

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ
ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

**А. О. ЦАТУРЯН^{а,б}, В. Т. КОЧИКЯН, А. Ф. МКРТЧЯН^{а,б}, Э. В. МИНАСЯН,
З. З. МАРДИЯН и А. С. САГИЯН^{а,б}**

^{а)} Научно-производственный центр "Армбиотехнология"

НАН Республики Армения

Армения, 0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14

Факс: (374-10) 654183

E-mail: avetis-tsaturyan@ya.ru

^{б)} Ереванский государственный университет

Армения, 0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1

Поступило 6 VI 2016

Разработан эффективный метод анализа органических кислот (аспарагиновая, щавелевая, винная, яблочная, лимонная, янтарная и фумаровая) обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с применением УФ-детектирования. В качестве неподвижной фазы использована хроматографическая колонка "Altima C18" 5μ 250 x 4.6 мм. Разработанный метод можно использовать для качественного и количественного анализов органических кислот как в вине, так и в разных растительных экстрактах, напитках, культуральных жидкостях и других продуктах.

Рис.6, табл. 2, библиографических ссылок 10.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является универсальным методом количественного анализа органических молекул и широко применяется в биохимии, молекулярной биологии, органической и биоорганической химии, а также в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности [1].

Органические кислоты являются важными вкусовыми компонентами продуктов питания, могут выступать в качестве индикаторов их качества или, наоборот, порчи при хранении. Наличие органических кислот (яблочная, лимонная и другие) в продуктах питания активизирует пищеварительную железу и способствует лучшему усвоению пищи организмом [2].

Органические кислоты алифатического или ароматического ряда разнообразны по своей структуре, широко распространены в растениях и выполняют важные биологические и фармакологические функции. К числу таких природных объектов относятся ягоды винограда, клюквы болотной, малины обыкновенной, земляники лесной и др [1,2]. Многие органические кислоты являются фармакологически активными веществами и широко применяются в медицине (лимонная, никотиновая, аскорбиновая), некоторые из них в качестве стимуляторов роста растений используются в сельском хозяйстве (фитогормоны, ауксины, гетероауксины и др.). Определение содержания органических кислот в зрелом фрукте или продуктах их обработки позволяет предположить о пути созревания плода. Так, например, соотношение органических кислот в винограде и вине характеризует степень метаболизма виноградного растения и является основным критерием при изготовлении вина [3,4]. Изменение содержания органических кислот в ягодах винограда зависит от сорта и экологических условий прорастания. Определяя скорость изменения количества яблочной и винной кислот, можно определить пригодность данного сорта винограда для приготовления из него определенного типа вина [5].

Органические кислоты определяют бактерицидные, вкусовые и ароматические свойства различных сортов вин. Информация о качественном и количественном составе органических кислот в виноградных растениях свидетельствует об особенностях технологических процессов изготовления вина (использование незрелого винограда, применение яблочно-молочнокислого брожения, искусственное изменение кислотности т.д.) и является характеристикой данного вина [5].

Таким образом, определение состава и соотношения органических кислот в виноградных растениях является одним из важнейших показателей подлинности винодельческой продукции и критерием пищевой ценности других продуктов питания на их основе.

Разработанный нами метод ВЭЖХ анализа органических кислот отличается от описанных в литературе методов [6-9] тем, что прост в воспроизводимости, элюирование проводится в изократическом режиме с использованием УФ-детектора.

В качестве объекта для исследования был выбран модельный стандартный раствор семи органических кислот, которые, согласно литературным данным, присутствуют в виноградных растениях и продуктах их обработки. Разработанный метод позволяет проводить качественный и количественный анализы органических кислот как в вине, так и в разных растительных экстрактах, напитках, культуральных жидкостях и в других пищевых продуктах.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Использовали жидкостной хроматограф "Waters 2695 Separations Module" (США) с ультрафиолетовым детектором "Waters 2487", колонку для разделения органических кислот "Altima C 18", 5 мкм, 250×4,6 мм; разделение органических кислот проводили в изократическом режиме элюирования, в качестве подвижной фазы использовали 0.5 % MeOH, 0.5 % CH₃CN в 1000 мл H₂O, скорость потока составляла 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 210 нм, температура колонки — 30°C, объем инъекции — 10 µл. Использовались химические реактивы и элюенты фирмы "Sigma-Aldrich" со степенью чистоты > 99,9 % (gradient grade, for HPLC).

Описание методики. Навески стандартных образцов органических кислот растворяли в 1 мл дистиллированной воды в специальных пробирках для анализа. С целью освобождения от механических и нерастворившихся мелких частиц, которые могут загрязнять хроматографические колонки, вызывая быстрое снижение эффективности, растворы фильтровали с применением фильтра с размером пор 0.45 мкм, затем растворы образцов вставляли в специальный отсек хроматографа, предназначенный для анализируемых образцов, и проводили анализ по разработанному методу. Изучаемые образцы перед анализом обрабатывали трихлоруксусным ангидридом и центрифугировали 10 мин при скорости 12.000 об/мин для освобождения от протеинов. Для каждого анализа объем инъекции составил 10 мкл. Результаты анализа отображались на мониторе компьютера в виде хроматограммы, а программное обеспечение позволяло автоматически интегрировать полученные пики.

Результаты и их обсуждение

Согласно предварительным хроматографическим экспериментам, установлено, что лучшее разделение органических кислот обеспечивается при использовании УФ-детектора и в режиме изократического элюирования.

На рис. 1 представлена хроматограмма стандартного раствора органических кислот. Идентификацию проводили по временам удерживания, которые предварительно определяли путем хроматографического анализа каждой кислоты отдельно.

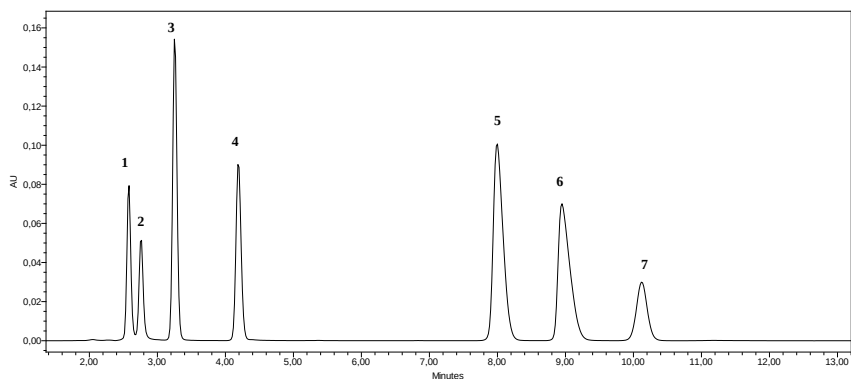


Рис. 1. Хроматограмма раствора смеси стандартных образцов аспарагиновой (1), щавелевой (2), винной (3), яблочной (4), лимонной (5), янтарной (6) и фумаровой (7) кислот.

На рис. 2 и 3 представлены хроматограммы органических кислот при проведении анализа проб сладкого и полусладкого вина.

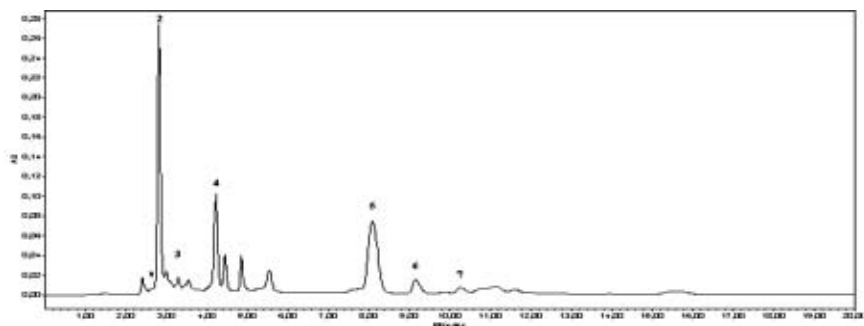


Рис. 2. Хроматограмма органических кислот образца сладкого вина: аспарагиновая (1), щавелевая(2), винная (3), яблочная (4), лимонная (5), янтарная (6) и фумаровая (7) кислоты.

Таблица 1

**Количественная характеристика органических кислот
в образце сладкого вина**

Органические кислоты	Концентрация, мг/мл
аспарагиновая	0.182
щавелевая	2.365
винная	0.260
яблочная	2.964
лимонная	3.756
янтарная	1.070
фумаровая	0.011

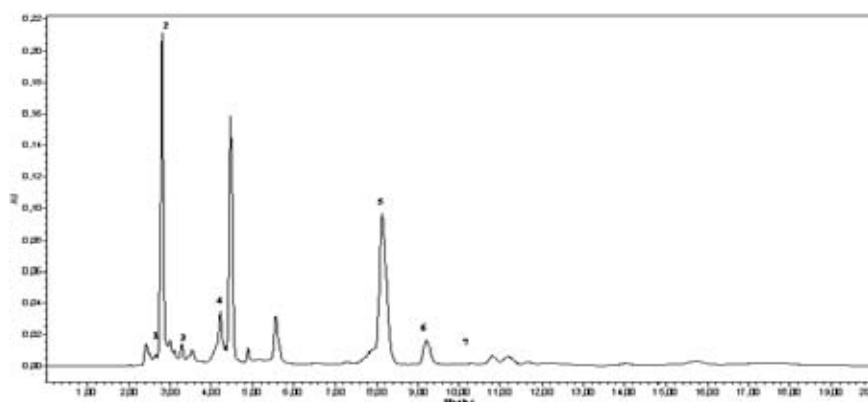


Рис. 3. Хроматограмма органических кислот в образце полусладкого вина: аспарагиновая (1), щавелевая (2), винная (3), яблочная (4), лимонная (5), янтарная (6) и фумаровая (7) кислоты.

Таблица 2

**Количественная характеристика органических кислот
в образце полусладкого вина**

Органические кислоты	Концентрация <i>мг/мл</i>
аспарагиновая кислота	0.269
щавелевая кислота	1.656
винная кислота	0.166
яблочная кислота	1.376
лимонная кислота	3.64
янтарная кислота	1.098
фумаровая кислота	0.00064

Достоинством метода является простота пробоподготовки, не требующая предварительного получения производных, что позволяет повысить надежность результатов анализа.

По разработанному методу был изучен состав органических кислот около 10 образцов разных армянских вин, чем определяются вкусовые и ароматические свойства вина. Этот метод позволяет провести качественный и количественный анализы органических кислот в экстрактах разных растений, напитках и в других пищевых продуктах.

На рис. 4-6 представлены хроматограммы органических кислот экстракта листьев стевии (4), экстракта корня цикория (5) и экстракта артишока (6).

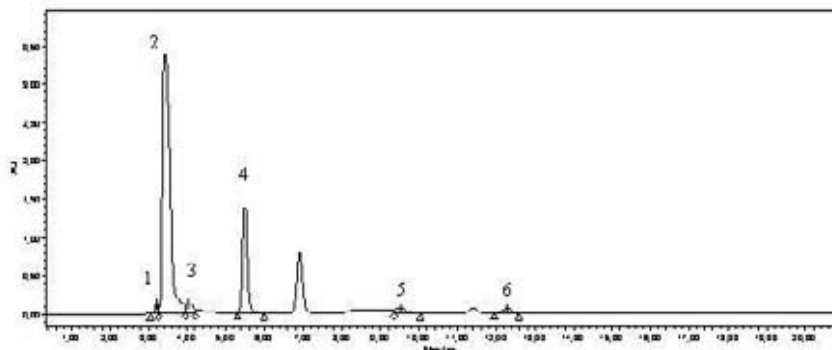


Рис. 4. Хроматограмма экстракта листьев стевии: аспарагиновая (1), щавелевая (2), винная (3), яблочная (4), лимонная (5), фумаровая (6) кислоты.

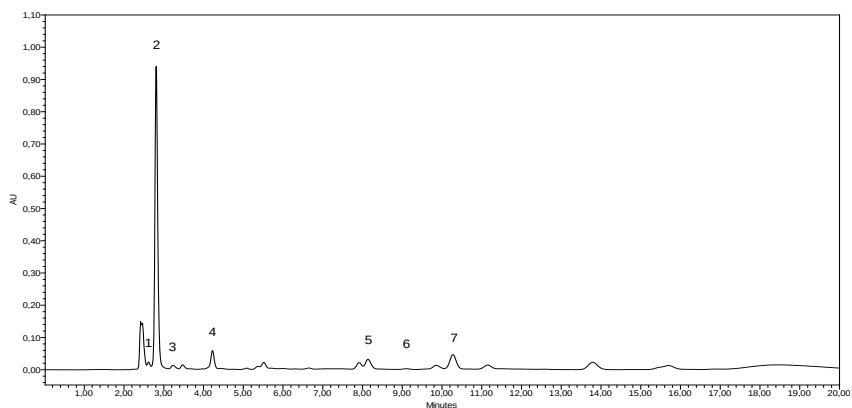


Рис. 5. Хроматограмма экстракта корня цикория: аспарагиновая (1), щавелевая (2), винная (3), яблочная (4), лимонная (5), янтарная (6), фумаровая (7) кислоты.

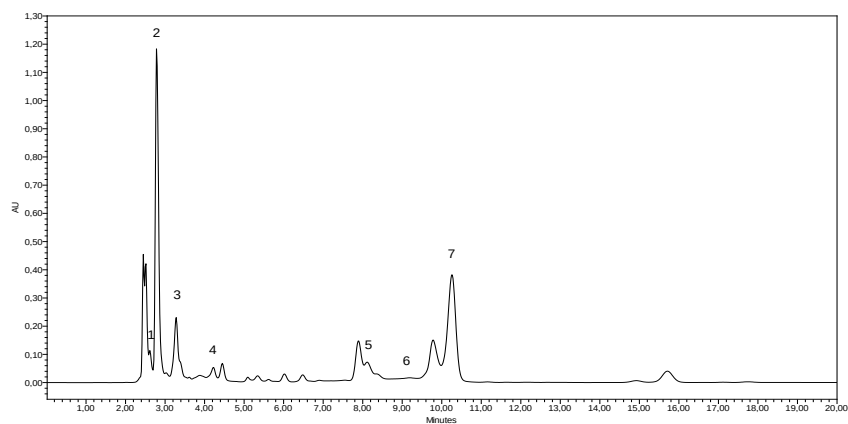


Рис. 6. Хроматограмма экстракта артишока: аспарагиновая (1), щавелевая (2), винная (3), яблочная (4), лимонная (5), янтарная (6), фумаровая (7) кислоты.

Как видно из рисунков, происходит четкое разграничение пиков (хроматограмм) отдельных органических кислот, что позволяет осуществ-

вить эффективный качественный и количественный анализы смеси органических кислот.

Таким образом, разработан эффективный метод ОФ-ВЭЖХ качественного и количественного анализов органических кислот в пищевых продуктах разного происхождения.

ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ Թ-ԹՈՒՆԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՆՖ ԲԱՆՔ ԵՂԱՆԱԿՈՎ

Ա. Ն. ԾԱՏՈՒՐՅԱՆ, Վ. Տ. ԴՈՉԻԿՅԱՆ, Ա. Ֆ. ՄԿՐՏՅԱՆ, Է. Վ. ՄԻՆԱՍՅԱՆ,
Զ. Զ. ՄԱՐԴԻՅԱՆ և Ա. Ս. ՍԱԳԻՅԱՆ

Մշակվել է օրգանական թթուների (ասպարգինաթու, թրթնջկաթու, գինեթու, ինձորաթու, լիմոնաթու, սաթաթու, ֆումարաթու) չՖ ԲԱՆՔ անալիզի արդյունավետ մեթոդ՝ ՈւՄ դետեկցմամբ: Որպես անշարժ ֆազ օգտագործվել է “Altima C18” 5μ 250×4.6 մմ քրոմատոգրաֆիական աշտարակ: Մշակված մեթոդը կարելի է օգտագործել ինչպես գինու, այնպես էլ տարբեր բուսական լուծամզվածքներում, ըմպելիքներում, կուլտուրալ հեղուկներում օրգանական թթուների որակական և քանակական անալիզի համար:

DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS BY THE METHOD OF REVERSE-PHASE HPLC

A. H. TSATURYAN^{a,6}, V. T. GHOSHIKYAN, A. F. MKRTCHYAN^{a,6},
E. V. MINASYAN, Z. Z. MARDIYAN and A. S. SAGHYAN^{a,6}

^a Scientific and Production Center “Armbiotechnology” NAS RA
14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

Fax: (37410)654183

E-mail: avetis-tsaturyan@ya.ru

⁶ Yerevan State University

1, A. Manoukyan Str., Yerevan, 0025, Armenia

An efficient method with UV detection of reverse phase (RP) HPLC analysis of the organic acids (aspartic, oxalic, tartaric, malic, citric, succinic and fumaric) has been developed. “Altima C18” 5μ 250×4.6 mm chromatographic column was used as a reverse-phase. The developed method can be used for qualitative and quantitative analyses of organic acids in both wine and different plant extracts, used drinks, culture fluids, etc.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. // John Wiley&Sons, Ltd, Chichester, 2010, 3ed, p. 26.
- [2] Rib'ereau-Gayon P., Glories Y., Mauje A., Dubourdieu D. // Handbook of Enology, 2006, v. 2.
- [3] Яковлев Г. Фармакогнозия, 2006.
- [4] Ford C.M. // The Biochemistry of the Grape Berry, 2012, chapter 4, p. 67.
- [5] Mato I., Suárez-Luque S., Huidobro J.F. // Food Research International, 2005, v. 38, Issue10, p.1175.
- [6] Нилов В.И., Тюрин С.Т. Созревание и хранение виноматериалов в крупных резервуарах, М., Пищевая промышленность, 1967, с. 189.
- [7] Scherer R., Poloni Rybka A.C., Ballus C.A., Meinhart A.D., Filho J.T., Godoy H.T. // Food Chemistry, 2012, v. 135, p. 150.
- [8] Kordi-Kraep M., Abram V., Ka M., Ferjan S. // Food technol. biotechnol., 2001, v. 39 (2), p. 93.
- [9] Hayenga I. // Analytix, 2011, v. 6, Article 3.
- [10] Ball S. HPLC Analysis of Organic Acids in Wine // MChem, Varian, 2008.