

УДК 543.544:546.9

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ИОНОЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СУЛЬФИРОВАННОМ СВЕРХСШИТОМ ПОЛИСТИРОЛЕ

П. Н. Нестеренко, П. А. Кебец

*(кафедра аналитической химии, e-mail: PavelN@analyt.chem.msu.ru)*

**Изучена возможность применения сульфокатионообменника на основе сверхсшитого полистирола для ионоэкслюзивной хроматографической определения органических кислот в квасах и рассолах. Определено содержание молочной кислоты в квасе, огуречном и капустном рассолах, составившее  $6,2 \pm 0,4$ ,  $43,3 \pm 2,5$  и  $16,2 \pm 0,9$  мг/мл соответственно.**

Многие продукты питания (кефир, простокваша, сыр, квашенные овощи), напитки (вино, пиво, квас) являются продуктами ферментативного брожения и содержат в своем составе широкий спектр органических кислот, среди которых важное место занимает молочная кислота. Выделяют несколько типов брожения (молочнокислое, спиртовое, маслянокислое и др.), в которых содержание молочной кислоты является показателем качества продукции. Ввиду большого разнообразия органических соединений в указанных продуктах, наиболее перспективными для определения молочной кислоты являются различные варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), включая ионный (ИХ) [1], ион-парный (ИПХ) [2], ионоэкслюзивный (ИЭХ) [3] и обращенно-фазовый (ОФХ) [4]. Хроматографическое определение молочной кислоты ограничено эффективностью и селективностью отделения соответствующего пика от пиков других органических кислот, а также некоторых слабоионизированных и нейтральных соединений, например углеводов и спиртов. Наиболее успешно для этих целей применяется ИЭХ.

В качестве сорбентов для ИЭХ чаще всего используют сульфокатионообменники в  $H^+$ -форме на основе полистирол-дивинилбензола (ПС-ДВБ) низкой степени сшивки и высокой ионообменной емкости. В ИЭХ обычно применяют большие по диаметру 8–12 мм и длиной до 30 см колонки [5]. Это приводит к увеличению времени и стоимости анализа. Ранее нами была показана перспективность использования сульфокатионообменника на основе сверхсшитого полистирола (ССПС) в качестве сорбента для ионоэкслюзивного разделения органических кислот [6] и нейтрального ССПС в ионной хроматографии анионов [7, 8]. ССПС имеет высокую удельную поверхность, обеспечивающую высокую сорбционную емкость и скорость массообмена. Высокая степень сшивки обеспечивает механическую прочность матрицы и малое набухание в органических растворителях, что позволяет разделять

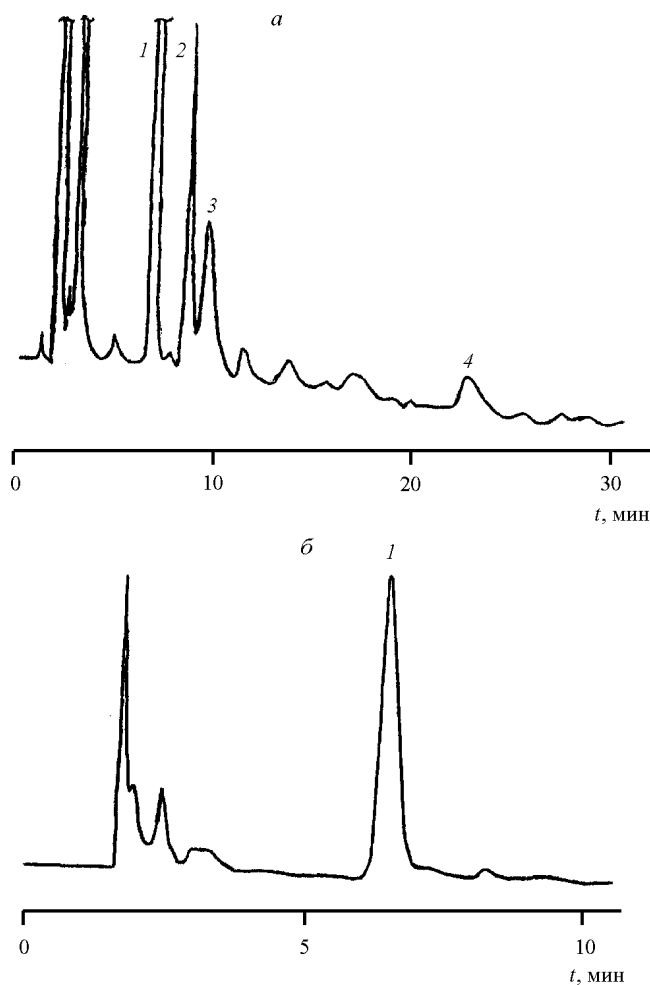


Рис. 1. Хроматограммы квасов: *a* – натуральный квас; кислоты: 1 – молочная; 2 – уксусная, этанол; 3 – янтарная; 4 – fumarовая; *б* – Искусственный квас на основе лимонной кислоты; кислоты: 1 – лимонная (сорбент – ССПС-сульфо; температура  $65^\circ$ ; объемная скорость элюента 1,0 мл/мин; элюент – 10 мМ серная кислота с 4 об.% ацетонитрила)

компоненты при высоких объемных скоростях элюента и использовать элюенты, содержащие органический растворитель [8, 9]. Таким образом, использование в качестве сорбента сульфокатионита на основе ССПС позволило уменьшить время анализа за счет увеличения объемной скорости элюента и снизить его стоимость за счет использования меньших по размеру колонок.

Целью данной работы являлось изучение возможности практического применения сульфокатионообменника на основе ССПС для количественного определения молочной кислоты методом ИЭХ со спектрофотометрическим детектированием в пищевых продуктах и напитках.

### Экспериментальная часть

**Аппаратура.** Работу выполняли на хроматографе для ВЭЖХ, состоящем из насоса высокого давления, модель 114 М (*Beckman*, США), спектрофотометрического детектора с переменной длиной волны «*microUVIS20*» (*Carlo Erba Instruments*, Италия), петлевого дозатора модель 7125 (*Rheodyne*, США) с петлей объемом 20 мкл, воздушного термостата (СВО *Industrial electronics*, Австрия) и компьютерной системы обработки хроматографических данных («*Экохром*», Россия). В работе использовали хроматографическую колонку длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм из нержавеющей стали, заполненную сульфированным ССПС с ионообменной емкостью 0,05 ммоль/г и размером частиц 5 мкм. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл. При анализе объектов проводили предварительную фильтрацию пробы через мембранный фильтр *Gelman Acrodisc* (*Gelman Laboratory*, США) с диаметром пор 0,2 мкм.

**Реагенты.** Элюент – раствор серной кислоты готовили из фиксанала (*Реахим*, Россия). В работе использовали ацетонитрил («о.с.ч.», сорт 1, *Криохром*, Россия). В качестве сорбатов использовали водные растворы органических кислот, а также этанола квалификации «х.ч.» (*Реахим*, Россия). Растворы исследуемых соединений готовили ра-

створением соответствующих навесок и аликвот в деионизированной воде. При построении градуировочного графика использовали D,L-лактат лития квалификации «ч.д.а.» (*Sigma*, США).

### Обсуждение результатов

Контроль за содержанием молочной кислоты в продуктах питания и напитках имеет важное значение для оценки степени завершенности процесса брожения (молочнокислый тип брожения) и оценки возможной порчи кваса, связанной с развитием побочных типов брожения (уксуснокислое, маслянокислое) [10]. Квас – традиционный русский слабоалкогольный напиток – является продуктом незаконченного молочнокислого и спиртового брожения хлебного суслу. В зависимости от сорта, условий приготовления, брожения и хранения состав кваса весьма лабилен. В нем содержится 93–98% воды, 0,21–0,58% молочной кислоты, 0,04–0,09% уксусной кислоты, 0,3–1,2% этанола, 0,03–0,35% угольной кислоты, 0,2–0,4% азотистых веществ, 0,20–5,21% сахара, 0,3–0,8% декстринов, 0,1–0,2 % минеральных веществ, а также витамины и ферменты [10].

Согласно [6], количественное определение молочной кислоты проводили при 65° и использовании в качестве элюента 10 mM раствора серной кислоты с содержанием ацетонитрила 4 об.% при объемной скорости элюента 1,0 мл/мин. Объем пробы составлял 20 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм. В описанных выше условиях был проведен анализ образца кваса, получившегося в результате натурального брожения (рис. 1, а), и образца искусственного кваса на основе подкислителя (лимонной кислоты) (рис. 1, б). В натуральном квасе были идентифицированы хроматографические пики, соответствующие молочной, уксусной, янтарной, фумаровой кислотам и этанолу. На хроматограмме искусственно приготовленного кваса отчетливо заметен пик лимонной кислоты, что соответствует данным производителя.

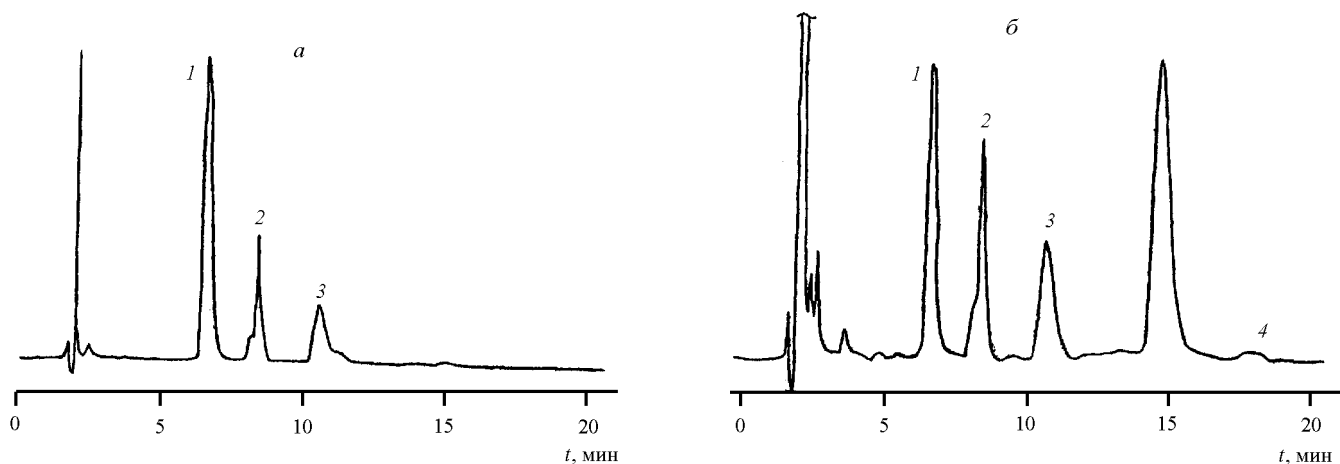


Рис. 2. Хроматограммы рассолов: а – огуречный рассол; кислоты: 1 – молочная; 2 – уксусная, этанол; 3 – янтарная; б – капустный рассол; кислоты: 1 – молочная, 2 – уксусная, этанол, 3 – янтарная, 4 – пропионовая (условия разделения см. в подписи к рис. 1)

Огуречный и капустный рассолы являются продуктами молочнокислого брожения [11], причем количество молочной кислоты в них определяется, в первую очередь, степенью завершенности процесса брожения. В огуречном рассоле (рис. 2, а) были идентифицированы хроматографические пики, соответствующие молочной, уксусной, янтарной кислотам, а также этанолу. В капустном рассоле (рис. 2, б) идентифицированы хроматографические пики, соответствующие молочной, уксусной, янтарной и пропионовой кислотам, а также этанолу.

Из уравнения градуировочного графика было рассчитано содержание молочной кислоты в исследуемых объектах. Так, содержание молочной кислоты (мг/мл) составило:  $6,2 \pm 0,4$  (квас),  $43,3 \pm 2,5$  (огуречный рассол),  $16,2 \pm 0,9$  (капустный рассол) .

Следует отметить, что определенное содержание молочной кислоты в квасе согласуется с литературными данными [10]. Диапазон линейности градуировочного графика 0–50 мг/мл. Предел обнаружения молочной кислоты, рассчитанный по 3-s критерию, равен 3 мкг/мл. Мешающее влияние в этих условиях оказывает присутствие лимонной кислоты.

Таким образом, сульфокатионообменник на основе ССПС перспективен для определения органических кислот в квасах и рассолах. В натуральном квасе идентифицированы хроматографические пики, соответствующие молочной, уксусной, янтарной, фумаровой кислотам и этанолу, в огуречном рассоле – молочной, уксусной, янтарной кислотам и этанолу, в капустном рассоле – молочной, уксусной, янтарной и пропионовой кислотам и этанолу.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miura Y., Ohno H., Koh T. // Bunseki Kagaku. 1994. **43**. P. 745.
2. Leubhn M., Hartmann A. // J. Chromatogr. 1993. **629**. P. 255.
3. Lesh M.J., Wilkinson E.L., Zolfaghari M.R., Schreiber M.A. // J. Liq. Chromatogr. 1993. **16**. P. 2415.
4. Ohara H., Hiraga T., Katasho I., Inuta T., Yoshida T. // J. Ferm.Bioengineering. 1993. **75**. P. 470.
5. Медведь А.Л., Иванов А.А., Шнигуш О.А. // ЖАХ. 1996. **51**. С. 1055.
6. Нестеренко П.Н., Кебец П.А., Волгин Ю.В. // ЖАХ. 2001. **56** (в печати).
7. Penner N.A., Nesterenko P.N. // Anal. Com. 1999. **36**. P. 199.
8. Penner N.A., Nesterenko P.N. // J. Chromatogr. A. 2000. **884**. P. 41.
9. Penner N.A., Nesterenko P.N. et. al. // Chromatographia. 1999. **50**. P. 611.
10. Большая медицинская энциклопедия. 3-е изд., т. 10. М., 1979.
11. Кретович В.Л. Основы биохимии растений. М., 1971.

Поступила в редакцию 01.06.01