

Греческое вино

Определение органических кислот в вине

При формировании органолептических свойств вина, особенно белого вина, его состава и стабильности большую роль играют органические кислоты, которые также предохраняют напиток от поражения микроорганизмами. Так, сухие белые вина не подвергаются яблочно-молочному брожению и являются более стабильными с точки зрения осаждения гидротартрата калия и тартрата кальция. Красные вина стабильны при более низких уровнях кислотности из-за присутствия фенолов.

Поскольку состав органических кислот непосредственно влияет на аромат и цвет вина, то он должен тщательно регулироваться, чтобы обеспечить надлежащее брожение и предотвратить порчу (табл. 1).

Союз сельскохозяйственных кооперативов Пеза в Греции расположен в префектуре Гераклиона, Крит. Основную продукцию предприятия составляют вино и оливковое масло. Собирая высококачественное сырье у местных производителей, Союз Сельскохозяйственных Кооперативов Крита Пеза гарантирует для своих клиентов превосходное качество этих традиционных продуктов. Красные вина имеют маркировку P.D.O.

| Органическая кислота | Роль органических кислот в вине |
|----------------------|---|
| Уксусная | Предотвращение порчи |
| Лимонная | Определение подлинности вина |
| Фумаровая | Предотвращение яблочно-молочного брожения, регулировка кислотности |
| Яблочная | Наблюдение за ходом яблочно-молочного брожения |
| Винная | Снижение кислотности, применение при тестировании устойчивости к холоду |

Таблица 1: Роль органических кислот в вине

Пеза (Защищенное обозначение происхождения Пеза) с 1971 года, у белых вин данный статус с 1982 года.

При совместном сотрудничестве Пеза и N. Asteriadis S.A в лаборатории контроля качества был разработан быстрый „зеленый“ ВЭЖХ метод для определения органических кислот в вине на основе исследований Университета Калабрии [1]. Этот метод не требует использования вредных органических растворителей. Кроме того, не используются буферные растворы и, таким образом, отпадает необходимость в промывке ВЭЖХ системы в течение дополнительного времени.

Эксперимент

Анализы проводились на ВЭЖХ системе Shimadzu серии *Prominence*, оснащенной диодно-мат-

ричным детектором (SPD-M20A). Хроматографическое разделение было достигнуто на колонке Phenomenex Synergi Hydro-RP 250 мм x 4.6 мм, 4 мкм (Табл.2). Ниже представлены подробные аналитические условия анализа.

Аналитические условия

Режим элюирования: Изократический
 Подвижная фаза: 0.1 % Муравьиная кислота в воде
 Скорость потока ПФ: 0.5 мл/мин
 Колонка: Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 мм x 4.6 мм, 4 мкм
 Температура колонки: 35 °C
 Детектор: PDA SPD-M20A Длина волны: 210 нм
 Общее время анализа: 20 мин
 Объем вводимой пробы: 20 мкл

При выборе колонки основной акцент ставился на возможность работы в 100 % водной среде без

необходимости дополнительного использования фосфатного буфера. Использование воды в качестве подвижной фазы способствует быстрому внутреннему уравниванию и сокращению общего времени повседневного анализа, т.к. исключается дополнительное время для промывки системы от нежелательных солей. Кроме того, подвижная фаза совместима с ВЭЖХ-МС детектором и протестирована в режиме электроспрея (ESI). Покупка данного прибора входит в дальнейшие планы Союза сельскохозяйственных кооперативов Пеза. В качестве подвижной фазы была выбрана муравьиная кислота. Были протестированы 2 различные концентрации муравьиной кислоты (0,5 % и 0,1 %) и лучшее разделение было получено при 0,1 %. Это согласуется с предыдущим исследованием, проведенным Гамох и др.[2]

Полярные аналиты не всегда сохраняются и часто не разделяются с удовлетворительным коэффициентом емкости на обычных колонках C18. Synergi Hydro-RP – это неподвижная фаза на основе C18 с терминальной полярной группой, обеспечивающая высокое разделение гидрофобных и полярных смесей в 100 % водной среде.

Высокая удельная площадь поверхности силикагеля размером 4 мкм (475 м²/г) в сочетании с плотной пришивкой фазы приводит к сильным взаимодействиям между исследуемым веществом и привитой фазой. Результат – хо-

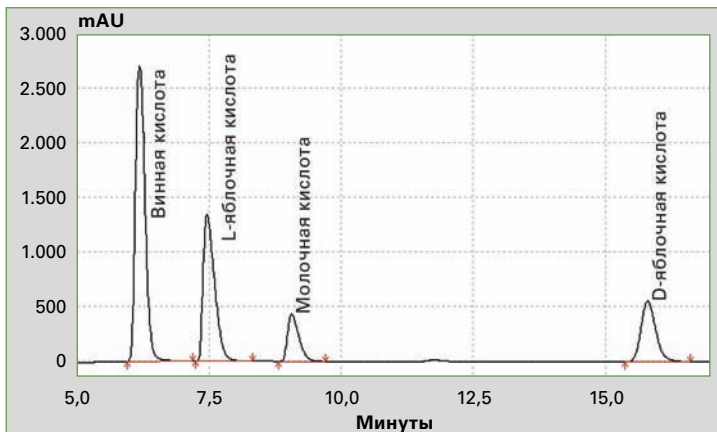


Рисунок 1. Хроматограмма смеси стандартных растворов D-яблочной кислоты 5 г/л, L-яблочной кислоты 5 г/л, молочной кислоты 5 г/л и винной кислоты 10 г/л

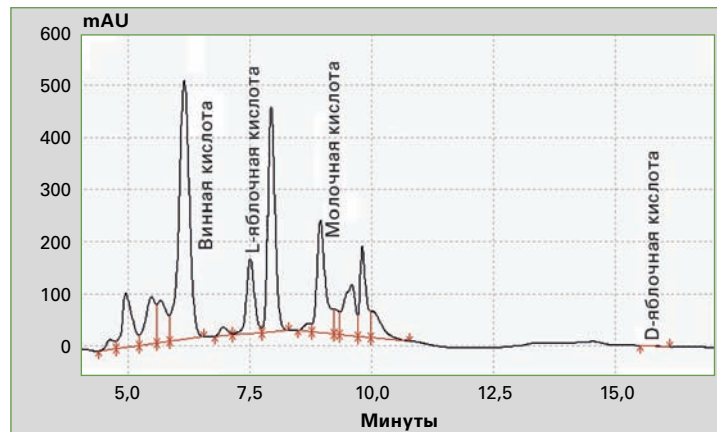


Рисунок 3. Типичная хроматограмма образца вина

рошо удерживающая фаза C18, подходящая для разделения органических кислот.

Выполнение анализа в 100 % водной среде и на колонке C18 обеспечивает более высокое удержание полярных соединений. Однако, поскольку традиционные фазы на основе C18 плохо смачиваются подвижными фазами с высоким содержанием воды, в результате чего группы C18 прижимаются к поверхности силикагеля, со временем удержание на таких колонках полностью исчезает. Органические кислоты часто трудно разделить, поскольку их полярность препятствует взаимодействию с традиционными лигандами C18, но было отмечено, что этого можно достичь при использовании колонки Synergi Hydro-RP в 100 % водной среде.

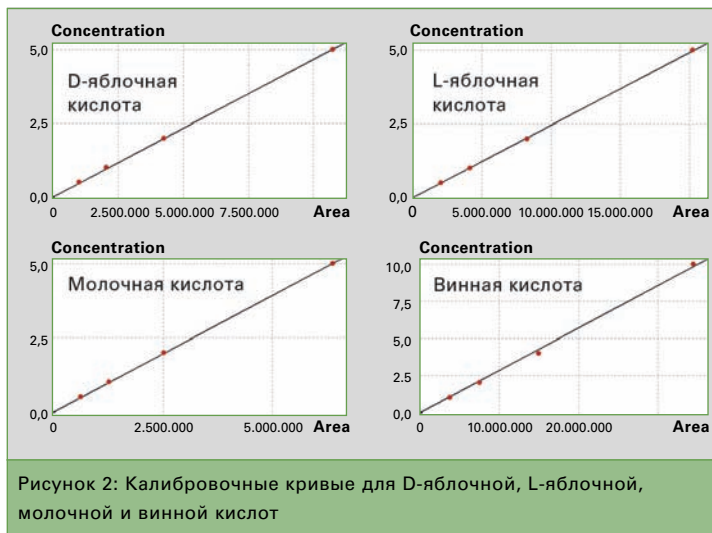
Методика

Рабочие стандартные растворы D-и-L-яблочной кислот, молочной и винной кислот готовили с использованием ультра-чистой воды. Концентрации стандартных растворов D-и-L-яблочной кислот, молочной кислоты составили

0,5 г/л; 1,2 г/л и 5 г/л соответственно. Концентрации стандартных растворов винной кислоты равнялись 1 г/л, 2 г/л, 4 г/л, 10 г/л. На рисунке 1 показана хроматограмма смеси стандартных растворов D-яблочной кислоты 5 г/л, L-яблочной кислоты 5 г/л, молочной кислоты 5 г/л и винной кислоты 10 г/л. Построение калибровочной кривой и количественное определение проводили автоматически в программном обеспечении LCsolution.

Коэффициенты корреляции и параметры контроля качества для всех органических кислот представлены в таблице 3. Как видно из рисунка 2 коэффициенты корреляции для всех калибровочных кривых были превосходными. Образцы вин разводили ультра-чистой водой в соотношении 1:10, а затем пропускали через фильтры с размером пор 0,45 мкм. Для количественного анализа выбрали коэффициент разбавления 10. На рисунке 3 показана характерная хроматограмма образца вина.

Количественные результаты и параметры контроля качества для большинства стандартных вин-



ных напитков приведены в таблице 4.

Выводы

Описанный выше метод был разработан и успешно апробирован в лаборатории контроля качества Союза Сельскохозяйственных Кооперативов Крита Пеца. Доказано, что предложенный метод является экспрессным и надежным, не требует использования органических растворителей и длительного

времени для уравнивания и очистки системы. Линейность калибровочных кривых для всех органических кислот была превосходной во всем диапазоне измерений, тем самым подтверждая надежность выбранного метода для определения органических кислот в вине. Использование колонки Phenomenex Synergi Hydro-RP с размером частиц 4 мкм оказалось отличным выбором для данного типа анализа. Несмотря на то, что метод разработан с использованием УФ-детектирования, он также подходит и для ВЭЖХ/МС систем. Используя такую систему в будущем, Союз сельскохозяйственных кооперативов Пеца планирует достичь еще лучших пределов обнаружения (LODs *) и пределов количественного определения (LOQs**).

LODs * Пределы обнаружения LOQs. ** Пределы количественного определения

Ссылки

- [1] RT-OR5-ALTRO-CHIM/2, Rapporto Technico: Verifica Delle Metodiche Analitiche E Loro Applicazione A Vini Calabresi DOC, Progetto: LOGICA, Laboratorio Tecnologico Della Logistica In Calabria, Laboratorio Di Cosenza, R&D.LOG, Italy
- [2] K. Gamoh, H. Saitoh, H.Wada, Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 685-689
- [3] A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, M.A. Lage-Yusty, J. López-Hernández, Talanta 78 (2009) 643-646

Emmanouil G. Barbounis*, Konstantinos Tampouris*, Kleantih Garefalaki**, Georgios Koumantakis**

* Application Department N. Asteriadis S.A
 **Union of Agricultural Cooperatives of Peza, Crete

| Сорбент | Размер частиц (мкм) | Размер пор (Å) | Объем пор (мл/г) | Удельная площадь поверхности (м ² /г) | Содержание углерода (%) | Рассчитанная плотность пришивки фазы (микромоль/м ²) | Модификатор концевых групп |
|------------------|---------------------|----------------|------------------|--|-------------------------|--|----------------------------|
| Synergi Hydro-RP | 4 | 80 | 1,05 | 475 | 19 | 2,45 | Гидрофильный |

Таблица 2: Технические характеристики колонки

| Органическая кислота | Градуировочный коэффициент (a) | R ² | Разрешение | k' | Теоретическое тарелки | LOD* (г/л) | LOQ** (г/л) |
|----------------------|--------------------------------|----------------|------------|-------|-----------------------|------------|-------------|
| D-яблочная кислота | 4,6697 x 10 ⁻⁷ | 0,99997 | 15,8 | 2,410 | 16500 | 0,05 | 0,14 |
| яблочная кислота | 2,4624 x 10 ⁻⁷ | 0,99991 | 4,0 | 0,621 | 7000 | 0,08 | 0,23 |
| Молочная кислота | 7,8443 x 10 ⁻⁷ | 0,99999 | 4,5 | 0,964 | 10000 | 0,03 | 0,09 |
| Винная кислота | 2,8536 x 10 ⁻⁷ | 0,999 | — | 0,333 | 6300 | 0,55 | 1,68 |

Таблица 3: Градуировочные коэффициенты калибровочных кривых ([Органическая кислота] = a * площадь), коэффициенты корреляции и параметры контроля качества для органических кислот. Пределы обнаружения и количественного определения рассчитываются путем умножения остаточных стандартных отклонений калибровочных кривых (Sy/x) на 3,3 и 10 соответственно

| Вино | [D-яблочная кислота] (г/л) | [L-яблочная кислота] (г/л) | [Молочная кислота] (г/л) | [Винная кислота] (г/л) |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|
| Retsina | 0,53 | 4,85 | 13,35 | 21,52 |
| TTV | 0,08 | 4,03 | 20,88 | 21,15 |
| 3-150 | 2,85 | 7,67 | 8,34 | 56,64 |
| Параметры контроля качества | | | | |
| Среднее разрешение | 7 | 1,6 | 1,0 | 0,9 |
| Среднее k' | 2,5 | 0,7 | 1,0 | 0,35 |

Таблица 4: Количественные результаты и параметры контроля качества нескольких образцов вина