

УДК 546.65:541.49:543.426

С. В. БЕЛЬТЮКОВА, О. И. ТЕСЛЮК,
Т. М. ЛИТВИНА, Е. О. ЛИВЕНЦОВА, А. В. ЕГОРОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕГИДРАЦЕТОВОЙ КИСЛОТЫ В ВИНАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Вивчена можливість визначення дегідрооцтової кислоти (ДГК) у винах без попереднього виділення консерванту. Розроблена проста та надійна методика кількісного визначення ДГК в винах методом тонкошарової хроматографії. Як проявляючий розчин запропоновано використовувати хлорид тербію (III), що зумовлює появу на хроматографічній пластинці сенсibilізованої люмінесценції іону лантаніду в присутності ДГК. Для інтенсифікації пробопідготовки використовували ультразвук (УЗ).

The possibility of the determination of dehydroacetic acid (DHA) in vines without preliminary isolation of the preservative was investigated. The simple and reliable method of the quantitative determination of DHA by thin-layer chromatography method in vines was developed. The terbium chloride (III) was proposed as an enhanced solution, that provokes lanthanide-sensitized luminescence, at DHA presence on the chromatography plate. Ultra sound (US) was used for intensification of preparation of probe.

Дегидрацетовая кислота используется в качестве консерванта в пищевой промышленности и по антисептическому действию значительно эффективнее таких консервантов как сорбиновая и бензойная кислоты. При концентрации 0,0003 % она подавляет жизнедеятельность плесневых грибов и дрожжей, но не задерживает рост молочнокислых и споровых анаэробных бактерий. ДГК находит применение для защиты таких пищевых продуктов как яблочный сок, сыры, маргарины, выпечные изделия, желе, повидла, свежие овощи и фрукты, а также в виноделии [1–3].

Для определения ДГК в винах и сулах применяют метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) после предварительного экстракционного выделения кислоты. Методика позволяет давать полуколичественную оценку содержания кислоты в вине. Известны также объемный и спектрофотометрический методы определения ДГК [4–6]. Однако первый метод не является чувствительным, а второй имеет низкую избирательность. Кроме того, при анализе вин, насыщенных углекислым газом, необходимо проводить дегазацию пробы, заключающуюся в ее нагревании при перемешивании (20 мин и более), что усложняет и удлиняет анализ.

Целью работы являлась разработка простой и надежной методики количественного определения дегидрацетовой кислоты в винах методом ТСХ. В качестве проявляющего раствора предложено использовать хлорид тербия (III), что обуславливает появление на хроматографической пластинке сенсibilизированной люминесценции иона лантанида в присутствии ДГК, которая появляется вследствие внутри-молекулярной передачи энергии возбуждения от последней к иону Tb(III). Для интенси-фикации пробоподготовки использован ультразвук (УЗ).

Экспериментальная часть

Раствор ДГК (0,01 моль/л) готовили растворением точной навески препарата в этаноле. Синтез и очистку ДГК осуществляли по методике [7]. Хлорид тербия готовили растворением высокочистого оксида (99,99 %) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию Tb(III) устанавливали комплексонометрическим титрованием. Растворы поверхностно-активных веществ готовили путем растворения соответствующих навесок в воде. Использовали растворители (бензол, ацетон, метанол, этанол) марки х. ч.

Для хроматографирования использовали пластинки для тонкослойной хроматографии марки Sorbfil – UV 254 (сорбент – силикагель СТХ-1ВЭ с люминесцентным индикатором для УФ 254; связывающее вещество – силикагель; подложка – алюминиевая фольга).

Люминесценцию комплексов Tb(III) с ДГК на пластинке регистрировали на спектрографе ИСП-51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 в области 520–570 нм с максимумом при 545 нм. Люминесценцию возбуждали светом ртутно-кварцевой лампы СВД-120 А, снабженной светофильтром УФС-2, pH растворов измеряли с помощью иономеров ЭВ-74. В работе использовали ультразвуковой диспергатор УЗДМ-А.

Результаты и их обсуждение

Известно, что дегидрацетовая кислота способна к образованию комплексных соединений со многими металлами [8], поэтому в винах она очевидно находится в виде комплексных соединений. Об этом свидетельствует и тот факт, что при нанесении вина на хроматографическую пластинку ДГК остается на старте. В связи с этим была использована предварительная ультразвуковая обработка вина.

Пробу вина (20 мл) подвергали воздействию УЗ-колебаний с частотой колебаний 22 кГц, интенсивностью 6 Вт/см² в течение 2 мин (рис. 1).

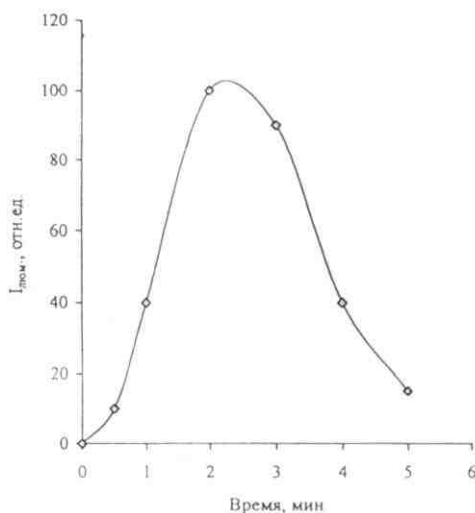


Рис. 1. Зависимость относительных значений $I_{\text{люм}}$ комплексов ДГК с Tb(III) на пластинке от времени воздействия ультразвука:
 $C_{\text{ДГК}} = 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

При обработке вина в течение 4 мин, очевидно, происходит разрушение не только комплексного соединения, но и частично самой кислоты, так как интенсивность люминесценции ДГК на пластинке после такой обработки значительно уменьшается.

С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам (Silufol – UV 254, Sorbfil – UV 254, СТХ-1А). Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки Sorbfil, на которых изображение пятен дегидрацетовой кислоты было более четким и пригодным для количественного анализа.

Изучено несколько элюирующих систем (уксуснокислый аммоний–метанол; бензол–метанол; бензол–ацетон–уксусная кислота; бензол–уксусная кислота; толуол–ацетонитрил–метанол–муравьиная кислота; бензол–диоксан–уксусная кислота). В качестве оптимальной системы растворителей выбрана система бензол–ацетон–уксусная кислота в соотношении 100 : 50 : 1. Подвижность (R_f) ДГК в этих условиях составляет 0,54.

Изучено влияние объема пробы, наносимого на пластинку. На пластинку наносили 0,5 – 6,0 мкл пробы (рис. 2).

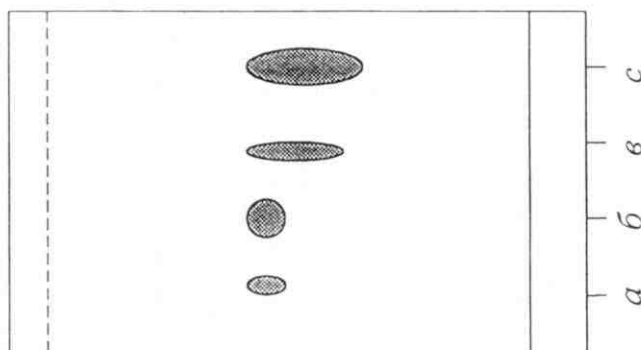


Рис. 2. Влияние объема наносимой пробы на размывание хроматографической полосы:
а – 0,5 мкл; б – 2 мкл; в – 4 мкл; г – 6 мкл

Как видно из рисунка, наилучший результат достигался при нанесении пробы объемом 2 мкл.

В качестве оптимального проявителя необходимо было выбрать реагент, избирательный и чувствительный по отношению к ДГК. Для обнаружения ДГК нами предложен хлорид тербия (III). Известно [9], что ионы Tb(III) в комплексах с дегидрацетовой кислотой обладают интенсивной люминесценцией. Было установлено, что люминесцентные свойства комплекса сохраняются на некоторых твердых материалах, в том числе и на силикагеле. Интенсивность люминесценции Tb(III) на пятне хроматограммы зависит от концентрации иона лантанида в проявляющем растворе (табл. 1).

Таблица 1

$C_{Tb^{3+}}$, моль/л	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
$I_{\text{лтом}}$, отн. ед.	5	20	65	100	100	90

Как видно из таблицы, наибольшая $I_{\text{люм}}$ наблюдается при использовании проявляющего раствора с концентрацией Tb(III) $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Наличие поверхностно-активных веществ (ПАВ) в проявляющем растворе оказывает влияние на $I_{\text{люм}}$ сорбата Tb(III) в комплексе с ДГК. В табл. 2 приведены относительные значения $I_{\text{люм}}$ сорбата Tb(III) на хроматограмме в присутствии различных ПАВ.

Таблица 2

ПАВ	$I_{\text{люм}}$, отн. ед.
Этоний	50
Цетилтриметиламмоний хлорид	65
Цетилпиридиний хлорид	102
Октадецилпиридиний хлорид	49
Додецилсульфат натрия	22
Тетрадецилсульфат натрия	37
Цетилсульфат натрия	33
Додецилсульфонат натрия	29
Твин – 80	150
Тритон X-100	35

Как видно из таблицы, наибольшее возрастание $I_{\text{люм}}$ (в 5 раз) вызывает неионогенное ПАВ Твин – 80. Очевидно, указанное ПАВ способствует дегидратации образующегося комплекса и тем самым снижению безызлучательных потерь энергии возбуждения, что ведет к увеличению интенсивности люминесценции иона Tb(III).

$I_{\text{люм}}$ сорбата зависит также от количества ПАВ в проявляющем растворе. Наибольшая $I_{\text{люм}}$ достигается при концентрации Твин – 80, равной $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л (табл. 3).

Таблица 3

Концентрация Твин – 80, моль/л	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
$I_{\text{люм}}$, отн. ед.	14	27	55	90	100	68	42

Методика выполнения анализа

Пробу вина (20 мл) подвергают воздействию ультразвука, как указано выше. 2 мкл анализируемого вина после ультразвуковой подготовки наносят микрошприцем на линию старта пластинки размером (25×80) мм. Параллельно на пластинку наносят стандартный раствор ДГК. В качестве стандартного используют раствор ДГК с концентрацией $5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (в зависимости от предполагаемого содержания ДГК в образце) в водно-этанольном растворе (2 : 1). Пластинку подсушивают и помещают в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь бензола, ацетона и уксусной кислоты в соотношении 100 : 50 : 1). Когда фронт растворителя достигает высоты 70 мм, пластинку извлекают из камеры и отмечают положение фронта растворителя. Полученную хроматограмму высушивают и равномерно обрабатывают проявителем – раствором хлорида тербия ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и Твин – 80 ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л), после чего снова высушивают. Идентификацию ДГК на пластинке проводят по появлению зеленой люминесценции Tb(III) под люминесцентной лампой, визуально сравнивая $I_{\text{люм}}$ пробы и стандарта.

Количественное определение ДГК проводят по калибровочному графику, для построения которого поступают следующим образом. На пластинку наносят различные количества стандартного раствора ДГК и далее проводят хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезают пятна с ДГК, помещают в кювету для твердых образцов, интенсивность люминесценции измеряют при $\lambda=545$ нм. По полученным данным $I_{\text{лом}}$ Tb(III) – концентрация ДГК строят калибровочный график, по которому определяют содержание ДГК в анализируемой пробе.

Количественное определение ДГК можно проводить и методом добавок.

Чувствительность определения дегидрацетовой кислоты в винах определена на модельных растворах с использованием стандартных растворов кислоты и составляет 0,01 мкг/мл.

Точность и достоверность определения дегидрацетовой кислоты в винах проверена путем статистической обработки результатов определения. При $n = 5$ и $P = 0,95$ величина относительного стандартного отклонения Sr составляет 0,01–0.

Результаты определения дегидрацетовой кислоты в винах были проверены также методом «введено–найдено», с помощью которого доказана хорошая воспроизводимость и корректность разработанной методики (табл. 4).

Таблица 4

Введено	Найдено	Sr
10	9,99±0,60	0,06
20	20,05±0,80	0,04
50	52,97±0,90	0,01

Выводы

Изучена возможность определения дегидрацетовой кислоты (ДГК) в винах без предварительного выделения консерванта. Разработана простая и надежная методика количественного определения ДГК в винах методом тонкослойной хроматографии. В качестве проявляющего раствора предложено использовать хлорид *тербия* (III), что обуславливает появление на хроматографической пластинке сенсibilизированной люминесценции иона лантанида в присутствии ДГК. Для интенсификации пробоподготовки использован ультразвук (УЗ).

Список литературы

1. Люк Э., Ягер М. Консерванты в пищевой промышленности. Свойства и применение. Санкт-Петербург: ГНОРД. 1998. – 256 с.
2. Жунгету Г. И. Хранение пищевых продуктов и кормов с применением консервантов. Кишинев. Картя Молдовеняска. 1982. – С. 83–85.
3. Технологія консервування плодів, овочів, м'яса й риби. /За редакцією проф. Флауменбаума Б. Л. Київ: Вища школа. 1995.–169 с.
4. Sudario E. // Coltevarora. 1954. – V.100. P. 577.
5. Полянский Н. Г., Мещеряков Г. Ф., Брагин В. А. //Журн. аналит. хим. – 1968. – т. 23, № 10. – С. 1725–1728.
6. Методы анализа пищевых, сельскохозяйственных продуктов и медицинских препаратов. М.: Пищевая промышленность. 1974.– 287 с.

7. Препаративная органическая химия. /Под ред. *Вульфсона Н. С.* М.: Химия. 1964.– 649 с.
8. *Полянский Н. Г., Мещеряков Г. Ф.* // Хим. промышленность. 1969, № 3.– С. 174–180.
9. *Бельтюкова С. В., Денисенко Е. Т., Егорова А. В., Желтвай И. И.* // Журн. аналит. хим. –1998.– т. 53, № 9. – С. 929–931.

*Физико-химический институт им. А.В. Богатского
Национальной академии наук Украины,
65080, Одесса, Люстдорфская дорога, 86*

Получено 18.12.2000

*Одесская государственная академия пищевых технологий,
65033, Одесса, Канатная, 112*