

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ ВИНОГРАДНЫХ ВИН

Ливенцова Е. О., канд. хим. наук

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

Показана возможность определения галловой кислоты (ГК) в винах с использованием в качестве люминесцентного маркера иона тербия (III). Разработана простая и надежная методика количественного определения ГК в винах методом тонкослойной хроматографии. В качестве проявляющего раствора предложено использовать хлорид тербия (III) в присутствии триоктилфосфиноксида (ТОФО), что обуславливает появление на хроматографической пластинке сенсibilизированную люминесценцию иона лантанида в присутствии ГК.

The article revealed the possibility of determination of gallic acid (GA) in wines with the use of Tb (III) ion as luminescent marker. The simple and reliable method of the quantitative determination of GA in wines by the thin-layer chromatography method was developed. The terbium chloride (III) in the presence of trioctylphosphinoxide (TOPO) was proposed to use as a developing solution that causes emergence of the sensitized luminescence of ion lanthanide on chromatography plate in GA presence.

Ключевые слова: люминесценция, тонкослойная хроматография, тербий, галловая кислота.

Фенолкарбоновые кислоты, к которым относится оксибензойные и оксикоричные, играют важную роль в формировании органолептических свойств вина (букет и вкус), участвуют в биологических процессах, протекающих при изготовлении и хранении виноградных вин [1]. Несмотря на то, что ароматические кислоты содержатся в винах в небольших количествах. Они участвуют в окислительно-восстановительных процессах, повышают стойкость при хранении благодаря окислительной активности. Эти кислоты ценны своими антимутагенными свойствами, они укрепляют иммунитет, разжижают кровь, и могут быть полезны в профилактике рака, атеросклероза, диабета, инсульта и катаракты.

Фенольные соединения, включающие производные оксибензойной и оксикоричной кислот вносят существенный вклад в показатели качества вин. Сиреневая и галловая кислоты являются одним из маркеров в определении подлинности марочных вин и коньяков, которые принято выдерживать в дубовых бочках. Галловая кислота характеризует качество коньяка, зависимость ее содержания от срока выдержки, что позволяет использовать этот показатель как маркер возраста. Повышенное содержание галловой кислоты в портвейнах по сравнению с другими винами, можно использовать для идентификации вин этого типа. Замену виноградного вина на плодово-ягодное можно определить по наличию или отсутствию в вине галловой кислоты.

Анализ содержания отдельных компонентов фенолкарбоновых кислот может быть также использован для проведения идентификации регионального происхождения вин, их срока выдержки, а также эффективно характеризовать их уровень качества, помогает в оценке фальсификата.

В суммарном количестве идентифицированных фенолкарбоновых винах наибольшая доля приходится на галловую кислоту от 50 до 85 % [2].

Для определения фенолкарбоновых кислот применяют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии [3—5], электрофоретические и спектрофотометрические методы [6—8]. Последние, однако, не являются селективными. Все применяемые методы требуют дорогостоящего оборудования и не всегда доступны.

Целью работы являлась разработка простой и чувствительной методики количественного определения галловой кислоты (ГК) 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 ГК вследствие внутримолекулярной передачи энергии возбуждения от последней к иону *Tb(III)*, интенсивность аналитического сигнала усиливается в присутствии донорно-активной добавки — триоктилфосфиноксида (ТОФО).

Аппаратура и техника эксперимента. Раствор ГК (0,01 моль/л) готовили растворением точной навески препарата в этаноле. Хлорид тербия готовили растворением высокочистого оксида (99,99 %) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением избытка упариванием. Концентрацию *Tb(III)* контролировали комплексонометрическим титрованием раствором комплексона III (0,1 М) с индикатором арсеназо I в присутствии уротропина.

Растворы поверхностно-активных веществ готовили путем растворения соответствующих навесок в воде. Использовали растворители (бензол, толуол, ацетон, ацетонитрил, метанол, этанол, этилацетат, хлороформ), уксусную и муравьиную кислоты марки х.ч. Раствор ТОФО готовили растворением точной навески вещества в этаноле.

Для хроматографирования использовали пластинки для тонкослойной хроматографии марки *Silufol-UV 254*, *Sorbfil*, *CTX-1A*.

Сенсибилизированную люминесценцию $Tb(III)$ в фазе сорбента 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-120А, снабженной светофильтром УФС-2 ($\lambda_{возб}=365$ нм), pH растворов измеряли с помощью иономера ЭВ-74.

Результаты и их обсуждение. Галловая кислота содержит в молекуле три гидроксильные группы и образует с ионами лантанидов комплексные соединения с соотношением Ме:ГК=1:2, в которых координация лантанида осуществляется по ортодифенольной группировке. В этих соединениях вследствие внутримолекулярного перехода энергии от органического лиганда на ион лантанида проявляется сенсибилизированная люминесценция ионов $Tb(III)$ [8, 9], которая значительно возрастает в слое сорбента.

В спектре люминесценции сорбата комплекса $Tb(III)$ с ГК наиболее интенсивной является полоса $Tb(III)$ с максимумом при 545 нм (переход $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$). Значительно слабее по интенсивности полосы с максимумами при 490, 586 и 620 нм (рис. 1).

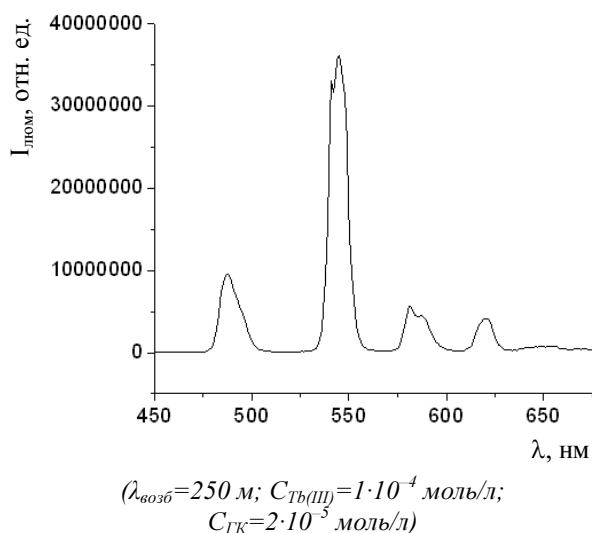


Рис. 1 — Спектр люминесценции сорбата комплекса $Tb(III)$ — ГК

Интенсивная люминесценция ионов $Tb(III)$ с ГК использована нами для разработки методики люминесцентного определения галловой кислоты в винах.

С целью выбора оптимальных условий и режимов хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по своим свойствам. Наилучшим оказалось применение хроматографических пластинок марки *Sorbfil*, на которых изображение пятен ГК было более четким и пригодным для количественного анализа.

Изучено несколько элюирующих систем кислого, нейтрального и щелочного характера (бензол:уксусная кислота; бензол:ацетон:уксусная кислота; бензол:уксусная кислота:вода; этилацетат:уксусная кислота; бензол:диоксан:уксусная кислота; хлороформ:метанол; ацетон:хлороформ; метанол:аммиак; этанол:этилацетат:аммиак). Наиболее оптимальными оказались системы кислотного характера, в частности этилацетат:уксусная кислота в соотношении 95:5 и бензол:метанол:уксусная кислота в соотношении 100:50:1. Подвижность (R_f) ГК в этих условиях составила 0,47 и 0,53 соответственно.

Изучено влияние объема пробы, наносимого на пластинку. На пластинку наносили 0,2...6 мкл пробы. Наилучший результат достигался при нанесении пробы объемом 1 мкл.

В качестве оптимального проявителя необходимо было выбрать реагент, избирательный и чувствительный по отношению к ГК. Для обнаружения ГК нами предложен хлорид тербия (III).

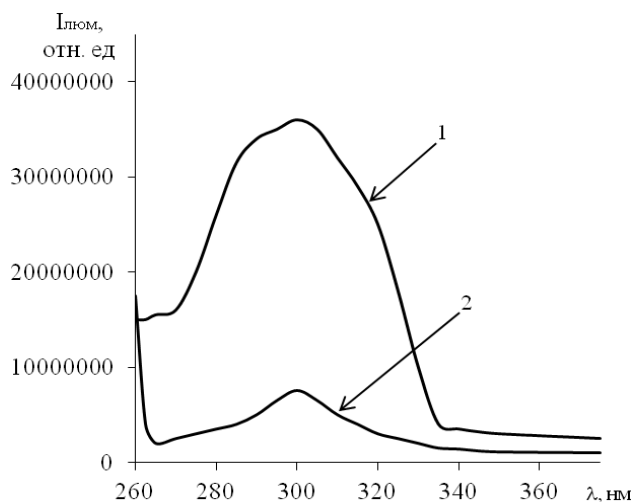
Интенсивность люминесценции $Tb(III)$ на пятне хроматограммы зависит от концентрации иона лантанида в проявляющем растворе (табл. 1). Как видно из таблицы, наибольшая интенсивность люминесценции наблюдается при использовании проявляющего раствора с концентрацией $Tb(III)$ $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Таблица 1 — Зависимость $I_{люм}$ $Tb(III)$ на хроматорамме от концентрации металла в проявляющем растворе

$C_{Tb(III)}$, моль/л	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$
$I_{люм}$, отн. ед.	27	42	100	95	89

Как показал эксперимент, наличие поверхностно-активных веществ (ПАВ) в проявляющем растворе не оказывает усиливающего влияния на $I_{люм}$ сорбата $Tb(III)$ в комплексе с ГК. Увеличение $I_{люм}$ сорбата $Tb(III)$ в 5 раз наблюдается при ведении в проявляющий раствор донорно-активной добавки — ТОФО. Можно предположить, что ТОФО гидролизует молекулу комплекса, защищая его от влияния дезакти-

вирующа люмінесценцію молекул води. Это підтверджується і спектрами збудження сорбатов комплексу (рис. 2). В присутстві ТОФО характер спектра не змінюється, збільшується тільки його інтенсивність.



1 — в присутстві ТОФО; 2 — в відсутстві ТОФО

Рис. 2 — Спектр збудження сорбатов комплексу Tb(III) — ГК

тов комплексів від концентрації ГК спостерігається в інтервалі концентрацій 0,5...100 мкг/мл. Это дозволяє використовувати вивчені сорбати комплексу Tb(III)—ГК в присутстві ТОФО на пластинках для ТСХ в якості аналітичної форми для визначення галлової кислоти.

Таблиця 2 — Залежність $I_{\text{люм}}$ сорбата Tb(III)—ГК на хроматограмі від концентрації ТОФО в проявляючому розчині

$C_{\text{ТОФО}}$, моль/л	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$
$I_{\text{люм}}$, %	42	67	100	97	95

Визначення ГК проводили в червоних сухих винах.

Проявляючий розчин готували шляхом змішування 1 мл розчину хлориду тербія з концентрацією 0,01 моль/л 0,1 мл 4-процентного розчину уротропіна і 1 мл ТОФО з концентрацією 0,01 моль/л, розбавляли дистильованою водою до об'єму 10 мл.

Таблиця 3 — Залежність $I_{\text{люм}}$ Tb(III) на хроматограмі від величини pH проявляючого розчину

pH розчину	$I_{\text{люм}}$, отн. ед.
4,0	30
7,0	100
9,3	20

Поміщають в хроматографічну камеру з рухомою фазою (смісь бензол:метанол:уксусна кислота в співвідношенні 100:50:1). Коли фронт розчинителя досягає висоти 70 мм. Пластинку виймають з камери і відзначають положення фронту розчинителя. Отриману хроматограму висушують при температурі 40 °C в течение 2 мин і рівномірно обробляють проявляючим розчином, склад якого вказано вище. Ідентифікацію ГК на пластинці проводять по з'явленню зеленої люмінесценції Tb(III) під люмінесцентною лампою з $\lambda_{\text{воб}}=365$ нм візуально порівнюючи $I_{\text{люм}}$ проби і стандарту.

Кількісне визначення ГК проводять по градуировочному графіку, для побудови якого поступають наступним чином. На пластинку наносять різні кількості стандартного розчину ГК і далі проводять хроматографування і проявлення хроматограми як описано вище. Згодом з пластинки вирізають плями з ГК, поміщають в кювету для твердих зразків, інтенсивність люмінесценції вимірюють при $\lambda_{\text{излуч}}=545$ нм. По отриманим даним $I_{\text{люм}}$ Tb(III) — концентрація ГК будують градуировоч-

Аналогічні зміни спостерігаються і в спектрі люмінесценції — збільшується інтенсивність полоси при 545 нм, но максимум полоси не зскажується і не розщеплюється, що може служити косвенним доказом того, що молекула ТОФО не входить во внутрішню координаційну сферу комплексу.

Вивчено залежність $I_{\text{люм}}$ сорбата Tb(III) від кількості ТОФО в проявляючому розчині. Максимальне значення $I_{\text{люм}}$ сорбата Tb(III) спостерігається при концентрації ТОФО в проявляючому розчині $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (таб. 2).

Залежність $I_{\text{люм}}$ Tb(III) на хроматограмі від величини pH наведено в таблиці 3.

Оскільки комплексне з'єднання Tb(III) з ГК утворюється в слабкоїслій і нейтральній середі при значеннях pH 6,5...7,2, в якості буфера використовували 4-процентний розчин уротропіна.

Лінійна область залежності $I_{\text{люм}}$ сорба-

ный график, по которому определяют содержание ГК в анализируемой пробе. Количественное определение можно также проводить методом добавок.

Чувствительность определения ГК в винах составляет 0,002 мкг/мл. Точность и достоверность определения кислоты в винах проверена методом статистической обработки результатов анализа. Точность и достоверность определения ГК в винах проверена методом статистической обработки результатов анализа. При $n=5$, $P=0,95$ величина относительного стандартного отклонения S_r составляет 0,03...0,06.

Правильность определения ГК в винах проверена методом «введено-найдено» (табл. 4).

Таблица 4 — Результаты определения галловой кислоты в винах методом «введено-найдено», мкг/мл

($n=5$, $P=0,95$)

Марка вина	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	S_r
Мерло	0	12,0	0,06
	5	17,2	0,05
	10	21,5	0,04
Саперави	0	28,3	0,05
	5	33,5	0,05
	10	38,3	0,03
Petit Chablis	0	19	0,07
	10	30	0,07
	20	38	0,06

Заключение. Полученные данные представляют как практический, так и теоретический интерес, так как задача определения ароматических кислот является в отрасли виноделия важной и малоизученной.

Литература

1. Кишковский, З. Н. Химия вина [Текст] / З. Н. Кишковский, Н. М. Скурихин. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 311 с.
2. Положишникова, М. А. Применение хроматографических методов для оценки качества и идентификации виноградных вин [Текст] / М. А. Положишникова, О. Н. Перельгин, В. В. Семикин. – Пищевая промышленность. – 2006. – № 1. – С. 9–13.
3. Селиверстова, И. В. Определение органических кислот в вине методом жидкостной ионоэкслюзионной хроматографии [Текст] / И. В. Селиверстова, А. А. Иванов, Л. А. Иванова // Виноделие и виноградарство. – 2001. – № 4. – С. 9–11.
4. Бодорев, М. М. Хроматографический анализ ароматических кислот и альдегидов в винах [Текст] / М. М. Бодорев, Б. С. Субботин // Виноделие и виноградарство – 2001. – № 1. – С. 19–21.
5. Определение фенольных альдегидов в коньяках и винах методом капиллярного электрофореза: новые маркеры качества коньяка [Текст] / А. Г. Паносян, Г. Мамиконян, М. Торосян и др. // Журнал аналитической химии. – 2002. – Т. 57, № 4. – С. 422–428.
6. Подтверждение подлинности виноградных вин на основе исследования цветовых характеристик [Текст] / О. Н. Перельгин, М. А. Положишникова, Д. С. Лычников, Г. В. Ковров // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2004. – № 2. – С. 39–42.
7. Применение хроматографии и спектрометрии для идентификации подлинности спиртных напитков [Текст] / С. А. Савчук, В. И. Власов, С. А. Апполонова и др. // Журнал аналитической химии. – 2001. – Т. 56, № 3. – С. 246–264.
8. Полуэктов, Н. С. Комплексы редкоземельных элементов с галловой кислотой [Текст] / Н. С. Полуэктов, К. В. Церкаевич // Журнал аналитической химии. – 1964. – Т. 9, № 10. – С. 1606–1612.
9. Jimesrez-Prieto, R. Simultaneous determination of gallic acid and resorcinol based on an oscillating chemical reaction by the analyte pulse perturbation technique [Text] / R. Jimesrez-Prieto, M. Silva, D. Peres-Bendito // Anal. Chim. Acta. – 1996. – Vol. 334, Issue 3. – P. 323–330.