



Науковий вісник Львівського національного університету  
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.  
Серія: Харчові технології

Scientific Messenger of Lviv National University  
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.  
Series: Food Technologies

ISSN 2519–268X print  
ISSN 2707-5885 online

doi: 10.32718/nvlvet-f10019  
<https://nvlvet.com.ua/index.php/food>

UDC 637.13.07:577.112.387-046.45-047.75

## Determination of tryptophan in milk

N. P. Kvitkovskaya<sup>1</sup>, V. M. Ischenko<sup>1✉</sup>, O. V. Kochubei-Lytvynenko<sup>1</sup>, M. V. Ischenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

### Article info

Received 04.09.2023  
Received in revised form  
05.10.2023  
Accepted 06.10.2023

National University  
of Food Technologies,  
Volodymyrska Str., 68,  
Kyiv, 01601, Ukraine.  
Tel.: +38-096-436-82-72  
E-mail: ischenko\_vn@ukr.net

Taras Shevchenko National  
University of Kyiv,  
Volodymyrska Str., 64,  
Kyiv, 01601, Ukraine.

**Kvitkovskaya, N. P., Ischenko, V. M., Kochubei-Lytvynenko, O. V., & Ischenko, M. V. (2023). Determination of tryptophan in milk. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Food Technologies, 25(100), 118–121. doi: 10.32718/nvlvet-f10019**

Tryptophan or L-tryptophan is one of the essential amino acids for the human body. An important component of the human diet, L-tryptophan is not only involved in protein synthesis in the body, but is also crucial for a number of metabolic functions. One of the important sources of tryptophan for the human body are dairy products, and their feature is the fact that milk itself contains the best ratio of tryptophan/competing amino acids, which is necessary for the synthesis of serotonin. Since tryptophan is thermolabile, one of the factors that can affect its content is heat treatment of milk. The standard and certified method for determining tryptophan in milk is high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Tryptophan belongs to fluorophores and fluoresces most strongly among all amino acids. It absorbs electromagnetic radiation with a wavelength of 290 nm and emits in the range of 300–350 nm. In the presented study, tryptophan was determined by the method of fluorescence spectroscopy without chromatographic separation of 18 samples of drinking milk from well-known Ukrainian producers of dairy products, which differed in the method of heat treatment and manufacturing technology. Fluorescence spectra were recorded on a Perkin-Elmer LS-55 fluorescence spectrometer; the content of dry skimmed milk residue and lactose in milk samples was determined on an ultrasonic milk analyzer “Ekomilk-Bond” (Bulgaria). Sample preparation of milk samples for the determination of tryptophan was carried out according to DSTU ISO 13904:2008. Research has shown that the content of tryptophan in milk samples from Ukrainian dairy producers ranges from 189.5 to 515.1 mg/l, which is basically consistent with literature data. Dependence of the method of heat treatment of milk on tryptophan content was not found. Obviously, first of all, the tryptophan content in milk will be influenced by the total protein content in the product.

**Key words:** dairy products, fluorescence, molecular absorption spectroscopy.

## Визначення триптофану в молоці

Н. П. Квітковська<sup>1</sup>, В. М. Іщенко<sup>1✉</sup>, О. В. Кочубей-Литвиненко<sup>1</sup>, М. В. Іщенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

Триптофан, або L-триптофан – одна з незамінних амінокислот для людського організму. Важливий компонент раціону людини, L-триптофан не тільки бере участь у синтезі білка в організмі, а й також має вирішальне значення для низки метаболічних функцій. Одним із важливих джерел триптофану для людського організму є молочні продукти, а їхньою особливістю є те, що саме молоко містить найкраще співвідношення триптофан / конкуруючі амінокислоти, яке необхідне для синтезу серотоніну. Оскільки триптофан є термолабільним, одним із факторів, що може впливати на його вміст, є термообробка молока. Стандартним і сертифікованим методом визначення триптофану у молоці є високоефективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням. Триптофан належить до флуорофорів і найсильніше флуоресцює серед всіх амінокислот. Він поглинає електромагнітне випромінювання з довжиною хвилі 290 нм і випромінює в діапазоні 300–350 нм. У дослідженні проведено визначення триптофану методом флуоресцентної спектроскопії без хроматографічного розділення 18 зразків пийного молока відомих українських виробників молочної продукції, які відрізнялися способом термообробки та технологією виготовлення. Спектри флуорес-

ценції записувались на флуоресцентному спектрометрі Perkin-Elmer LS-55; вміст сухого знежиреного молочного залишку та лактози у зразках молока визначали на ультразвуковому аналізаторі молока “Екомілк-Бонд” (Болгарія). Пробопідготовка зразків молока для визначення триптофану здійснювалася згідно з ДСТУ ISO 13904:2008. Як показали дослідження, вміст триптофану у зразках молока українських виробників молочної продукції коливається в межах 189,5–515,1 мг/л, що здебільшого узгоджується з літературними даними. Встановлено, що такі макрокомпоненти молока, як лактоза та сухий знежирений молочний залишок, не впливають на люмінесценцію триптофану. Залежності способу термообробки молока на вміст триптофану не виявлено. Очевидно, насамперед на вміст триптофану в молоці буде впливати загальний вміст білка у продукті.

**Ключові слова:** молочна продукція, флуоресценція, молекулярно-абсорбційна спектроскопія

## Вступ

В даний час молоко вважається одним з найбільш повноцінних і поживних продуктів у світі, а його виробництво є однією з найважливіших галузей світового сільського господарства. Тому дуже важливою процедурою у молочній промисловості є оцінка якості молока і молочних продуктів (Gandhi et al., 2020). Проте така оцінка не завжди є простим завданням, адже на склад молока впливають дуже багато чинників: ареал худоби, клімат і пори року, індивідуальні відмінності між тваринами, стадії лактації, ступінь термічної обробки молока. Також цей продукт швидко псується, а стандарти, які зазвичай використовуються при проведенні аналітичного визначення, відсутні. Інформаційні дані по визначенню складових компонентів молока з критичним аналізом впливів різних факторів на його склад в основному представлені у закордонних виданнях. Незважаючи на великий об’єм накопиченої інформації в цій галузі, розробка методик якісного та кількісного визначення різних компонентів молока є активною сферою наукових досліджень.

Використання методів спектроскопії традиційно є ефективним для оцінки якості молока і молочних продуктів, наприклад, методи інфрачервоної (ІЧ), ближньої інфрачервоної (NIR), середньої інфрачервоної (MIR) та комбінаційної спектроскопії дозволяють проводити швидкий кількісний аналіз його складу (Burke et al., 2021), проте не завжди ці методи мають достатню чутливість та селективність, що ускладнює інтерпретацію спектрів.

Метод молекулярної абсорбційної спектроскопії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах (UV–VIS) використовують для визначення ступеня термічної обробки молока, що описано в роботі (Neves et al., 2018), де кількісно визначали в зразках ультрапастеризованого молока вміст такого маркера на високотемпературну обробку, як лактулоза. Цей метод застосовується для якісного і кількісного аналізу багатьох груп хімічних сполук, що містять хромофори (Karpinska, 2004).

Наразі все більшою популярністю як скринінговий метод набуває метод молекулярної емісійної спектроскопії (флуоресцентна спектроскопія). Флуоресцентні методи дослідження є більш чутливі, ніж абсорбційна спектроскопія. Також спектри флуоресценції більш специфічні, ніж спектри інших спектроскопічних методів, оскільки флуоресцентні сполуки дуже чутливі до оточення (матриці). Для надійної реєстрації параметрів флуоресценції достатньо набагато менше речовини, що актуально для визначення багатьох маркерів в молоці та взагалі в харчових продуктах.

Флуоресцентними молекулами у молоці – флуорофорами – є рибофлавін, вітамін А, ароматичні амінокислоти, продукти реакція Майяра, хлорофіли, продукти окиснення ліпідів. Проте серед всіх протеїногенних амінокислот найсильніше флуоресціює триптофан. Визначення та вміст триптофану у харчових продуктах наразі все більше цікавить як науковців, так і споживачів, оскільки триптофан, або L-триптофан – одна з незамінних амінокислот для людського організму. Важливий компонент раціону людини, L-триптофан не тільки бере участь у синтезі білка в організмі, а й також має вирішальне значення для ряду метаболічних функцій: синтезу серотоніну (“гормону щастя”), мелатоніну (“гормону сну”), гормону росту та нікотинової кислоти (Kikuchi et al., 2020). Одним із важливих джерел триптофану для людського організму є молочні продукти: в середньому вміст триптофану в молоці 42 мг/100 г (Nayak et al., 2019). Особливістю молочних продуктів є й те, що, як зазначають автори (Dawn et al., 2009), саме молоко містить найкраще співвідношення триптофан / конкуруючі амінокислоти, яке необхідне для синтезу серотоніну.

Серед сучасних та найбільш ефективних методів кількісного визначення триптофану у молочних продуктах є високоефективна рідинна хроматографія з флуоресцентним детектуванням (Ritota & Manzi, 2020). Крім того, цей метод відповідно до ISO 13904:2016 (Fodder for animals. Method for determining tryptophan content) є стандартним і сертифікованим методом дослідження кормів для тварин і визначення загального вмісту триптофану. Заслугує на увагу валідація методики визначення триптофану методом рідинної хроматографії з тандемною маспектросметрією (Su et al., 2020). На вміст триптофану у молоці може впливати термічна обробка молока. Автори (Ayala et al., 2020) виявили зменшення інтенсивності флуоресценції при термічній обробці молока впродовж 6 годин в температурному інтервалі 70–100 °С.

В літературних джерелах відсутні методики прямого визначення триптофану у молоці методом флуоресцентної спектроскопії, а також інформація щодо вмісту триптофану в молоці українських виробників молочної продукції.

## Мета дослідження

Метою дослідження було проведення кількісного визначення триптофану в молоці українських виробників молочної продукції прямим методом молекулярної флуоресценції.

**Матеріал і методи досліджень**

В дослідженнях, які проводились у весняний період 2023 року, були проаналізовані 18 зразків питного молока майже всіх відомих українських виробників молочної продукції. Питні зразки відрізнялись між собою способом температурної обробки (пастеризоване, ультрапастеризоване, стерилізоване) та технологією виготовлення (мікрофільтроване). Жирність зразків складала 2,5 %. Назви комерційних зразків молока і відповідно – виробники в статті не вказують-

ся. Зразкам були присвоєно відповідні номери: пастеризоване молоко (П1–П6), ультрапастеризоване (УП1–УП10), стерилізоване – СТ і мікрофільтроване – МФ.

Спектри флуоресценції записувались на флуоресцентному спектрометрі Perkin-Elmer LS-55, довжина хвилі збуджуючого випромінювання становила 290 нм. Умови запису спектрів флуоресценції триптофану в молоці з включеним коректором і виключеною поляризацією на флуоресцентному спектрометрі Perkin-Elmer LS-55 наведені у таблиці 1.

**Таблиця 1**

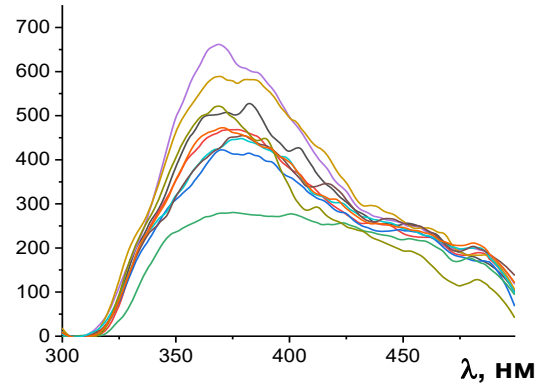
Умови запису спектрів флуоресценції

	Довжина хвилі збуджуючого світла $\lambda_{ex}$ , нм	Діапазон вимірювання, нм	Швидкість сканування, нм/хв	Ширина щілини, нм	
				d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>
Триптофан	290	300–500	300	10,0	7,5

**Результати та їх обговорення**

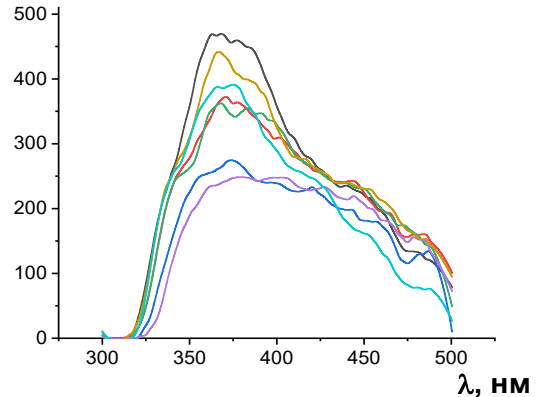
Пробопідготовка зразків молока для визначення триптофану здійснювалась згідно з ДСТУ ISO 13904:2008 (Корми для тварин. Метод визначення вмісту триптофану. ISO 13904:2005, IDT). Цей спосіб пробопідготовки передбачає лужний гідроліз зразків у середовищі барій гідроксиду. З метою вивчення можливого впливу неорганічної складової молока та лактози на флуоресценцію триптофану визначали вміст сухого знежиреного молочного залишку (СЗМЗ) та лактози у зразках молока на ультразвуковому аналізаторі молока “Екомілк-Бонд” (Болгарія). Для побудови калібрувального графіка готувалися стандартні розчини триптофану з концентрацією 1 г/л. Спектри флуоресценції зразків пастеризованого та ультрапастеризованого молока показано на рисунках 1 і 2. Вміст триптофану у досліджуваних зразках молока визначали за калібрувальним графіком. Концентрація триптофану у зразках, вміст СЗМЗ та лактози наведені у таблиці 2. Як видно із даних таблиці, вміст триптофану в досліджуваних зразках молока коливався в межах 189,5–393,8 мг/л (найнижчий вміст у зразку П5, найвищий – УП5); впливу неорганічної складової – сухого знежиреного молочного залишку та лактози на вміст не спостерігається. Впливу способу виготовлення продукту на вміст триптофану також не виявлено: серед різних груп є зразки з низьким вмістом триптофану. Очевидно, насамперед на вміст триптофану у молоці буде впливати загальний вміст білка у продукті.

**І ум.од.**



**Рис. 1.** Спектри флуоресценції зразків пастеризованого молока ( $\lambda_{ex} = 290$  нм)

**І ум.од.**



**Рис. 2.** Спектри флуоресценції зразків ультрапастеризованого молока ( $\lambda_{ex} = 290$  нм)

**Таблиця 2**

Вміст триптофану, СЗМЗ та лактози у зразках молока

Молоко	Зразок	С триптофану в молоці, мг/л	СЗМЗ, %	Лактоза, %
Пастеризоване	П1	393,8	8,15	4,4
	П2	275,1	12,5	6,75
	П3	204,6	8,1	4,38
	П4	278,0	7,54	4,07
	П5	189,5	7,68	4,14
	П6	350,5	8,8	4,72

	УП1	400,4	8,75	4,71
	УП2	376,2	4,56	4,63
	УП3	297,7	8,1	4,38
	УП4	207,0	8,54	4,6
Ультрапастеризоване	УП5	515,1	8,19	4,42
	УП6	481,4	8,83	4,77
	УП7	303,4	7,95	4,27
	УП8	311,3	8,08	4,37
	УП9	429,1	8,36	4,51
	УП10	373,8	8,58	4,64
Стерилізоване	СТ	192,8	9,33	5,11
Мікрофільтроване	МФ	420,8	8,73	4,71

### Висновки

Наведений аналіз достатньої кількості зразків молока, які відрізняються між собою за технологічними характеристиками, показав, що дана методика дає задовільні результати: визначений вміст триптофану в проаналізованих зразках збігається з літературними даними. Макрокомпоненти молока лактоза та сухий знежирений молочний залишок не впливають на люмінесценцію триптофану. Залежності способу термообробки на вміст триптофану також не спостерігається. Очевидно, насамперед на вміст триптофану в молоці буде впливати загальний вміст білка у продукті.

*Перспективи подальших досліджень.* Дану методику прямого визначення триптофану в молоці методом флуоресцентної спектроскопії бажано порівняти з арбітражним методом для оцінки її правильності та відтворюваності. Доцільним є також визначення вмісту білка у зразках молока та кореляція його вмісту з вмістом триптофану.

### Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

### References

Ayala, N., Zamora, A., Rinnan, A., Saldo, J., & Castillo, M. (2020). The effect of heat treatment on the front-face fluorescence spectrum of tryptophan in skim milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 92, 103569. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103569.

Burke, N., Zacharski, K., Adley, C., & Southern, M. (2021). A comparison of analytical test methods in dairy processing. *Food Control*, 121, 107630. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.10763.

Dawn, M., Dawes, M., Mathias, C., & Acheson, A. (2009). L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indication. *International Journal of Tryptophan Research*, 2, 45–60. DOI: 10.4137/ijtr.s.2129.

DSTU ISO 13904:2008. Fodder for animals. Method for determining tryptophan content (ISO 13904:2005, IDT). Gandhi, K., Sharma, R., Gautam, P., & Mann, B. (2020). *Chemical Quality Assurance of Milk and Milk Products*. Springer Singapore.

ISO 13904:2016(E). Animal feeding stuffs – Determination of tryptophan content.

Karpinska, J. (2004). Derivative spectrophotometer – recent applications and directions of developments. *Talanta*, 64(4), 801–822. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.03.060.

Kikuchi, A., Tanabe, A., & Iwahori, Y. (2020). A systematic review of the effect of L-tryptophan supplementation on mood and emotional functioning. *Journal of Dietary Supplements*, 18(3), 316–333. DOI: 10.1080/19390211.2020.1746725.

Nayak, B., Singh, R., Harpal, S., & Buttar, H. (2019). Role of Tryptophan in Health and Disease: Systematic Review of the Anti-Oxidant, Anti-Inflammation, and Nutritional Aspects of Tryptophan and Its Metabolites. *World Heart Journal*, 11(2), 161–178. URL: [https://www.researchgate.net/publication/336104734\\_Role\\_of\\_Tryptophan\\_in\\_Health\\_and\\_Disease\\_Systematic\\_Review\\_of\\_the\\_Anti-Oxidant\\_Anti-Inflammation\\_and\\_Nutritional\\_Aspects\\_of\\_Tryptophan\\_and\\_Its\\_Metabolites](https://www.researchgate.net/publication/336104734_Role_of_Tryptophan_in_Health_and_Disease_Systematic_Review_of_the_Anti-Oxidant_Anti-Inflammation_and_Nutritional_Aspects_of_Tryptophan_and_Its_Metabolites).

Neves, L., Marques, R., & Silva, P. (2018). Lactulose determination in UHT milk by CZE-UV with indirect detection. *Food Chemistry*, 258, 337–342. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.03.06.

Ritota, M., & Manzi, P. (2020). Rapid determination of total tryptophan in yoghurt by ultra high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Molecules*, 25(21), 5025–5036. DOI: 10.3390/molecules25215025.

Su, M., Cheng, Y., Zhang, C., Zhu, D., & Jia, M. (2020). Determination of the levels of tryptophan and 12 metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the QuEChERS method. *Journal of Dairy Science*, 103, 9851–9859. DOI: 10.3168/jds.2020-18260.