УДК 664, 648, 18, 579

## ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА АНАЛИЗА В КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ СУММЫ СВОБОДНЫХ $\alpha$ -АМИНОКИСЛОТ

Гумеров Т.Ю., Фахразиева З.Р., Федотов С.А.

ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева-КАИ», Казань, e-mail: tt-timofei@mail.ru

Обеспечение безопасности продовольственного сырья, пищевых продуктов и готовых блюд — одно из основных направлений, определяющих здоровье населения. Правильно организованный и осуществленный технологический процесс приготовления блюд и изделий позволяет полностью исключить присутствие в готовых блюдах патогенных микроорганизмов, уменьшить содержание радионуклидов и нитратов, а также сохранить ценные белки, жиры и углеводы. Общественное питание является важным структурным элементом социальной инфраструктуры, роль общественного питания достаточно значима и направлена на выполнение главной функции — создание комплекса условий для развития экономики и обеспечения нормальной жизнедеятельности человека.

Ключевые слова: спектрофотометрия, аминокислоты, зерновое сырье

## THE APPLICATION ANALYSIS SPECTROPHOTOMETRIC METHOD TO QUANTIFY THE SUM OF FREE $\alpha$ -AMINO ACIDS

Gumerov T.Y., Fahrazieva Z.R., Fedotov S.A.

FSGFEI HPE «Federal State Government-Funded Educational Institution of Higher Professional Education», Kazan national research technical university named after A.N. Tupolev – KAI, Kazan, e-mail: tt-timofei@mail.ru

Safety of food raw materials, foodstuff and ready dishes – is one of the basic directions defining health of population. Correctly organised and carried technological process of dishes and products preparation allows to exclude completely presence of pathogenic microorganisms, to reduce the maintenance radionuclides and nitrates, and also to keep valuable fibers, fats and carbohydrates at ready dishes. Food is an important structural element of the social infrastructure, the role of public power is significant enough and is aimed at the main function – the creation of a set of conditions for economic development and maintenance of normal human life.

Keywords: spectrophotometry, amino acids, grain raw materials

Питание, как процесс употребления пищи удовлетворяет самую насущную потребность человека, выступает необходимым условием существования людей, их общественной и трудовой деятельности. Общественное питание в своих коллективно организованных формах является важнейшим фактором и механизмом реализации социальной политики [7].

Целью работы являлось адаптировать спектрофотометрический метод для количественного определения α-аминокислот в зерновом сырье на основе исследования спектральных характеристик продуктов нингидроновой реакции.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

- адаптировать метод спектрофотометрии и изучить спектральные характеристики в видимой и УФ-области оптической плотности водных растворов экстрактов зернового сырья;
- определить количественный состав заменимых и незаменимых аминокислот с применением 0,2% раствора нингидрина;
- оптимизировать условия проведения кислотного гидролиза экстрактов об-

разцов с целью повышения выхода суммы  $\alpha$ -аминокислот из зернового сырья;

- изучить влияние продолжительности гидролиза на выход суммы α-аминокислот;
- изучить влияние балластных веществ на содержание суммы α-аминокислот в зерновом сырье после гидролиза (в оптимизированных условиях).

На начальном этапе эксперимента проводились исследования спектральных характеристик продуктов реакции  $\alpha$ -аминокислот с 0,2% раствором нингидрина в воле.

В качестве исследуемых образцов было подобрано зерновое сырье, выращенное в различных районах Республики Татарстан. Данные исследования проводились с целью выявления наиболее ценного зернового сырья в зависимости от географического места расположения, климатических условияй и метеорологических особенностей выращивания зерна. Кроме того, выявление генетических особенностей различных сортов зерна и влияние внешних условий при выращивании (одинаковые условия возделывания, дозы и соотношение удобрений, применение различных препа-

ратов, условия, влияющие в значительной степени на биохимический состав). В работе рассмотрено 10 образцов со следующим обозначением: *O-1; O-2; O-3; O-4; O-5; O-6; O-7; O-8; O-9* и *O-10*. Каждый образец отличается внешними признаками, формой, цветом, размером, а также районом выращивания и периодом созревания [8].

Изучение спектральных характеристик проводилось на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ в лаборатории биохимического анализа кафедры ТПП КНИТУ. Зерновое сырье (образцы) подверглось экстрагированию с получением водной эмульсии [1].

В результате исследования водных растворов образцов на спектрофотометре были получены следующие результаты в виде спектров поглощения оптической плотности (рис. 1).

В результате эксперимента установлено, что для всех исследуемых образцов зерновых культур характерны четыре максимума поглощения, два из которых находятся в УФ-области, в интервале 220–240 и 250–260 нм, и два – в видимой области, в диапазоне 380–400 и 560–580 нм. Данная закономерность наблюдается для всех исследуемых образцов и объясняется наличием первичных аминогрупп α-аминокислот в структуре зернового сырья.

Таким образом, большинство продуктов реакции α-аминокислот с раствором нингидрина в воде характеризуется единым максимумом поглощения при длине волны 400 нм, что обусловливает целесообразность использования данной длины волны в качестве аналитической (табл. 1) [2].

В работе [5] установлено, что водный раствор нингидрина имеет интенсивное поглощение в диапазоне длин волн 220 до 330 нм, но совершенно не поглощает в диапазоне длин волн 400–600 нм. Поэтому целесообразно проводить спектрофотометрические исследования продуктов реакции с 0,2% водным раствором нингидрина в видимой области спектра.

Далее в работе было определено количественное содержание аминокислот в исследуемых образцах в соответствие с методикой [8]. Данная реакция впервые была открыта Руманом. Позднее установлено, что нингидрин специфичен к алифатическим или алициклическим первичным аминогруппам. Вторичные, третичные и четвертичные амины, амиды и амино-замещенные ароматические соединения дают слабую реакцию или не дают вовсе. Исключение — пролин, который образует с нингидрином окраску желтого цвета, как считают некоторые исследователи, благодаря раскрытию цикла.

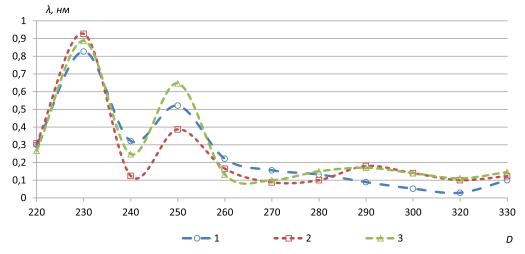


Рис. 1. УФ-область спектра продуктов взаимодействия экстракта зерновых культур с 0.2% раствором нингидрина в воде: где D – оптическая плотность,  $\lambda$  – длина волны, нм

Таблица 1 Характеристика спектров поглощения продуктов реакции α-аминокислот с 0,2% раствором нингидрина

Максимум	Образец									
поглощения, нм	O-1	O-2	O-3	O-4	O-5	0-6	O-7	O-8	0-9	O-10
Видимая область	400,56	400,56	400,47	399,56	400,53	400,65	400,65	400,56	400,78	400,49
УФ-область	230,25	230,25	230,25	230,25	230,34	230,25	230,25	230,31	230,33	230,37

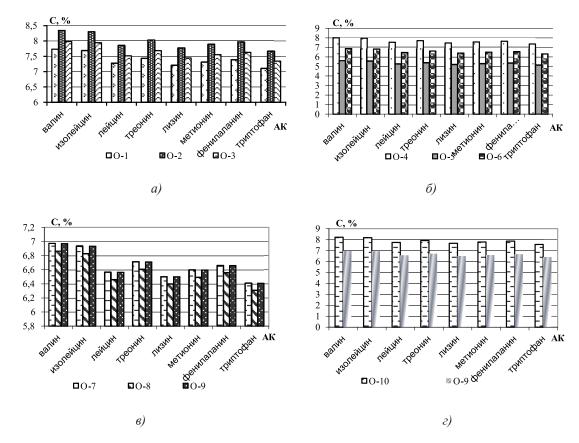


Рис. 2. Количественное содержание незаменимых α-аминокислот в образцах: а) образцы O-1; O-2; O-3; б) образцы O-4; O-5; O-6; в) образцы O-7; O-8; г) образцы O-9; O-10

Свободные α-аминокислоты дают синефиолетовое окрашивание с нингидрином. На первой стадии реакции α-аминокислот с нингидрином образуются углерода диоксид, альдегид и устойчивое промежуточное соединение 2-аминоиндандион, участвующий в двух параллельных реакциях. В одной из них он реагирует с нингидрином до образования 2-гидроксииндандиона и 2-иминоиндандиона, которые, конденсируясь между собой, формируют дикетогидринденкетогидринамин. Во второй реакции 2-аминоиндандион в кислой среде подвергается гидролизу до аммиака и 2-гидроксииндандиона, последний, взаимодействуя с нингидрином, образует ги-

Далее, проводились исследования спектральных характеристик образцов с 0,2% водным раствором нингидрина после нагревания при температуре 100°С в течение 15 мин. Для этого в исследуемых образцах, после проведения нингидриновой реакции, определяли оптимальные значения их оптических плотностей.

В водном извлечении зернового сырья аминокислоты содержатся как в свобод-

ном, так и в связанном состоянии (в составе пептидов и белков). С целью повышения выхода суммы аминокислот из зернового экстракта в работе были оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза.

В качестве гидролизующего агента был использован раствор хлороводородной кислоты, обеспечивающий достаточно полное расщепление белков и пептидов водного экстракта до α-аминокислот. Кроме того, получаемые гидролизаты характеризуются высокой стабильностью, уменьшается вероятность их микробной контаминации, что является важным фактором при подготовке образцов к анализу.

На следующем этапе исследования был изучен аминокислотный состав зернового сырья после кислотного гидролиза. Следует отметить, что несмотря на высокий выход α-аминокислот, проведение кислотного гидролиза в данных условиях связано с воздействием повышенного давления на сырье, сложным аппаратурным оформлением процесса, а также со значительными временными затратами при подготовке гидролизата (более 20 ч), что ограничивает использование данной технологии в условиях

промышленного производства. На этом основании целью являлось оптимизировать условия кислотного гидролиза для повышения выхода аминокислот из сырья и разработать доступную методику. К 5 г зернового сырья добавляли 35 мл воды и оставляли на 30 мин. Далее к сырью добавляли 65 мл раствора хлороводородной кислоты в концентрации от 0,5 М до 5 М и проводили гидролиз при температуре 80-90 °C в течении 2 ч. Затем гидролизат отделяли фильтрованием, а сырье для его более полного истощения четырехкратно экстрагировали водой (в соотношении 1:6) по 30 мин в аналогичном температурном режиме. Полученные извлечения фильтровали и объединяли с гидролизатом.

К объединенному гидролизату добавляли натрий гидрокарбонат до нейтральной реакции, переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили водой до метки. В результате кислотного гидролиза образуется комплекс балластных веществ (в том числе и продукты частичного гидролиза ВМС), снижающих качество готового продукта. Для очистки от данных веществ, к 25 мл гидролизата добавляли трехкратный объем 96% этанола и оставляли в течение 10–12 ч при температуре 3–4°C. Образующийся осадок отделяли центрифугированием, после чего извлечение сгущали до полного удаления этанола, переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили водой до метки.

Таблица 2 Влияние регулируемых факторов кислотного гидролиза на выход суммы α-аминокислот зернового сырья

№ п/п	Концентрация раствора <i>HCl</i> , M	Время гидролиза, ч	Выход суммы АК, %		
		1	77,2		
1	0,5	3	79,1		
1	0,3	6	80,4		
		9	82,2		
		1	84,3		
2	1.0	3	87,1		
2	1,0	6	94,7		
		9	91,6		
		1	88,4		
3	1.5	3	73,5		
3	1,5	6	74,2		
		9	79,5		
		1	81,4		
,	2.0	3	82,1		
4	2,0	6	87,3		
		9	67,1		
		1	85,8		
_	2.5	3	86,4		
5	2,5	6	86,3		
		9	85,1		
		1	71,2		
	2.0	3	76,3		
6	3,0	6	73,1		
		9	72,8		
		1	67,4		
7	2.5	3	66,2		
7	3,5	6	65,3		
		9	68,1		
		1	66,3		
0	4.0	3	68,5		
8	4,0	6	67,3		
		9	65,1		
		1	58,2		
	7.0	3	59,3		
9	5,0	6	57,4		
		9	57,1		

Далее проводилась нингидриновая реакция. Установлено, что гидролиз зернового сырья 1 М раствором хлороводородной кислоты обеспечивает наиболее высокий выход суммы аминокислот – до 0,94 % в пересчете на конкретную аминокислоту (рис. 2).

Как видно из рисунков, количественное содержание незаменимых α-аминокислот в образцах незначительно варьируется, наиболее обогащенными можно выделить образцы *O-2*, *O-4*, и *O-10*, в которых количество незаменимых аминокислот на 20–30% превышает остальные. Образец *O-5* характеризуется наименьшими количественными характеристиками по всем незаменимым аминокислотам [3].

Анализ количественного содержания заменимых аминокислот показал следующие результаты: образцы O-1, O-2, O-4 и O-10 характеризуются наибольшим количественным содержанием заменимых аминокислот (8,91%, 9,623%, 9,228% и 9,487%), а образец O-5 с наименьшим (6,465%).

Данные результаты позволяют определить наиболее ценные сорта зерна для использования в технологической линии производства отдельных видов сырья и продукции. Наиболее ценные по аминокислотному составу образцы рекомендуется использовать для приготовления продукции диетического и функционального назначения, а менее ценные образцы — на производство кондитерских и макаронных изделий.

В следующей части эксперимента было изучено влияние продолжительности гидролиза на выход суммы аминокислот.

Кислотный гидролиз, 1 М HCl, проводился в интервале времени 1, 3, 6 и 9 часов. Установлено, что наибольший выход суммы аминокислот из зернового сырья наблюдается при продолжительности гидролиза в течение 6 часов. На нейтрализацию полученного извлечения израсходовано 5 г натрия гидрокарбоната [4]. Данные по оптимизации условий проведения кислотного гидролиза зернового сырья приведены в табл. 2.

Таким образом, в работе оптимизированы условия кислотного гидролиза: к 5 г зернового сырья (точная навеска), высушенного до воздушно-сухого состояния, добавляли 35 мл воды дистиллированной и оставляли на 30 мин для набухания. Затем к набухшему сырью добавляли 65 мл 1 М раствора хлороводородной кислоты и проводили гидролиз при температуре 80–90 °С в интервале до 9 часов.

С целью изучения влияния балластных веществ на содержание суммы  $\alpha$ -аминокислот в зерновом сырье после гидролиза (в оптимизированных условиях) были приготовлены кислотные гидролизаты без очистки и с очисткой от балластных веществ с последующим проведением нингидриновой реакции. Результаты представлены на примере незаменимой аминокислоты  $\alpha$ -валин (рис. 3).

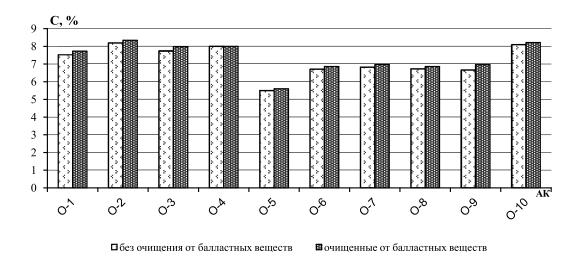


Рис. 3. Содержание незаменимых аминокислот в образцах с центрифугированием и без

Таблица 3 Суммарное содержание  $\alpha$ -аминокислот в зерновом сырье

Образцы	O-1	O-2	O-3	O-4	O-5	O-6	O-7	O-8	O-9	O-10
Содержание АК,%	14,8	10,06	15,32	15,35	10,76	13,18	13,38	13,17	13,38	15,76

По результатам диаграмм (по всем незаменимым аминокислотам) видно, что образцы подвергнувшиеся удалению балластных веществ методом центрифугирования, характеризуются содержанием незаменимых аминокислот на 1,5–2,7% больше, чем в образцах без удаления балластных веществ. Так как исходное извлечение водного экстракта зернового сырья содержит вещества, реагирующие с нингидрином (а именно пептиды и белки), влияющие на изменение значений оптической плотности, может дать ошибку результат количественного содержания α-аминокислот. Поэтому для получения достоверных результатов, отражающих количественное содержание суммы α-аминокислот в растительном сырье, необходимо проводить доочистку от сопутствующих ВМС с помощью осаждения этанолом. Результаты количественного содержания суммы α-аминокислот в исследуемых образцах представлены в табл. 3.

Статистическая обработка метода количественного определения суммы  $\alpha$ -аминокислот в зерновом сырье характеризуется достаточно высокой точностью определения и воспроизводимостью. Относительная ошибка результатов определения для всех образцов не превышает  $\pm$  3%.

В результате эксперимента были оптимизированы методы определения α-аминокислот в зерновом сырье, определены количественные характеристики незаменимых и заменимых аминокислот, а также определено их общее содержание с целью выявления образцов наиболее подходящих в технологии производства отдельных видов пищевого сырья [5].

## Выводы

В работе проведена адаптация и оптимизация спектрофотометрического метода в количественном анализе суммы свободных α-аминокислот зернового сырья. На основе исследования спектральных характеристик продуктов нингидроновой реакции подобраны условия проведения биохимических исследований водных экстрактов образцов:

- исследованы спектральные характеристики продуктов реакции α-аминокислот с 0,2% раствором нингидрина в видимой и УФ-области излучения;
- установлено, что, спектры поглощения в видимой области характеризуются наличием двух максимумов в диапазонах длин волн 380–400 и 560–580 нм, а также

- исследована УФ- область спектра поглощения продуктов реакции с 0,2% раствором нингидрина, где установлено наличие двух максимумов в диапазонах длин волн 220—240 и 250—260 нм;
- определено, что большинство продуктов реакции α-аминокислот с раствором нингидрина в воде характеризуется единым максимумом поглощения при длине волны 400 нм, что обусловливает целесообразность использования данной длины волны в качестве основной аналитической;
- с целью повышения выхода суммы α-аминокислот из зернового экстракта были оптимизированы условия проведения кислотного гидролиза при использовании 1 М раствора хлороводородной кислоты;
- оптимизированные условия проведения кислотного гидролиза повысили выход α-аминокислот из сырья до максимального показателя 94,7%;
- установлено, что наибольший выход суммы α-аминокислот из зернового сырья наблюдается при продолжительности гидролиза в течение 6 часов;
- определено, что удаление балластных веществ в образцах методом центрифугирования приводит к увеличению точности определения содержания незаменимых аминокислот на 1,5–2,7%.

## Список литературы

- 1. Виноградов В.Ю. Экологические способы сжигания хозяйственных отходов / В.Ю. Виноградов, А.А. Сайфуллин, А.М. Загртдинов // Молодой ученый. 2015. № 12. 1(92). 15 с.
- 2. Гумеров Т.Ю. Оценка качества различных сортов картофеля при их кулинарной обработке. / Т.Ю. Гумеров, О.А. Решетник // Вестник КГТУ. -2011. -№16. -178 с.
- 3. Гумеров Т.Ю. Изменение витаминного состава картофеля при различных способах кулинарной обработки. / Т.Ю. Гумеров, О.А. Решетник // Вестник КГТУ. -2011. -№ 17. -134 с.
- 4. ГОСТ 7047-89. Витамины A, C, D, B1, B2 и PP. Отбор проб, методы определения витаминов и испытания качества витаминных препаратов. Введ. 2001-01-90. М.: Изд-во стандартов, 1989.-56 с.
- 5. ГОСТ P53104-2008. Услуги общественного питания: «Метод органолептической оценки качества продукции общественного питания». Введ. 2001-01-09. М.: Изд-во Госстандарт России, 2008. 35 с.
- 6. Мурашова С.Ю. Роль и место общественного питания в современной системе хозяйствования / С.Ю. Мурашова. М: Колос, 2004. 103 с.
- 7. Роева Н.Н. Лабораторный практикум по методам исследования свойств сырья и пищевых продуктов / Н.Н. Роева, Ю.А. Клячко, В.К. Кирничная. М.: МГТА, 2000. 156 с.
- 8. Симонян А.В. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α-аминокислот в различных объектах: методические рекомендации / А.В. Симонян, Ю.С. Саламатов, Ю.С. Покровская. Волгоград, 2007. 106 с.