თავისუფალი ამინომჟავური პროფილის განსაზღვრა მაღალეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიის გამოყენებით

შათირიშვილი შ.ი., ბერიშვილი ლ.ა., შათირიშვილი ი.შ.

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

ცნობილია, რომ თავისუფალი ამინომჟავების პროფილი მნიშვნელოვანწილად განსაზღვრავენ ღვინის გემოსა და ფერს [1,2], ამიტომ ღვინოებში ამინომჟავური პროფილის განსაზღვრას, უფროდაუფრო დიდი მნიშვნელობა ენიჭება.

ჩვენს შემთხვევაში, ინტერესს იმსახურებს ამინომჟავების შედგენილობის ცვლილების გაზომვა, ღვინის დაძველების საწყის ეტაპზე და თბოდამუშავების სხვადასხვა პირობებში, დროის ხანგრძლივობასა და ტემპერატურაზე დამოკიდებულებით. ვინაიდან მოსალოდნელი იყო ამინომჟავების საკმაოდ დაბალი შემცველობა, ამიტომ აუცილებელი გახდა წინასვეტური დერივატიზაციის ჩატარება, ფლუერესცენციით დეტექტირებისას აღმოჩენის ზღვარის ასამაღლებლად. ტრადიციული რეაგენტი OPA (ორთოფტალის დიალდეჰიდი-2-მერკაპტოეთანოლი) მეტად მოსახერხებელია დერივატიზაციის ჩასატარებლად, მაგრამ ის არ რეაგირებს პროლინთან და ჰიდროქსოპროლინთან. ამიტომ გამოყენებულ იქნა OPA-თან რეაქციის კომბინირებული პროცედურა 3-მერკაპტოპროპიონის მჟავისა მერკაპტოეთანოლის ნაცვლად და 5-ფტორინმეთილ ქლორფორმიატის (FMOC-Cl) დამატება შესაბამისად პირველადი და მეორეული ამინომჟავების განსაზღვრის მიზნით.

ობიექტები და კვლევის მეთოდები

საანალიზოდ გამოყენებულ იქნა ღვინოების „კახეთის“ და „რქაწითელის“ როგორც დამუშავების სხვადასვა სტადიის ნიმუშები, ისე მზა ღვინოები. სულ ათი ნიმუში. ნიმუშები იფილტრებოდა 0,45μ ფორიანობის მილიპორის ფილტრში და ხდებოდა მისი 5-ჯერადი განზავება 0,1N HCl ხსნარით.

გაზომვებს ვატარებდით მაღალეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიის მეთოდით (მეთქმ) ხელსაწყოზე „ბიოტრონიკ LC 6001“, მასთან მიერთებული ტალღის სიგრძის პროგრამირების უნარის მქონე ფლუორესცენტული დეტექტორით. ქრომატოგრაფიული სვეტის ზომები იყო 2,1X200მმ, რომელიც შევსებული იყო სორბენტ C_{18} 5μ ზომის ნაწილაკებით. გამოყენებული იყო აგრეთვე 2,1X15 მმ ზომის დამცავი წინასვეტი.

მოძრავი ფაზა: პროგრამირდებოდა როგორც მოძრავი ფაზის თვისებათა ცვლილება, ისე მისი ხარჯი. ორმაგმა პროგრამირებამ (თვისებები და ხარჯი) საშუალება მოგვცა ანალიზისათვის მისაღებ დროში მიგვეღო შედეგები დაყოფის კარგი პარამეტრებით.

ელუენტი A: 0,018% ტრიეთილამინის შემცველი 20mM ნატრიუმის აცეტატის ბუფერული ხსნარი (pH 7,2 მიიღწეოდა ძმარმჟავას 2N ხსნარით).

ელუენტი B: 40% აცეტონიტრილისა და 40% მეთანოლის შემცველი 20%-იანი 100mM ნატრიუმის აცეტატის ბუფერული ხსნარი (pH 9,1 მყარდებოდა 2% ძმარმჟავას ხსნარით). გრადიენტული რეჟიმი მოცემულია ცხრ. 1-ში.

ცხრილი1. გრადიენტული რეჟიმის ცვლილების ხასიათი

დრო(წთ)	0,0	2,0	6,5	17,0	18,5	24,0	25,0
ელუენტი A	100	93	77	40	0	0	0
ელუენტი B	0	7	23	60	100	100	100
ნაკადი მლ/წთ	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45

წარმოებულების მიღება: მიკროშემრევში შეგვყავდა 5 მკლ ბორატის ბუფერი (pH 10,4) და 1 მკლ რეაგენტი OPA. ვანჯღრევდით 7-10-ჯერ, რის შემდეგაც შეგვყავდა 1 მკლ FMOC-Cl. კვლავ ვანჯღრევდით 3-4-ჯერ, რის შემდეგაც ნარევის 5მკლ შეგვყავდა ინჟექტორში. დეტექტირებას ვახდენდით ფლუორესცენციის ტალღის სიგრძის ცვლილების ფარგლებში 340ნმ/450 ნმ პირველადი ამინომჟავებისათვის და 237ნმ/340ნმ მეორეული ამინომჟავებისათვის. მეორე ოპერაციის აუცილებლობა ნაკარნახევი იყო პროლინის განმეორებითი განსაზღვრისათვის.

დეტექტირების საზღვრები ლიზინისათვის შეადგენდა 6,3 პიკომოლ/მკლ, ჰიდროქსიპროლინისთვის 6,2, პროლინისთვის 122, დანარჩენი ამინომჟავებისათვის კი საშუალოდ 1,3 პიკომოლ/მკლ. სხვადასხვა ამინომჟავებისათვის გაზომვის სიზუსტე სამ პარალელურ გაზომვას შორის მერყეობდა და შეადგენდა 12%-დან პროლინისათვის, 25%-მდე არგინინისათვის. გაზომვებს ვატარებდით ისეთი ძირითადი ამინომჟავებისათვის, როგორიცაა ტრიონინი, ჰისტიდინი+გლუტამინი, ალანინი, არგინინი, მეთიონინი და პროლინი. შედეგები მოყვანილია ცხრ. 2-ში.

ცხრილი 2. ამინომჟავური შდგენილობის ცვლილება ღვინომასალებში „რქაწითელი“ და „კახეთი“ მეთქ-ის მონაცემების მიხედვით

კომპონენტები / ღვინომასალა და თბოდამუშავების პირობები	Trio	HiS+GLU	ALN	ARG	MeT	PrO	საერთო შემცველობა
„რქაწითელი“							
40^0C 5დღე-ღამე	22,3	40,1	79,3	90,6	60,1	1001	1421
40^0C 15დღე-ღამე	26,2	43,3	83,4	93,7	63,8	1022	1433
50^0C 15დღე-ღამე	27,5	51,3	85,3	95,6	64,9	1034	1437
50^0C 25დღე-ღამე	29,1	44,6	87,7	99,3	70,0	1041	1459
„რქაწითელი“ 2 წლის	44,7	60,5	95,2	123,5	85,4	1570	2101
„კახეთი“							
40^0C 5დღე-ღამე	33,2	50,1	90,1	104,1	62,1	1113	1579
40^0C 15დღე-ღამე	35,1	53,4	93,4	107,2	64,5	1145	1623
50^0C 15დღე-ღამე	36,2	55,5	95,7	110,1	66,8	1163	1644
50^0C 25დღე-ღამე	38,3	59,1	98,3	115,2	69,7	1178	1675
„კახეთი“ 2წლის	49,6	70,3	124,7	154,1	90,1	1685	2309

ცხრ. 2-ში ასევე მოცემულია როგორც ძირითადი ამონომჟავების გაზომვის შედეგები, ისე საკვლევ ნიმუშებში მათი საერთო შემცველობა. ჩანს ამინომჟავების კონცენტრაციის ცვლილების გარკვეული კანონზომიერება, რომელიც გამოიხატება მათი კონცენტრაციების ზრდაში დაძველების დროისა და ტემპერატურაზე დამოკიდებულებით.

ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ექვსი ძირითადი ამინომჟავა წარმოადგენს ამინომჟავების საერთო შემცველობის 89-95%. ნაჩვენებია, რომ თბოდამუშავება საშუალებას იძლევა თავისუფალი ამინომჟავების შემცველობით, საკმაოდ სწრაფად მიუახლოვდეთ კლასიკური მეთოდით მიღებულ ღვინოებს.

ლიტერატურა

1. И.Ш. Шатиришвили. Хроматография грузинских вин. –Тбилиси, Ганатлеба, 1981, 71с.
2. A.M.P. Vanconcelos, H.J.C. Neves. //J. High Rezolution chromatogr. 1990, 13, 494 p.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE FREE AMINO-ACID PROFILE BY MEANS OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Shatirishvili Sh.I., Berishvili L.A. and Shatirishvili I.Sh.

Georgian Technical University

The paper deals with the changes in the free amino-acid profile in the wines “Rkatsiteli” and “Kakheti” in relation to the duration of thermal heating and temperature variation. Main amino-acids, such as threonine, istidine+glutamine, alanine, arginine, methionine and proline, were determined.

Keywords: liquid chromatography, derivatization, amino-acids, detector.