

УДК 663.252.4

**СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД
К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОСНОВНЫХ
АМИНОКИСЛОТ В ПРОДУКТАХ
ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ
И ВИНОГРАДА**

Якуба Юрий Федорович
канд. техн. наук, доцент,
зав. центром коллективного
пользования приборно-аналитический

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

Содержание свободных аминокислот в винах тесно связано с их качеством, технологией и как итог – натуральностью. Однако предпринятые ранее попытки определить взаимосвязь между содержанием свободных аминокислот и подлинностью вин привели к противоречивым результатам. Совершенствование аналитических методик определения аргинина, пролина, треонина в плодах, соках и натуральных винах посредством капиллярного электрофореза представляется актуальной и своевременной задачей. В данной статье обсуждена сложность биохимического состава плодов, винограда и продуктов их переработки, в частности виноградных вин. Состав виноградных вин отличается значительным многообразием компонентов, достигающим 800. Оценены существующие проблемы контроля качества и натуральности вин, в частности определения в них содержания аминокислот. В результате систематизации условий анализа предложен методический подход к определению аминокислот в продуктах переработки плодов и винограда с использованием метода капиллярного электрофореза.

UDC 663.252.4

**SYSTEMATIC APPROACH
TO DEFINITION OF BASIC
AMINO ACIDS IN THE PRODUCTS
OF FRUIT AND GRAPES
PROCESSING**

Yakuba Yuriy
Cand. Tech. Sci., Docent
Head of Center of Collective Use
Instrumental and Analytical

*Federal State Budget Scientific
Organization «North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture»,
Krasnodar, Russia*

The content of free amino acids in the wines is closely connected with their quality, technology of their preparing and as a result – with their nature. However the attempts undertaken earlier to define interrelation between the content of free amino acids and authenticity of wines have led to inconsistent results. Improvement of analytical techniques of definition of an arginin, proline, treonin in the fruits, juice and natural wines by means of a capillary electrophoresis is the actual and timely task. The complexity of biochemical composition of fruits, grapes and products of their processing, in particular of grapes wines is discussed in this article. The composition of grapes wines differs in the considerable variety of components reaching 800. The existing problems of control of quality and natural composition of wines, in particular of definition of amino acids content are estimated at them. As a result of systematic of the analysis conditions the methodical approach to definition of amino acids in the products of fruits and grapes processing with use of a capillary electrophoresis is offered.

В процессе проведения эксперимента выбран оптимальный состав раствора электролита для разделения модельной смеси аминокислот и их определения в исследуемых образцах. В качестве основных критериев оценки качества анализа использовали время миграции интересующего компонента, наблюдаемую подвижность ионной формы вещества и другие параметры. Выполнена оптимизация режимов проведения анализа с учетом влияния на разделение иных веществ исследуемых объектов. Статистическая обработка полученных в экспериментах данных позволила установить вариацию массовой концентрации пролина, которая для натуральных белых вин изменяется в пределах 400-1000 мг/дм³, а для натуральных красных вин – от 600 до 2000 мг/дм³. Для необработанных материалов эти показатели могут быть несколько расширены.

Ключевые слова: МИГРАЦИЯ, ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ТАРЕЛКА, ПЛОДЫ, ЭЛЕКТРОЛИТ, АМИНОКИСЛОТА

In the course of carrying out of experiment the optimal composition of the electrolyte solution for the separation of model mix of amino acids and their definition in the studied samples is chosen. The time of migration of the interesting component, the observed mobility of an ionic form of substances and other parameters were used as the main criterions of an assessment of the analysis quality. The optimization of analysis modes taking into account the influence on the separation of other substances of studied objects is executed. Statistical processing of the data obtained in the experiments allowed to establish a variation of mass concentration of proline which for natural white wines changes within 400-1000 mg/dm³, and for natural red wines it changes from 600 to 2000 mg/dm³. These indicators for the raw materials can be a little expanded.

Key words: MIGRATION, THEORETICAL PLATE, FRUITS, ELECTROLYTE, AMINO ACID

Введение. Плоды и продукция переработки сельхозсырья имеет весьма сложный биохимический состав, определяющий его пищевую ценность. Следует отметить, что виноградные вина отличаются значительным многообразием компонентов, достигающим 800 [1]. Подавляющее большинство из них присутствует в микроколичествах, однако некоторые группы веществ являются определяющими [2]. В частности для российских вин установлены диапазоны содержания, мг/дм³: альдегиды – 20-200, уксусная кислота – 300-1500, сумма высших спиртов – 80-150, сложные эфиры (в том числе этилацетат) – 150-800, винная кислота – 1500-5000, яблочная – 1000-5000, молочная – 500-5000, янтарная – 100-1500, лимонная – 800 и некоторые другие соединения [3].

Особое значение в пищевой ценности любого продукта имеют аминокислоты, прежде всего незаменимые. К действию аминокислот на организм человека относят: регуляцию скорости обмена веществ; укрепление иммунной системы и снижение уровня холестерина; защиту мышечных тканей; стимулирование выделения гормона роста; нормализацию метаболизма углеводов и нормального функционирования нервной системы [4].

Состав и содержание свободных аминокислот плодов, ягод, пищевых продуктов зависит от многих факторов. Например, большую часть аминокислот виноградного сусла составляют пролин, треонин, глутаминовая кислота, аргинин [5], яблочного, грушевого сока – пролин, арбузного сока – аргинин и т.д.

Протеин и пептиды, содержащиеся в виноградном вине, играют важную роль в характеристике вина – от аромата и полноты вкуса до обеспечения пенообразования для игристых вин [6]. Поскольку пептиды подвержены гидролизу под действием естественных кислот вина и ферментов, то этим процессом объясняется увеличение концентрации свободных аминокислот в процессе выдержки вина [7]. Содержание свободных аминокислот в винах тесно связано с их качеством, технологией и как итог – натуральностью. Однако предпринятые ранее попытки определить взаимосвязь между содержанием свободных аминокислот и подлинностью вин привели к противоречивым результатам [7].

Совершенствование аналитических методик определения аргинина, пролина, треонина в плодах, соках, натуральных винах посредством капиллярного электрофореза представляется актуальной и своевременной задачей. Большинство существующих на данном этапе методов определения аминокислот требует пробоподготовки: силанизирование, декарбоксилирование, проведение различных реакций, например, с фенилизотиоцианатом и т.д. На каждой стадии пробоподготовки не исключены погрешности и ошибки. Применение высокоэффективного капиллярного электрофо-

реза позволяет сократить до минимума довольно длительные процессы пробоподготовки в случае определения свободных аминокислот и таким образом повысить оперативность и точность измерений.

Объекты и методы исследований. Для выполнения анализа использовали системы капиллярного электрофореза серии «КАПЕЛЬ», оборудованные ультрафиолетовым детектором и кварцевым капилляром, длиной 0,5 м до детектора, внутренним диаметром 75×10^{-6} м. Детектирование аминокислот осуществляли косвенным методом, благодаря использованию в составе ведущего электролита бензимидазола.

Калибровочные растворы 10, 50, 100, 200, 500 мг/дм³ готовили на 16%-ном водном растворе этилового ректифицированного спирта из химически чистых препаратов пролина, аргинина и треонина. Растворы концентрацией более 100 мг/дм³ устойчивы в течение месяца при комнатной температуре, остальные – действительны в день выполнения калибровки.

Обсуждение результатов. На основании собственных наблюдений и имеющихся литературных данных был проведен ряд экспериментов по установлению оптимального состава электролита с использованием фосфорной кислоты и бензимидазола [8, 9].

Учитывая силу электролита, на первом этапе использовали раствор 3 мг/см³ фосфорной кислоты и 2,6 мг/см³ бензимидазола в объемном соотношении 1,9:0,1 (табл. 1). Для установления качества анализа выбрали контролируемые параметры – время миграции пиков, эффективность анализа, выражаемая через число теоретических тарелок (Тт).

Эффективность Тт существенно увеличилась при 10 кВ, достигла максимума при 11 кВ и несколько снизилась при 12 кВ. Данные табл. 1, свидетельствуют о приемлемом качестве разделения аминокислот, однако при напряжении 10 кВ резко меняются коэффициенты чувствительности

для исследуемых веществ. Коэффициенты чувствительности относительно аргинина (1) – треонин – 0,5, пролин – 0,6, и устанавливается относительно невысокий предел обнаружения – аргинина – 20, треонин – 10, пролин – 12 мг/дм³.

Таблица 1 – Миграция (мин), подвижность ($\times 10^{-4}$) и число теоретических тарелок (Тт) анализируемых веществ при использовании раствора 3,0 мг/см³ фосфорной кислоты и 2,6 мг/см³ бензимидазола в объемном соотношении 1,9:0,1

Напряжение, кВ	Параметр	Аргинин	Треонин	Пролин
8	Миграция, мин.	11,84	20,58	22,56
	Тт	94100	24000	34000
	Подвижность	3,52	2,02	1,89
9	Миграция, мин.	16,00	27,56	30,35
	Тт	62400	16270	21600
	Подвижность	3,44	2,00	1,81
10	Миграция, мин.	14,13	24,52	27,00
	Тт	100900	17400	20750
	Подвижность	3,54	2,04	1,85
11	Миграция, мин.	12,78	22,16	24,38
	Тт	104700	24250	27300
	Подвижность	3,52	2,02	1,85
12	Миграция, мин.	18,21	29,72	33,55
	Тт	51400	14200	13100
	Подвижность	3,43	2,10	1,86

Изменение наблюдаемой подвижности аминокислот от приложенного напряжения в системе – фосфорная кислота 3 мг/1 см³ воды, бензимидазол 2,6 мг/1 см³, в соотношении 2:0,1 приведены на рис. 1. Соотношение изменили для достижения улучшенных параметров разделения изучаемых компонентов.

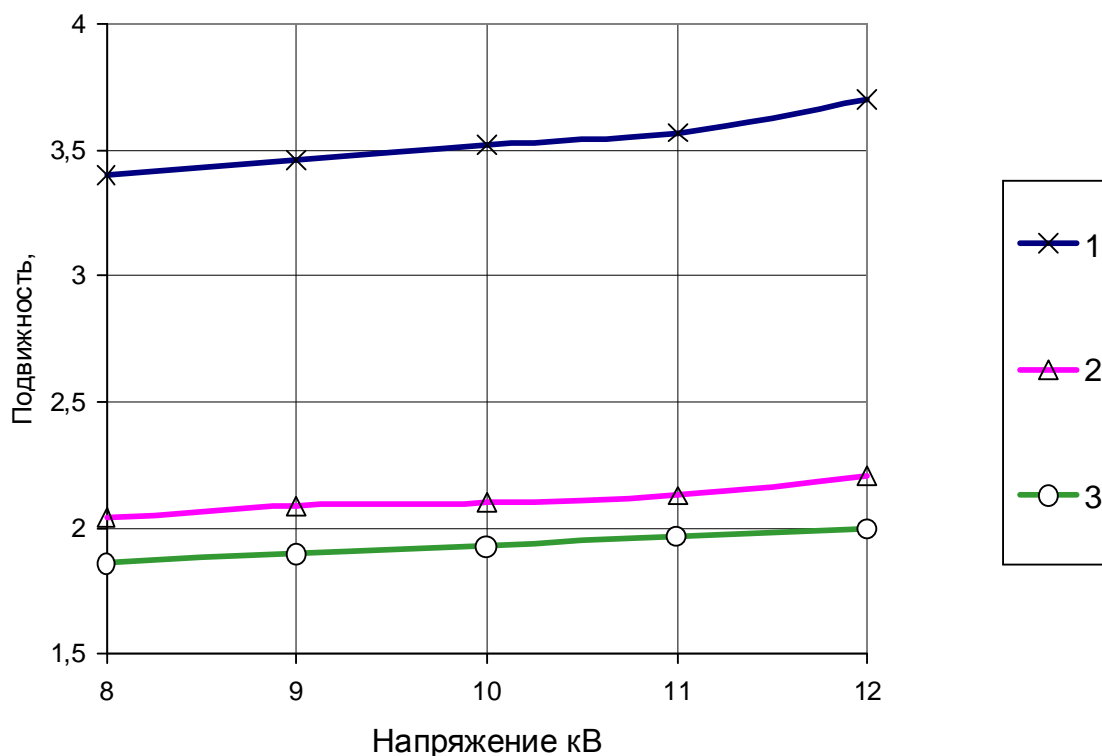


Рис. 1. Наблюдаемая подвижность ($\times 10^{-4}$) аминокислот аргинина – 1, треонина – 2, пролина – 3, в зависимости от напряжения кВ; электролит – фосфорная кислота 3 мг/1см³ воды, бензимидазол 2,6 мг/1см³, в соотношении 2:0,1

Данные рис. 1 свидетельствуют о достаточном качестве разделения аминокислот, однако наблюдалось снижение коэффициента чувствительности: аргинин (1), треонин – 1, пролин – 1,16. Соответственно снизила предел обнаружения: аргинина – 15, треонина – 15, пролина – 20 мг/дм³.

Исследование параметров пиков анализируемых веществ при использовании электролита 2,5 мг/см³ фосфорной кислоты и 3,0 мг/см³ бензимидазола в объемном соотношении 2:0,1 приведено на рис. 2.

Данные рис. 2 свидетельствуют о низком качестве разделения треонина и пролина, причем при появлении существенной разницы в подвижностях при 12 кВ увеличение шумов базовой линии значительно мешает анализу. Коэффициенты чувствительности относительно аргинина (1), треонин – 0,68, пролин – 0,89. Порог обнаружения – аргинина 8, треонин – 5, пролин – 6 мг/дм³.

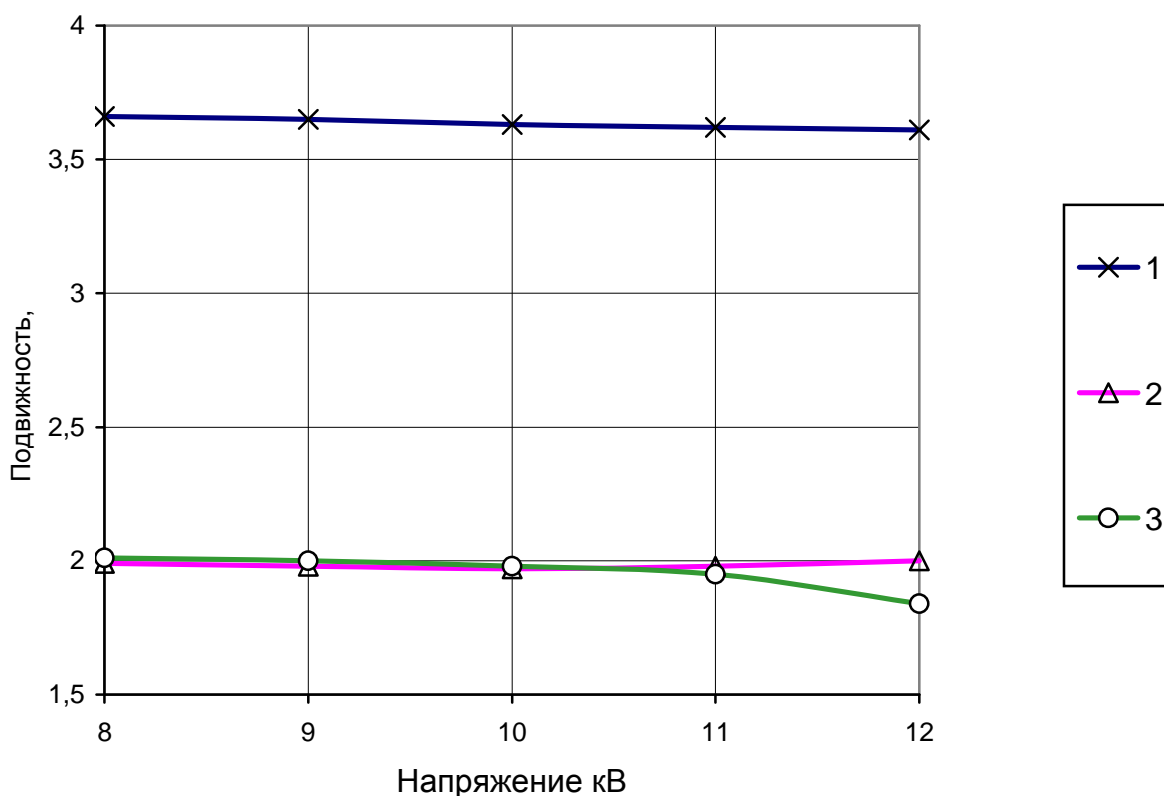


Рис. 2. Наблюдаемая подвижность ($\times 10^{-4}$) аминокислот аргинина – 1, треонина – 2, пролина – 3, в зависимости от напряжения кВ; электролит – фосфорная кислота $2,5 \text{ мг}/1 \text{ см}^3$ воды, бензимидазол $3 \text{ мг}/1 \text{ см}^3$, в соотношении 2:0,1

Следующим этапом было исследование параметров пиков анализируемых веществ при использовании раствора $2 \text{ мг}/\text{см}^3$ фосфорной кислоты и $2,6 \text{ мг}/\text{см}^3$ бензимидазола в объемном соотношении 2,5:0,1. Результаты приведены в табл. 2.

Следует отметить уменьшение теоретических тарелок (ТТ) до 1500, что может быть явно недостаточно при анализе реальных проб.

В результате выполненного исследования было получено низкое качество разделения исследуемых веществ и отмечена значительная потеря чувствительности – до $50 \text{ мг}/\text{дм}^3$. Было принято решение увеличить концентрацию фосфорной кислоты (табл. 3).

Таблица 2 – Миграция (мин), подвижность ($\times 10^{-4}$) и число теоретических тарелок (Тт) анализируемых веществ при использовании раствора 2 мг/см^3 фосфорной кислоты и $2,6 \text{ мг/см}^3$ бензимидазола в объемном соотношении 2,5:0,1

Вещество	8 кВ			10 кВ			12 кВ		
	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность
Аргинин	17,12	1750	3,67	14,33	1580	3,49	11,5	1352	3,78
Треонин	26,54	880	2,34	23,1	620	2,16	19,05	463	2,19
Пролин	27,32	840	2,28	23,24	550	2,15	19,15	420	2,19

Таблица 3 – Миграция (мин), подвижность ($\times 10^{-4}$) и число теоретических тарелок (Тт) анализируемых веществ при использовании раствора $3,3 \text{ мг/см}^3$ фосфорной кислоты и $2,6 \text{ мг/см}^3$ бензимидазола в объемном соотношении 2:0,1

Вещество	8кВ			10кВ			12кВ		
	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность
Аргинин	16,52	19450	3,78	13,74	17080	3,64	11,21	16552	3,72
Треонин	26,12	3200	2,4	22,37	3006	2,23	18,26	3546	2,28
Пролин	29,27	2750	2,13	25,17	2890	2,20	20,14	2820	2,07

Были получены стабильные коэффициенты чувствительности для анализируемых веществ при изменении напряжения анализа: аргинин (1), треонин, пролин – 0,94, причем несколько в ущерб качеству разделения компонентов. Поэтому в следующем эксперименте увеличили концентрацию бензимидазола (табл. 4).

В результате установлено ухудшение качества разделения компонентов, выразившееся в уменьшении показателя Тт до 10000, поэтому увели-

чили концентрацию фосфорной кислоты и уменьшили концентрацию бензимидазола (табл. 5).

Таблица 4 – Миграция (мин), наблюдаемая подвижность ($\times 10^{-4}$) и число теоретических тарелок (Тт) анализируемых веществ при использовании раствора $3,3 \text{ мг/см}^3$ фосфорной кислоты и $3,0 \text{ мг/см}^3$ бензимидазола в объемном соотношении 2:0,1

Вещество	8кВ			10кВ			12кВ		
	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность
Аргинин	16,54	10200	3,78	13,18	9420	3,79	10,76	8090	3,86
Треонин	25,14	6800	2,48	21,15	7240	2,36	18,65	7500	2,23
Пролин	26,45	7250	2,36	22,95	8400	2,18	20,65	10600	2,01

Таблица 5 – Миграция (мин), наблюдаемая подвижность ($\times 10^{-4}$) и число теоретических тарелок (Тт) анализируемых веществ при использовании раствора $3,5 \text{ мг/см}^3$ фосфорной кислоты и $2,6 \text{ мг/см}^3$ бензимидазола в объемном соотношении 2:0,1

Вещество	10кВ			11кВ			12кВ		
	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность	Время миграции	Тт	Подвижность
Аргинин	13,13	81500	3,81	11,72	100700	3,84	10,54	115920	3,95
Треонин	22,37	20640	2,23	19,93	24290	2,25	17,81	14130	2,34
Пролин	24,36	24760	2,05	21,74	20970	2,07	19,40	25040	2,15

Полученные результаты показали нестабильность коэффициентов чувствительности: аргинин (1), треонин – 0,61, пролин – 0,87; при 10 кВ все коэффициенты стали равными 1. Кроме того, наблюдали слишком большие тепловые флуктуации сигнала при концентрации анализируемых веществ 50 мг/дм^3 , что ухудшало пределы обнаружения.

Обобщение проведенных исследований позволило установить оптимальное положительное напряжение для разделения модельной смеси, охарактеризованное наблюдаемой подвижностью аминокислот, которое составило 8 кВ. Подбор напряжения для выполнения определения при установленном рН электролита позволил регулировать длительность процесса анализа и в то же время обеспечить необходимое качество разделения.

Таблица 6 – Миграция (мин), подвижность ($\times 10^{-4}$) и число теоретических тарелок (ТТ) анализируемых веществ при использовании раствора $2,5 \text{ мг/см}^3$ фосфорной кислоты и $2,6 \text{ мг/см}^3$ бензимидазола в объемном соотношении 2:0,1

Напряжение, кВ	Параметр	Аргинин	Треонин	Пролин
8	Миграция, мин	17,9±0,3	31,3±0,8	34,6±0,8
	ТТ	34600	28200	31000
	Подвижность	3,49	2,0	1,85
9	Миграция, мин	15,46±0,3	26,72±0,7	29,64±0,7
	ТТ	53196	18432	45900
	Подвижность	3,55	2,0	1,85
10	Миграция, мин	14,1±0,2	24,8±0,5	27,3±0,5
	ТТ	35200	25450	29570
	Подвижность	3,54	2,0	1,83
11	Миграция, мин	12,11±0,2	21,06±0,5	23,40±0,5
	ТТ	44380	18760	24060
	Подвижность	3,72	2,14	1,93
12	Миграция, мин	11,45±0,2	20,04±0,5	22,1±0,5
	ТТ	46500	38300	28800
	Подвижность	3,66	2,09	1,89

Ориентировочное время выхода аминокислот при рН 3,5 и напряжении 8 кВ: пролин – 23 мин, треонин – 21 мин, аргинин – 14 мин. Число Тт для каждого компонента составило 30-50 тысяч. Оптимальные условия анализа: рН электролита – 3,5, положительное напряжение 8 кВ, фосфорной кислоты 2,5 мг/1см³ воды, с добавкой бензимидазола 2,6 мг/1см³, в соотношении 2:0,1; контролируемые параметры показаны в табл. 6.

Данные табл. 6 показали неизменность коэффициентов чувствительности, то есть результаты количественного расчета не зависели от дрейфа времени миграции пика. Для 11 кВ установлен максимум значения подвижности аминокислот. При анализе под напряжением 12 кВ флуктуации базовой линии увеличились в 5 раз, в сравнении с более низким напряжением и возросли коэффициенты чувствительности: аргинин (1), треонин – 2,33, пролин – 2,75. Порог обнаружения – аргинина 3, треонин – 6, пролин – 9 мг/дм³.

Увеличение дозировки бензимидазола до 0,2 (то есть соотношение 2:0,2 фосфорной кислоты и бензимидазола) увеличивало время миграции компонентов на 4-5% в сравнении с исходным, уменьшало число теоретических тарелок и не изменяло чувствительность. Линейность сохранялась до 1000 мг/дм³ включительно. Электрофоретическая подвижность аминокислот составила ($10^4 \text{ см}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$): пролина – 3,1, треонина – 2,7, аргинина – 2,5.

В оптимизированных условиях анализа проведено исследование нескольких сотен проб: сок, вино или виноматериал разбавляли в 2 раза дистиллированной водой, центрифугировали 3-5 минут при 6000об⁻¹, перенесли в прибор и производили дозирование пробы пневматическим методом под давлением 30 мбар в течение 10 секунд.

Устанавливали время анализа 30 минут, положительное напряжение 8 кВ, сила тока составляла 65±8 мкА. Измерения изучаемых растительных образцов показали, что аминокислоты элюируются из проб после положи-

тельно заряженных неорганических и органических катионов, сахаров и различных групп фенольных соединений.

В случае изменения времени миграции пиков аминокислот и сложности однозначной идентификации аминокислот в пробе применяют метод добавки вещества, идентификация которого затруднена. Установлена погрешность определения концентраций аминокислот, табл. 7.

Таблица 7 – Проверка правильности и воспроизводимости результатов определения аминокислот (n=5, $\alpha=0,05$)

Аминокислота	Введено	Найдено, мг/дм ³	S _r , %
Пролин	5	4,9	2,2
	20	19,7	1,6
Треонин	10	9,9	3,6
	20	20,5	2,7
Аргинин	5	5,1	3,1
	20	20,2	2,0

Согласно табл. 7, S_r не превышает 4 %, что свидетельствует о достаточной надежности разработанной методики.

Выводы. Предложен методический подход к определению аминокислот в продуктах переработки плодов и винограда. В ходе решения поставленной задачи выбран оптимальный состав раствора электролита для разделения модельной смеси аминокислот и их определения в реальных образцах; выполнена оптимизация напряжения анализа с учетом влияния на разделение мешающих веществ реальных объектов.

Статистическая обработка полученных в ходе анализа результатов позволила установить, что массовая концентрация пролина в натуральных белых винах изменяется в пределах 400-1000 мг/дм³, а в натуральных красных винах – 600-2000 мг/дм³.

Литература

1. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. Wine chemistry and biochemistry. Shringler. New York. 2009. 728p.
2. Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. Handbook of Enology. Vol. 2. West Susses. England. John Wiley & Sons Ltd, 2006. 438p.
3. Шольц, Е.П. Технология переработки винограда / Е.П. Шольц, С.В. Пономарев – М.: Агропромиздат, 1990.– 447 с.
4. Родопуло, А.К. Основы биохимии виноделия / А.К. Родопуло.– М: Легкая и пищевая промышленность, 1983.– 240 с.
5. Агеева, Н.М. Идентификация и экспертиза виноградных вин и коньяков / Н.М. Агеева, Т.И. Гугучкина.– Краснодар, 2008.– 174 с.
6. Панасюк, А.Л. Контроль качества и подтверждение аутентичности вин / А.Л. Панасюк, В.В. Жирова, А.А. Шилкин // Стратегия развития пищевой промышленности – защита прав потребителя и рынка от контрафактной, фальсифицированной и некачественной продукции.– МГУТУ, 2007.– С. 173-175.
7. Herbert P., Barros P., Alves A. Detection of port wine imitation by discriminant analysis using free amino acids profiles // Amer. J. Enol. And Viticult. – 2000. – 51.– №3. P. 262-268.
8. Li, S.F. Capillary electrophoresis / Amsterdam: Elsevier. Sc. Publ., 1992, 608p.
9. Беленький, Б.Г. Высокоэффективный капиллярный электрофорез / Б.Г. Беленький. – СПб.: Наука, 2009. – 320с.

References

1. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. Wine chemistry and biochemistry. Shringler. New York. 2009. 728p.
2. Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. Handbook of Enology. Vol. 2. West Susses. England. John Wiley & Sons Ltd, 2006. 438p.
3. Shol'ts, E.P. Tehnologiya pererabotki vinograda / E.P. Shol'ts, S.V. Ponomarev – M.: Agropromizdat, 1990.– 447 s.
4. Rodopulo, A.K. Osnovy biohimii vinodeliya / A.K. Rodopulo.– M: Legkaya i pischevaya promyshlennost', 1983.– 240 s.
5. Ageeva, N.M. Identifikatsiya i ekspertiza vinogradnyh vin i kon'yakov / N.M. Ageeva, T.I. Guguchkina.– Krasnodar, 2008.– 174 s.
6. Panasyuk, A.L. Kontrol' kachestva i podtverzhdenie autentichnosti vin / A.L. Panasyuk, V.V. Zhirova, A.A. Shilkin // Strategiya razvitiya pischevoy promyshlennosti – zaschita prav potrebitelya i rynka ot kontrafaktnoy, fal'sifitsirovannoy i nekachestvennoy produktsii.– MGUTU, 2007.– S. 173-175.
7. Herbert P., Barros P., Alves A. Detection of port wine imitation by discriminant analysis using free amino acids profiles // Amer. J. Enol. And Viticult. – 2000. – 51.– №3. P. 262-268.
8. Li, S.F. Capillary electrophoresis / Amsterdam: Elsevier. Sc. Publ., 1992, 608p.
9. Belen'kiy, B.G. Vysokoeffektivnyj kapillyarnyj elektroforez / B.G. Belen'kiy. – SPb.: Nauka, 2009. – 320s.