

К ВОПРОСУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ.

Е.Ю.Канюка, С.Г.Зиновьев*

Научно-исследовательский экспертино-криминалистический центр при УМВД Украины в Полтавской области, г. Полтава, Украина

*Институт свиноводства и агропромышленного производства Национальной академии аграрных наук, г. Полтава, Украина

Введение

Среди азотсодержащих компонентов, определяемых в мышечных экстрактах, выделяют комплекс гистидин-содержащих дипептидов (ГСД). В наибольшем количестве в мышечной ткани сельскохозяйственных животных указанные соединения представлены карнозином (β -аланил-L-гистидином) и анзерином (P-аланилметилгистидином) [1].

Не маловажную роль играют указанные дипептиды в живом организме. Карнозин способен взаимодействовать с промежуточными продуктами перекисного окисления липидов, снижая образование перекисей; образовывать с супероксид-анионом кислорода комплекс с переносом заряда, снижая его активную концентрацию; эффективно нейтрализовать гидроксид-радикал, что препятствует повреждению мембранных липидов и белков в условиях окислительного стресса. Анзерин тормозит накопление конечного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида. В среде с карнозином и анзерином максимальный уровень накопления малонового диальдегида понижается на 10–50% [2]. Карнозин имеет значительный потенциал действия в качестве природного антиоксиданта [3,4]. В мышечной ткани его содержится существенно выше, чем таковое содержание витамина С и Е [2].

Обращается внимание на то, что гистидин-содержащие дипептиды найдены исключительно в тканях животных. Установлена тканевая специфичность в размещении и накоплении указанных дипептидов. ГСД принадлежат к такому классу биомаркеров, которые используют для идентификации различных видов мяса. Например, наличие карнозина и анзерина достаточно специфично в мышцах овцы, крупного рогатого скота, лошади, кенгуру, курицы, утки и индейки. Удалось установить фальсификат сырой свинины под телятину, базируясь на данных о гистидин-содержащих дипептидах [5]. Также определялось содержание карнозина в продуктах питания на предмет их животного происхождения [6].

Для человека гистидин-содержащие дипептиды проявляют стимулирующее действие на пищеварительные железы [7]. А также формируют специфический вкус и аромат мяса [1]. Отмечается их высокая сохранность в процессе технологической переработки мясной продукции. Содержание ГСД рекомендуют использовать для оценки качества мясных изделий и определения доли мышечной ткани в колбасном фарше [8].

Целью нашей работы было доработать методику определения гистидин-содержащих дипептидов для небольшого количества биоматериала и создать алгоритм расчета содержания ГСД в мышечной ткани.

Методы исследования

Суть метода. Поскольку карнозин, как дипептид содержит в своем составе молекулу гистидина с имидазольным кольцом, он имеет ряд специфических свойств, а именно: свойство вступать в реакцию азосоединения так же как и чистый гистидин, дает специфическую цветную реакцию Паули с образованием хромогена красно-оранжевого цвета.

Предлагаемая нами методика основана на экстракции гистидин-содержащих дипептидов водным раствором хлорной кислоты, ее осаждением в виде нерастворимой соли,

с последующим центрифугированием, в полученном супернатанте с помощью цветной реакции с диазореактивом образуется окрашенное соединение, количество которого прямо зависит от содержания ГСД в исследуемом растворе.

Нами была взята за основу методика «Определение карнозина в безбелковом экстракте по диазореакции», которая была изложена в [9].

Приборы и реагенты: весы 4 класса точности, центрифуга на 5000 оборотов, pH-метр, фотоэлектроколориметр КФК-3МП, кюветы с длиной оптического пути 10 мм, фарфоровая ступка с пестиком, колба мерная на 100 см³, мерная пробирка на 10 см³, центрифужные пробирки, крупные сахарные пробирки, лед, сульфаниловая кислота (ХЧ), HCl концентрированная (ХЧ), HClO₄ молярная концентрация 0,5 моль/дм³ (ХЧ), раствор NaNO₂ свежеприготовленный с массовой долей 5%, раствор KOH с массовой долей 33%, раствор Na₂CO₃ с массовой долей 10%, дистиллированная вода.

Разрешается использовать другие способы измерительной техники, вспомогательное оборудование, реагенты и материалы, которые по характеристикам и качеству не хуже, указанных.

Приготовление реагентов.

Раствор сульфаниловой кислоты. 0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 см³ концентрированной HCl и доводят объем дистиллированной водой до 100 см³. Необходимо держать на холоде.

Раствор диазотированной сульфаниловой кислоты. В мерную колбу объемом 100 см³, которая поставлена в ледянную баню, наливают 6 см³ раствора сульфаниловой кислоты, приливают 6 см³ свежеприготовленного раствора NaNO₂. Тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем доливают еще 24 см³ раствора NaNO₂ массовой долей 5% и через 5 мин. доводят объем водой до 100 см³. Каждый раз готовят свежий раствор. Срок хранения на льду 5-6 часов. Реактив считается правильно приготовленным при отсутствии образования бурого газа при добавлении к сульфаниловой кислоте натрия нитрита.

Перед проведением исследований необходимо выдержать все растворы и исследуемые образцы в холодильнике при температуре 4–7°C.

Результаты и обсуждение

Проведение исследования.

1 Мышечную ткань освободить от жира, соединительной ткани и измельчить, отобрать навеску массой 1 г.

2 Перенести в фарфоровую ступку, добавить 5 см³ HClO₄, тщательно растереть.

3 Перенести в центрифужную пробирку и центрифугировать 20 минут при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость слить в центрифужную пробирку.

4 К осадку добавить и тщательно перемешать 1 см³ HClO₄. Центрифугировать 10 минут 5000 об/мин. Надосадочную жидкость слить к первой части.

5 К полученной надосадочной жидкости добавить по каплям KOH, довести pH до 7,0–8,0 (но не ниже 7,0), при этом выпадет белый осадок нерастворимого калия перхлората (KClO₄).

6 Полученную смесь перенести снова в центрифужные пробирки и центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин.

7 Супернатант перелить в большие (сахарные) пробирки. Довести объем до 10 см³ дистиллированной водой.

8 Дополнительно приготовить 1 пробирку с холостой пробой – 10 см³ воды.

9 Добавить в каждую пробирку по 3 см³ диазореактива и оставить на 5 минут.

10 Затем добавить 3 см³ Na₂CO₃ и очень быстро поставить кювету в ФЭК и наблюдать за экстинкцией до максимального значения. Измерение проводить против холостой пробы.

Построение калибровочного графика.

Расчет содержания гистидин-содержащих дипептидов проводят по предварительно построенному графику по гистидину. Для этого необходимо растворить в воде 0,0027 г

гистидина и довести до объема 200 см³. Затем в 10 пробирок необходимо добавить вещества в количествах указанных в таблице 1.

Затем проводят окрашивание раствора по описанной методике. По полученным результатам экстинкции строят график. Ориентировочно рабочий график может выглядеть следующим образом (рисунок 1).

Таблица 1 – Состав рабочих растворов гистидина

Объем раствора гистидина, см ³	Объем воды, см ³	Содержание гистидина, мкг	Содержание гистидина, мкмоль
0,5	9,5	5	0,032
1,0	9,0	10	0,064
1,5	8,5	15	0,097
2,0	8,0	20	0,129
2,5	7,5	25	0,161
3,0	7,0	30	0,193
3,5	6,5	35	0,225
4,0	6,0	40	0,258
4,5	5,5	45	0,290
5,0	5,0	50	0,322

Расчеты проводят с использованием встроенной в EXEL функции «ПРЕДСКАЗ». Она вычисляет или предсказывает будущее значение по существующим значениям. Предсказываемое значение – это значение Y, соответствующее заданному значению X. Значения X и Y известны. Новое значение предсказывается с использованием линейной регрессии. Показатель R² построенного калибровочного графика должен быть большим или равняться 0,95. В нашем случае, несмотря на то, что одна из «точек» выпала, он равняется 0,9792.

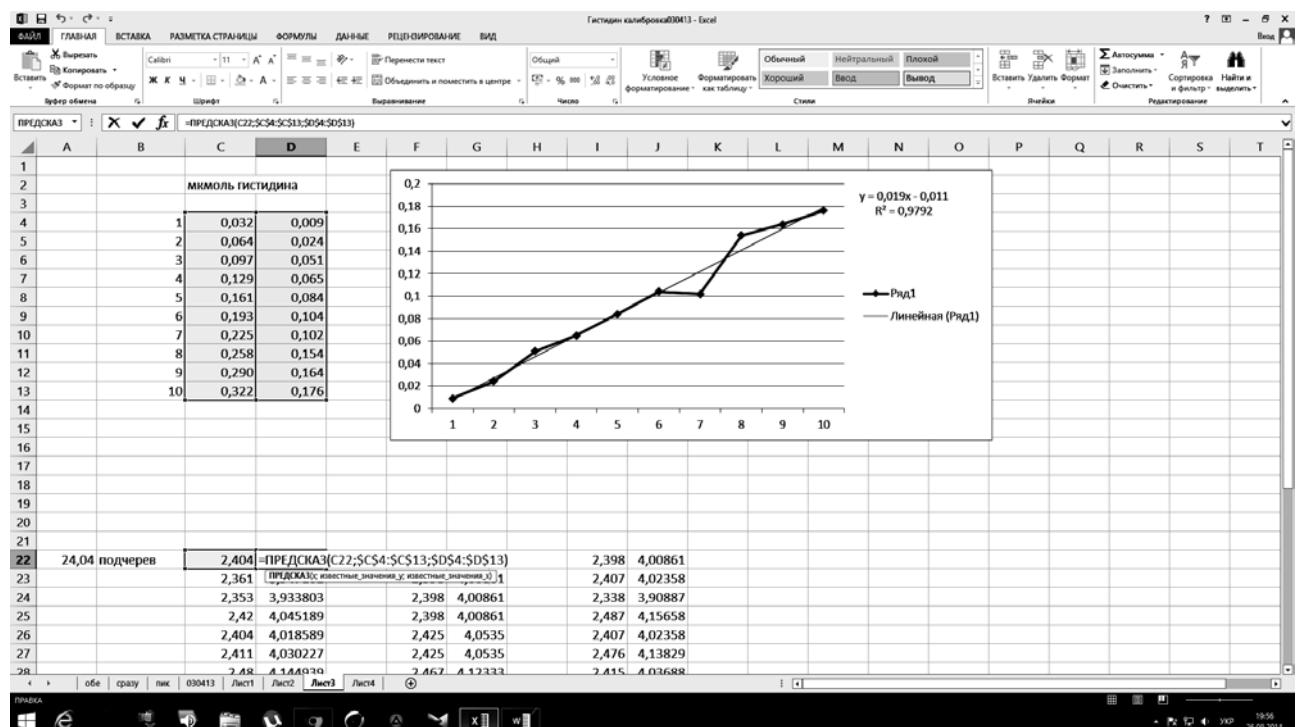


Рисунок 1 – Информационная матрица построения рабочего графика и расчета содержания ГСД

Пример, использования описанной функции для расчета содержания ГСД в подчревной мышце свиней показан на рисункок 1. Так, полученная экстинкция исследуемого образца 2,353, согласно расчетам это 3,93 мкмоль гистидин-содержащих дипептидов.

Выводы

Таким образом, нами была доработана методика для определения содержания гистидин-содержащих дипептидов в мышечной ткани, имея ее небольшое количество. Данная методика может быть полезна студентам, аспирантам и научным работникам, которые занимаются проблемами биологической ценности и фальсификации мышечной ткани (мяса).

Список литературы

- 1.Лисицын А. Теория и практика переработки мяса / А.Лисицын. – М.: ВНИИМП, 2006. – 391 с.
- 2.Болдырев А. Гистидин-содержащие дипептиды возбудимых тканей / А. Болдырев. – М.: Биоинформсервис, 2004. – С. 26–41
- 3.Бабижаев М.А. $\text{N}\alpha$ -ацетилкарнозин – природный гистидин содержащий дипептид как антиоксидант для офтальмологического применения [Электронный ресурс] / М.А. Бабижаев, В.Н. Ермакова, Ю.А. Семилетов, А.М. Деев – Режим доступа: www.ethosrussia.ru/pdf/article10.pdf (03.03.2013)
- 4.Беляев М.С. Карнозин как фактор эндоэкологической защиты организма от повреждений, вызванных окислительным стрессом: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.04 / Михаил Сергеевич Беляев. – М., 2008. – 23с.
- 5.Qinchum R. Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of mammalian meat in meat and feed products: thesis ... master of science / Qinchum Rao. – Florida, 2004. – 70 p.
- 6.Аналитическая характеристика карнозина / Д.А. Фадеева [и др.] // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2010. - № 22 (93). – Выпуск 12. – С. 179–184.
- 7.Физико-химические и биохимические основы технологии мяса и мясопродуктов. Справочник. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – С. 60–99.
- 8.Храмов В. А. Определение карнозина в мясе и мясных продуктах / В.А. Храмов, Е.Ю. Гурина // Мясная индустрия. – 2007. - № 7 (июль). – С. 65–66.
- 9.Антипова Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. – М.: Колос, 2001. – 376 с