площадь [mB.сек]	Высота [mB]	Количество [мг/л]	Название вещества
1	2.318		509.024	100.71	294.645	Валин
2	3.159		591.592	109.042	342.689	Метионин
3	4.076		188.528	27.663	167.577	Изолейцин
4	4.442		724.538	76.834	301.832	Лейцин
5	5.349		207.292	24.035	236.506	Тирозин
6	9.239		862.663	184.201	167.181	Триптофан

Выводы

В большинстве полученных результатов СКО по площадям пиков составляет менее 3,5%.

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с низкотемпературным испарительным детектором светорассеяния МАЭСТРО ELSD можно рекомендовать лабораториям Роспотребнадзора, Росздрава и другим организациям для контроля содержания аминокислот в пищевых продуктах и лекарственных препаратах.

За дополнительной информацией обращайтесь в компанию Интерлаб



127055, Москва, Тихвинский пер., д.11 стр.2
т. (495) 788-09-83, ф. (495) 755-77-61
www.interlab.ru
e-mail: interlab@interlab.ru

Екатеринбург:
т. (343) 379-57-33,
ф. (343) 379-57-34
e-mail: ural@interlab.ru

Новосибирск:
т. (383) 330-56-91
ф. (383) 330-56-03
e-mail: nsk@interlab.ru

Санкт Петербург:
т/ф. (812) 643-14-23
e-mail: spb@interlab.ru