

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)
04.03.01 «Химия»
(код и наименование направления подготовки, специальности)
«Медицинская и фармацевтическая химия»
(направленность (профиль)/ специализация)

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему Гидрофильная хроматография в анализе и идентификации вин

Студент	И.Э. Бабаева	
	_____	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Руководитель	О.Б. Григорьева	
	_____	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Консультанты	Е.Ю. Аношина	
	_____	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)

Допустить к защите

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко _____
(ученая степень, звание, И.О. Фамилия) (личная подпись)

« _____ » _____ 2018 г.

Тольятти 2018

АННОТАЦИЯ

Данная выпускная бакалаврская работа изложена на 50 страницах, содержит 8 таблиц, и 12 рисунков. Список литературы представлен 47 источниками.

Целью выпускной работы является изучение гидрофильной хроматографии в анализе и идентификации вин.

Объектами исследования в настоящей работе являются: различные вина (Красное Кагор, красное Torre Tallada, белое Шардоне), фруктовые кислоты (молочная, винная, щавелевая, лимонная, уксусная, янтарная), клюква.

В литературном обзоре рассмотрены классификация, виды, пищевая ценность, дефекты, фальсификация виноградных вин, а также рассмотрены методы анализов фруктовых кислот, входящих в состав вин.

В экспериментальной части представлены объекты и описаны методики хроматографического исследования.

Полученные хроматографические данные анализируются и на их основе подбираются оптимальные условия определения фруктовых кислот в виноградных винах. С использованием метода абсолютной калибровки были получены градуировочные кривые для винной и лимонной кислот.

ABSTRACT

The title of the graduation work is «Hydrophilic chromatography in wine analysis and identification».

The aim of the work is to give some information about hydrophilic chromatography in wine analysis. The practical significance of the work is to choose the conditions of hydrophilic HPLC variant, which allow achieving a satisfactory separation of the studied components.

The graduation work consists of an introduction, two chapters, a conclusion, list of 47 references, including 16 foreign sources, and 83 appendixes. The text of the work contains 12 figures and 8 tables.

The first part of the work is dedicated to the work preparation of a literature review on methods of analysis and control of wine ways to identify falsifications of the merits and demerits of chromatographic methods of analysis.

The second part of the work studies the influence of the HILIC experiment (pH of the medium, the nature of the stationary phase, and the composition of the eluent) on the possibility of separating and determining the organic acids of the constituents, and selection of the condition of the hydrophilic variant of HILIC which allow achieving a satisfactory separation of the studied components.

At the results, there are described possibilities of HPLC in the control of fruit acids, wines, and particularly the possibility of its hydrophilic regime.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1 Хроматография – общие сведения	9
1.1.2 Принцип работы жидкостного хроматографа	11
1.1.3. Хроматографические методы анализа	12
1.1.4 Параметры удерживания.....	13
1.1.5 Пиковая плотность и Эффективность	13
1.2 Гидрофильная хроматография.....	13
1.2.1 Основные методы.....	13
1.3 Виноделие	14
1.3.1. История виноделия.....	14
1.3.2 Виды виноградных вин	15
1.3.3 Классификация вин	16
1.3.4 Методика изготовления	16
1.3.5 Пищевая ценность	21
1.3.6 Дефекты вин	23
1.3.7 Фальсификация вин.....	25
1.3.8 Признаки использования ароматических веществ в продукции	28
1.3.9 Определение фруктовых кислот, углеводов	29
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	31
2.1 Реагенты, оборудование и объекты исследования	31
Оборудование:.....	31
2.2 Методика выполнения эксперимента.....	32
2.2.1 Хроматографический анализ	32

2.2.2 Метод количественного измерения.....	32
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	34
3.1 Подбор хроматографических условий	34
3.2 Количественное измерение.....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	47

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ТСХ	Тонкослойная хроматография
НФ	Неподвижная фаза
ПФ	Подвижная фаза
СФ	Спектрофотометрический
ОФ ВЭЖХ	Обращенно-фазовая ВЭЖХ
УФ	Ультрафиолетовый
ЖХ	Жидкостная Хроматография
ГВЖХ	Гидрофильная высокоэффективная жидкостная хроматография
АК	Аминокислота
ФК	Фруктовые кислоты

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день один из широко применяемых методов в различных областях науки и промышленности – это ВЭЖХ. Положительными качествами метода является: мягкость условий проведения анализа, эффективность разделения, высокая чувствительность, высокая скорость анализа, широкий диапазон молекулярных масс веществ, с которыми можно работать.

В настоящее время одним из популярных видов ВЭЖХ является гидрофильная хроматография, которая может применяться как индивидуальный метод. Для элюирования используются смеси воды или буферных растворов и органических растворителей, при этом органические растворители должны смешиваться с водой. Часто используемый элюент – ацетонитрил с буферными добавками. Один из важнейших факторов – это то, что разделение идет в комбинации с УФ датчиками, это позволяет одновременно сканировать несколько длин волн.

Основной целью выпускной квалификационной работы явилось установление возможностей гидрофильной хроматографии в анализе и идентификации вин.

Задачи, входящие в работу:

- Подготовить литературный обзор по методам анализа и контроля вин, способам выявления фальсификаций, достоинствам и недостаткам хроматографических методов анализа;
- Исследовать влияние условий ВЭЖХ эксперимента (рН среды, природы неподвижной фазы, состава элюента) на возможность разделения и определения органических кислот, входящих в состав вин;
- Подобрать условия гидрофильного варианта ВЭЖХ, позволяющие добиться удовлетворительного разделения исследуемых компонентов;

- Получить градуировочную зависимость и провести количественный анализ винной кислоты в некоторых образцах вин методом абсолютной градуировки.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. 1 Хроматография – общие сведения

Современная ВЭЖХ считается одним из самых мощных физико – химических аналитических методов, которые используются для анализа сложных смесей веществ. Биохимия, фармацевтическая химия, нефтехимия, судебная медицина, пищевая промышленность, экологический контроль, медицина – и это вовсе не окончательный список развития науки и производства, где использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в качестве аналитического способа обеспечило значительный прогресс. Далеко не исчерпан потенциал ЖХ в качестве аналитического метода, а именно в вопросах принятия сходства сложных физико – химических систем, у которых от природы непостоянный состав: вино, нефть. Во время исследований сложных объектов, содержащих смеси органических веществ, эксперты-аналитики используют несколько физико – химических методов. Их в то же время разделили на 2 вида: методы, которые позволяют распознавать соединения и вести их количественный анализ, такой способ называют структурным; и способы разделения сложных смесей веществ на отдельные составляющие (в совершенстве – на отдельные вещества). К структурным относят масс – спектроскопию, радиоспектроскопию, молекулярную спектроскопию. Но даже мощные структурные методы такого типа, как масс-спектропия и ядерный магнитный резонанс, не способны справиться с анализом сложных веществ. В данном случае следует заранее выделить из смеси вещества, которые нас интересуют, а потом использовать структурные методы для их исследований. Подобная методика очень трудоёмка и зачастую приводит к неверным результатам, чаще всего при анализе нестабильных соединений. Эти недочёты разрешимы при использовании ЖХ, в которой сочетается хроматография – и один или нескольких типов структурных методов, аппаратно – реализуемых в виде специальных детекторов. Хроматограф

является установкой, в которой реализован метод хроматографии. Хроматографический метод основан на различном расположении лекарств между 2 фазами без смешивания – подвижной и неподвижной. Подвижная фаза обычно представляет собой газ или жидкость, а неподвижная – твердое вещество, которое называется носитель. Когда подвижная фаза перемещается вдоль неподвижной, компоненты смеси сорбируются в твердой фазе. Метод хроматографического анализа был разработан русским ботаником М.С. Цветом в 1903 году. Посредством процедуры Михаилу Семеновичу удалось разделить хлорофилл на компоненты. Когда экстракт хлорофилла пропускают через заполненный мелом столбик, он получил небольшие пятна и назвал данные зоны хроматограммой, а метод – хроматографией. Дальнейшее развитие хроматография получила в работах лауреатов Нобелевской премии А. Мартина и Р. Синджа. Именно они предложили и разработали метод распределительной хроматографии (1941 г.). Затем, в 1952 г. А. Мартин и Л. Джеймс получили первые успехи в области газожидкостной хроматографии. В РФ режим гидрофильной хроматографии интенсивно продвигал Леонид Сапрыкин под названием «ДИРФ», (динамически – индуцированное разделение фаз); эта своеобразность объясняется тем, что автор часто трудился в режиме динамического модифицирования, варьируя селективность силикагеля (и попутно сражался с его не особо высоким качеством). В 1990 – 1992 годах в «Заводской лаборатории» были размещены первые российские статьи, где были описаны аналитические подходы с использованием режима гидрофильной хроматографии. Известность этому режиму принесло сочетание жидкостной хроматографии с масс – спектроскопическим детектированием и с аналитическими задачами в сфере протеомики и фармацевтики. Почти все полипептиды и лекарственные субстанции имеют высочайшую полярность; а значит для их разделения в ОФ режиме большую часть в элюенте должна занимать вода, что удобно и с точки зрения МС детектирования. В гидрофильном режиме подвижная фаза

обогащена органическим растворителем, и это дает этому варианту большие возможности в хроматографическом разделении. Именно поэтому его начали использовать снова. Хроматографический способ анализа многофункционален и применим к различным объектам исследования, в том числе нефти, фармацевтическим веществам, веществам растительного и животного происхождения, воде, продуктам питания. Хроматография характеризуется самой высокой избирательностью и самым низким пределом обнаружения. [1].

1.1.2 Принцип работы жидкостного хроматографа

В жидкостной хроматографии высокого давления – высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) раствор пробы, то есть образец, вводят в верхнюю часть хроматографической колонки, затем, с использованием насоса проба движется в потоке элюента. Элюент представляет собой растворитель или смесь растворителей, предназначенных для анализа в условиях [2]. Элюат, вытекающий из хроматографической колонки, содержащий разделенные элементы анализируемой смеси, детектируется детектором, чьи показания записываются регистратором. [3].

Хроматограмма является результатом хроматографического анализа: кривая, которая описывает зависимость концентрации, веществ которые мы анализируем от времени. Хроматограмма состоит из пиков (максимумов). Каждый максимум при полном разделении соответствует персональному компоненту пробы, которую мы анализируем. Высота и площадь пика пропорциональна концентрации компонента в элюате. Существует также понятие «хроматографические условия», оно включает марку и тип используемого хроматографа, размеры колонки и используемого в нем адсорбента, состав и расход элюента, $T(C^0)$ термостата колонок. [4].

1.1.3. Хроматографические методы анализа

Хроматографические методы анализа настолько велики и разнообразны, что их можно разделить на несколько классов: в зависимости от агрегатного состояния фаз, от способа проведения процесса, по типу взаимодействию вещества с сорбентом, по цели осуществления процесса.

Исходя из физического состояния фаз, различают газовую (ГХ) и жидкостную хроматографию (ЖХ). В ГХ в качестве подвижной фазы применяют пар или газ, а в ЖХ в качестве подвижной фазы – жидкость. Вторая классификация – в зависимости от способа проведения процесса, здесь различают плоскостную и колоночную хроматографию. Плоскостная хроматография (ПХ) представляет собою метод разделения, анализа и физико – химического исследования веществ, в которых перемещение элюента обусловлено капиллярными силами. ПХ бывает двух видов: хроматография на бумаге (БХ) и тонкослойная хроматография (ТСХ). Колоночная хроматография – процесс разделения в колонках, заполненных сорбентом. Классификацию в зависимости от способа хроматографирования можно разделить на три вида: проявительная (элюентная) хроматография, вытеснительная, и фронтальная. В соответствии с механизмом взаимодействия вещества с сорбентом различают: распределительную, адсорбционную, ионообменную, окислительно – восстановительную, комплексообразовательную, осадочную. С целью проведения хроматографического процесса классифицируют аналитическую и препаративную хроматографию. Аналитическая хроматография – метод качественного и количественного анализа веществ. Препаративная хроматография – метод выделения чистых веществ из смеси. [5].

1.1.4 Параметры удерживания

Удерживание – основная характеристика вещества в ЖХ. Есть несколько величин, которыми можно выразить удерживание: по максимуму пика, нулевое время, нулевой объем, приведенное время, фактор емкости. Первое – по положению максимума пика определяется время его удерживания. Второе – нулевое время – это время, затрачиваемое полностью несорбируемым веществом на прохождение по колонке от узла ввода пробы до кюветы детектора. Третье – приведенное время – это разница между временем удерживания вещества и нулевым временем. И последнее – фактор емкости – это отношение приведенного времени удерживания вещества к нулевому времени. [6].

1.1.5 Пиковая плотность и Эффективность

Эффективность – величина, которой определяется качество хроматографической колонки. Эффективность – есть мера размывания хроматографической зоны вещества, и, соответственно ширины его пика. Эффективность равна квадрату отношения времени удерживания к ширине пика, помноженному на коэффициент, зависящий от высоты, на которой определялась ширина. Другая величина – пиковая плотность, она тоже характеризует качество хроматографической колонки. Она равна числу пиков, которые могут быть расположены на хроматограмме друг за другом до определенного времени, и предполагается, что разрешение всех пиков равно 1 [7].

1.2 Гидрофильная хроматография

1.2.1 Основные методы

Особенностью гидрофильной ЖХ является разделение компонентов в условиях, когда полярны и подвижная и неподвижная фазы [8]. Важнейшее влияние на разделение оказывают Ван-дер-Ваальсовы силы

взаимодействия компонентов с ПФ. В ВЭЖХ в гидрофильном режиме используют полярные неподвижные фазы, ими являются силикагель и аминофаза, причем чаще используют аминофазу. В качестве элюента используют ацетонитрил, или еще с добавлением буфера, чтобы пики лучше разделялись.

Подготовка ПФ включает в себя следующие действия: элюент смешивают в определенных пропорциях и проводят дегазацию. Процесс дегазирования проводят, чтобы предотвратить попадание воздуха в колонку. При прохождении компонентов через колонку, они взаимодействуют с сорбентом и задерживаются на поверхности сорбента с различными временами удерживания, в результате они разделяются и последовательно выходят на детектор. Детекторы бывают разные, в зависимости от их типа определяется чувствительность количественного определения. Наиболее распространенными являются оптические детекторы, они работают в видимой части спектра или в УФ. Детектирование подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера. В качестве методов количественного анализа используют методы градуировки, внутреннего стандарта и т.п. [9].

1.3 Виноделие

1.3.1. История виноделия

Виноделие – это процесс изготовления вина. Родиной винограда, как правило, считают Закавказье, Иран, Среднюю Азию, Афганистан, Малую Азию. Виноделие возникло, когда люди освоили выращивание и разведение винограда [10], а это случилось примерно 4 – 6 тысяч лет до н.э. Первые производства возникли на Ближнем Востоке, Древнем Египте, Китае, Грузии, Месопотамии, Кипре, Греции. Известным ферментативным напитком является рисовое вино, его изготовили в Китае 9000 лет назад, в Египте ещё до строительства пирамид, уже было известно около 10 сортов

белого и красного вина. Спустя годы, виноградарство распространилось в страны Северной Африки, Европы, где были подходящие климатические условия. Древнейшими винодельческими районами считаются – Грузия, Азербайджан, Армения, Украина, Молдавия. В 2010 г. В Армении, в пещерах обнаружена одна из древнейших из известных виноделен, датированная 4100 – 4000 гг. до н.э. [11]. В Греции, были обнаружены следы прессовки винограда, относящиеся к 5 тыс. до н.э. [12].

1.3.2 Виды виноградных вин

Государственный стандарт включает тринадцать видов виноградных вин: Вино, которое характеризуется своим высоким и постоянным качеством, характеризуется своей спецификой производства из специальных сортов винограда или определённо подобранной их смеси, которая растёт в регламентируемых районах, имеет тонкий вкус и аромат (букет) – это ароматизированное вино. Перед розливом его в бутылки требуется выдержка.

Мистель – крепкое вино, в котором процесс алкогольной ферментации, то есть, (спиртового брожения) прекращается при добавлении этилового спирта.

Вино без выдержки изготавливают по установившейся методике из отдельных сортов винограда или их смеси.

Вино высокого качества, изготовленное по индивидуальной или установившейся методике из специальных сортов винограда определенного района произрастания, является вином по происхождению. Его своеобразные органолептические свойства, связаны с ЭКО – условиями среды, указанной в названии.

Виноградное вино – напиток, который получают брожением чистого сока винограда.

Виноградное сусло — это текучий продукт, полученный из свежего винограда после трёх этапов: дробления, стекания, прессования.

Выдержанное вино – вино лучшей характеристики, производимое по специальной технологии из отдельных сортов винограда или их смеси. Перед розливом вино необходимо выдерживать 182 дня.

Газированное – это вино, приготовленное физическим насыщением обработанного виноматериала углекислым газом (CO₂).

Коллекционное вино – это марочное вино, которое хранится в стационарном резервуаре после окончания выдержки в бутылках не менее трёх лет.

Молодое вино – натуральное сухое вино, произведенное по установленному методу из отдельных сортов винограда или их смеси, материализуется до начала следующего за урожаем винограда года.

Вино натуральное получают полной или неполной ферментацией сусла, или мезги, который в то же время содержит этиловый спирт только эндогенного происхождения, (допускается использование концентрата виноградного сока).

Специальное вино – полученное путем абсолютной или несовершенной ферментации сусла, или мезги с добавлением этилового спирта, (разрешается использование концентрата виноградного сока или мистеля).

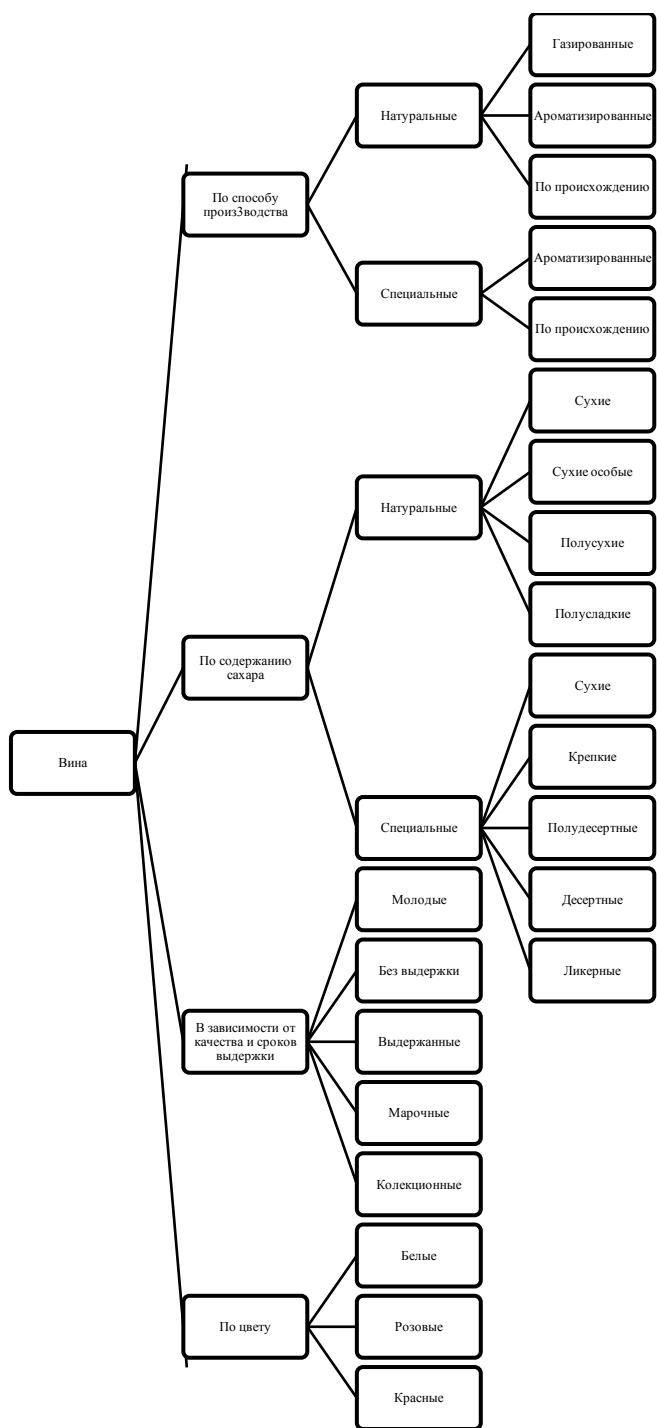
1.3.3 Классификация вин

В зависимости от важных факторов, определяющих качество вина, вины делят, как указано в таблице (табл.1).

1.3.4 Методика изготовления

Климат и почва оказывают основное влияние на качество и химический состав ягод винограда, соответственно, и на химический состав вина [13,14]. На произрастание разных сортов винограда,

Таблица 1. Классификация вин



урожайность и качество получаемого вина влияют экологические факторы: экспозиции склонов, почв и высоты над уровнем моря, для развития качественного виноделия, и ведутся анализы материалов по изучению вышеперечисленных факторов [15,16]. Химический состав ягод, уровень

содержания и соотношение в нем БАС (биологически активных соединений) несёт истинную информацию о степени соответствия биологических признаков сорта условиям выращивания, которые отражают биохимические особенности и степень ценности винограда [17,18]. Место производства винограда для изготовления вин представляет собой район, где его выращивают, впоследствии чего получают вина особого качества с типичными органолептическими свойствами, которые свойственны различным сортам. К винам защищённых географических наименований предъявляют строгие требования, которые касаются стабильности химического состава, агротехники, используемая в их технологии. Такие вина пользуются большим спросом у покупателей, так как отличаются высокими вкусовыми качествами и известностью, определяемыми природными факторами, такие как климат, рельеф, сорт винограда.

Виноград является сырьём для изготовления вина. Сбор винограда проходит, когда виноград достигает полной спелости. Технические сорта винограда, которые используются в виноделии бывают двух типов: специальные и универсальные. Для производства виноградных вин используются специальные сорта. Из универсальных сортов готовят различные виды вин.

При изготовлении виноградных вин используются общие принципы: добывание виноградного сусла, получение сырья, дробление, ферментация первичная и вторичная, добавление сахара, отделение осадка, дополнительное брожение, выдержка, розлив. Есть два главных способа обработки винограда на сусло: первая – по белому способу (в этом способе сусло быстро отделяется от мезги и далее ферментируется), вторая – по красному (с брожением мезги). Для производства белых натуральных вин применяют белый способ [19]. Технология белого способа позволяет быстро экстрагировать сусло и предотвратить его от воздействия кислорода воздуха. Полученное вино имеет белый или розовый цвет, свежую

кислинку во вкусе и лёгкий сортовой аромат. Во время обработки винограда по красному способу вино преимущественно будет иметь красный, розовый, а иногда жёлтый цвет. Первое, что делают при производстве вина – сбор винограда. Обработкой винограда занимаются после 4 – х часов после сбора, далее необходимо его переработать. Затем следующий этап – отжим. Чтобы выделить сок, поступивший виноград направляют на дробление. После измельчения получается мезга, от неё самостоятельно отсоединяется сусло-самотек – это самая ценная фракция, именно из неё получают вина лучшего качества. Далее мезгу прессуют чтобы выделить оставшееся сусло, что приводит к получению сусла I, II, III фракции, т.е. давления. Сусло I давления используются для получения вин марочных, а II и III – для получения всех остальных типов. Для удаления взвешенных частиц, виноградное сусло отстаивают [20]. Чтобы предотвратить окисление и развитие микроорганизмов в момент защиты, необходимо обработать диоксидом серы (SO_2). Молодое вино получают после ферментации, которое осуществляется винными дрожжами при температуре 14 -18 °С. Во время обработки винограда по красному способу извлекается больше экстрактивных, красящих, фенольных и ароматических веществ из виноградной грозди, при этом применяют различные методы. Одним из них является: настаивание сусла на мезге после измельчения винограда, или нагревание мезги. По красному способу получают красные натуральные, специальные крепкие, все десертные, розовые и жёлтые вина. Молодое вино, полученное по бело – красному методу, выдерживают. В процессе выдержки формируется аромат и букет, выпадают в осадок нестойкие соединения, вино становится светлым и стойким к помутнениям. Для выдержки применяют деревянные бочки, объемные металлические резервуары, бутылки. При выдержке вина возможен его газообмен с воздухом (так, например, происходит в деревянных бочках), а возможна выдержка без доступа воздуха. Доступ воздуха способствует созреванию молодых вин, а отсутствие газообмена ухудшает условия созревания.

В процессе выдержки также проходят процессы переливки и доливки. Переливание нужно для отделения осветлённого вина от полученного в результате выдержки или хранения осадков для обеспечения доступа кислорода, формирования и созревания вин. Доливание применяется для устранения образования над вином свободного воздушного пространства, которое может стать причиной окисления компонентов вина и развития аэробных микроорганизмов. Для каждого вида вин существуют свои требования к частоте доливки (для крепких вин - один или максимум два раза в год, для десертных – один раз в месяц, для натуральных – не реже одного раза в неделю).

При поступлении на продажу, вино должно быть прозрачным. Для обеспечения стабильности винам их подвергают различным видам обработки. К физическим методам относят 1. центрифугирование, 2. фильтрацию, 3. термическую обработку. При термическом методе вино охлаждается до температуры замерзания ($T_{\text{замер}}$). Далее полученное вино выдерживают, в итоге нестойкие соединения выпадают в осадок, затем в таких же условиях фильтруются; либо теплом – горячий розлив или длительного нагревания. Оклеяка – физико–химический метод осветления и стабилизации вин, при этом в вино вводят органические и неорганические вещества. К органическим относят желатин, а к неорганическим – полиакриламид. Эти вещества содействуют оседанию мутеобразующих элементов (полисахариды). Для удаления из вина избытка ионов металлов (в особенности железа и меди) используют деметаллизаторы (ЖКС, трилон Б, фитин). Для устранения помутнения вина пользуются биохимическим методом, в частности применением ферментных препаратов. На практике используются комплексные схемы обработки вина, они сочетают в себе прежние способы и приёмы. После обработки всеми способами форсируется выделение из вина нестойких коллоидных соединений, которые способны через некоторое время выпасть в осадок. Не исключены и помутнения в готовых винах. Болезни и пороки –

вот главные их причины. Готовые и выдержанные вина не всегда соответствуют требованиям, которые к ним предъявляются. Чтобы вино было качественным применяют эгализацию, ассамблирование, купажирование. Эгализация – технологическая операция, целью чего является получение однородного состава винодельческой партии [21]. Купажирование – это смешивание в определенном соотношении вин из разных сортов винограда. Это делается для улучшения качеств вина или вывода нового сорта, чтобы улучшить его качества, вывода нового сорта. Объединение мелких партий вина в большие в пределах одного сорта, но собранных из разных виноградников называется ассамблированием. По истечении выдержки вина разливаются в бутылки.

1.3.5 Пищевая ценность

Состав вина – это богатый минеральный комплекс, который включает в себя: Mg, Na, P, Fe, K, Ca, витамины PP и B₂ (табл.2).

«Таблица 2. Пищевая ценность»

Нутриент	Кол-во	Норма	% от нормы в 100 г	% от нормы в 100 ккал	100% нормы
Калорийность	66 кКал	1684 кКал	3.8 %	5.9 %	1684 г
Белки	0.2 г	76 г	0.3 %	0.5 %	67 г
Углеводы	0.3 г	211 г	0.1 %	0.2 %	300 г
Алкоголь (этиловый спирт)	8.8 г	-			
Органические кислоты	0.6 г	-			
Пищевые волокна	1.6 г	20 г	8%	12.5 %	20 г
Вода	88.2 г	2400 г	3.7 %	5.8 %	2384 г
Зола	0.3 г	-			
Витамины					
Витамин B ₂ , рибофлавин	0.01 мг	1.8 мг	0.6 %	0.9 %	2 г

Витамин РР, НЭ	0.1 мг	20 мг	0.5 %	0.8 %	20 г
Ниацин	01 мг	-			
Макроэлементы					
Калий, К	60 мг	2500 мг	2.4 %	3.8 %	2500 г
Кальций, Са	18 мг	1000 мг	1.8 %	2.8 %	1000 г
Магний, Mg	10 мг	400 мг	2.5 %	3.9 %	400 г
Натрий, Na	10 мг	1300 мг	0.8 %	1.3 %	1250 г
Фосфор, Р	10 мг	800 мг	1.3 %	2 %	769 г
Микроэлементы					
Железо, Fe	0.5 мг	18 мг	2.8 %	4.4%	18 г
Усвояемые углеводы					
Моно- и дисахариды (сахара)	0.3 г	max 100 г			

Углеводы вина – глюкоза и фруктоза. В винах содержание фруктозы и глюкозы 0,3 – 35 %. Сахара и кислоты содержатся в соке винограда, не менее важное значение имеют фенольные вещества, они накапливаются в кожице винограда и оказывают влияние на цвет вина. Положительным влиянием фенольных веществ является то, что они предотвращают развитие риска сердечно – сосудистых заболеваний, диабета и рака [46, 47]. Органические кислоты повышают аппетит, каждая кислота играет особую роль в формировании свойств вина. Этиловый спирт – это свойственный для вина компонент он влияет на вкус и аромат вина [22], он обеспечивает биологическую устойчивость к вину, препятствуя развитию патогенной микрофлоры. Летучие вещества: ацетали, альдегиды, сложные эфиры, эфирные масла, образуют букет вина [23, 24]. Вино содержит витаминный комплекс группы В (В1, В2, В3, В6, В12), биотин, пантотеновая кислота, РР, его ценность находится в разнообразии и хорошем соотношении компонентов. Окраску вина определяют антоцианы, которые определяли окраску ягод. Накопления антоцианов происходит по-разному у определенных сортов винограда. АК вина включают как АК сусла, так и

АК, которые выделены дрожжами в ходе брожения. Дегустационная оценка связана с физико – химическими показателями вина. Виноградное вино имеет не только пищевую, но и фармакологическую направленность.

1.3.6 Дефекты вин

В процессе производства и хранения вин их показатели качества становятся хуже. Если не остановить этот процесс, то вино окажется негодным ни для употребления, ни для переработки. Существует четыре группы изменений, которые ухудшают качество вин: это дефекты, болезни, пороки и недостатки, а также фальсификация.

Дрожжи и бактерии – вот чем обусловлены биологические помутнения вин [25]. Изменение химического состава из-за развития микроорганизмов приводит к ухудшению дегустационных свойств, – всё это болезни вин. Они имеют микробиологическое происхождение и проявляют себя глубоко видоизменяя структуру вина. Болезни от больных вин к здоровым переносятся легко, в связи с этим соблюдение санитарии является основным правилом. Болезни вин бывают двух видов – аэробные и анаэробные. Аэробные –микроорганизмы, для развития которым необходим кислород (цвель и уксуснокислое скисание). А Анаэробные – это микроорганизмы, развивающиеся в отсутствии кислорода. Они разрушают составные части вина, кроме спирта (прогоркание вин, мышинный привкус).

Цвель вина – характерное заболевание натуральных вин [26], с содержанием об. спирта не более 12%. Возбудителями которого являются пленчатые дрожжи *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* (оптимальная температура их развития 24 – 26 0С). Внешним признаком болезни является образование на поверхности вина плёнки мучнисто – белого оттенка. Плёнка легко рвется, при заболевании плёнка скатывается вниз, спирт под действием кислорода окисляется вплоть до его исчезновения, и в связи с этим вино мутнеет, появляется пустота, водянистость, затхлость. Предупредить от заболевания вино можно предохранив его от взаимодействия с атмосферой. Когда вино

хранят в бочках это достигается при регулярном доливании, окуриванием SO₂, пастеризацией с последующей фильтрацией. Разлитое в бутылки вино защищают от цвели, при хранении его в горизонтальном положении при температурах 12 – 16 °С.

Другим типом аэробной болезни является уксуснокислое скисание [27]. Это самое опасное и чаще встречающееся заболевание вин, содержащих в своем составе до 14 – 15 % спирта и имеющее низкую кислотность. Возбудителями уксуснокислого скисания являются бактерии рода *Acetobacter*, а переносчиками являются плодовые мушки дрозофилы. Болезнь возникает при антисанитарии. На поверхности вина образуется плёнка, которая имеет белый цвет. С развитием болезни плёнка скатывается вниз, в результате жизнедеятельности таких бактерий этиловый спирт окисляется в уксусную кислоту, в вине появляется запах и вкус уксусной кислоты, вино мутнеет. Предупредить от болезни вино можно при его хранении при температуре 10 -14 °С.

Анаэробные болезни. Существует шесть видов анаэробных болезней: ожирение, маннитное брожение, молочнокислое скисание, прогоркание вин, разложение винной кислоты и глицерина, мышинный привкус. Ожирение (тягучесть) вина, эта болезнь встречается реже, чем различного рода скисание. Возбудителями являются слизеобразующие бактерии вида *Leuconostoc* *Bacillus viscosus vini*. Заражённое вино – густое, по консистенции напоминающее масло. Если вовремя обнаружить болезнь вино легко исправляется в исходное состояние путем проветривания.

Вторым видом анаэробных болезней является маннитное брожение. Возбудителями болезни являются гетероферментативные теплолюбивые маннитные бактерии (*Lactobacterium mannitovorum*), которые поражают в основном красные вина. При маннитной ферментации некоторые составляющие вина расщепляются с образованием 6 –ти атомного спирта, уксусной и молочной кислот [28]. В результате вино мутнеет, приторный кисло – сладкий вкус, запах разлагающихся фруктов.

Молочнокислородное скисание – результат загрязнения вина молочнокислыми бактериями (*Bacterium gracile*, *Lactobacillus*). Возбудителями заболевания развиваются в глубине вина, образуя «колебания», их хорошо видно на свету [29]. Болезни подвержены все типы вин, содержащих сахар, с низкой кислотностью, хранящиеся при повышенной температуре. Испортившееся вино тускнеет, теряется блеск, появляется мышинный тон.

Прогоркание вин. Заболевают вина красные, реже белые. Возбудителями прогоркания вин – *Bacterium Amorgaculus*. Бактерии разлагают глицерин при этом образуя акролеин. Заражённое вино мутнеет, цвет меняется до грязно – бурого, а вкус становится горьким.

Возбудителями разложения винной кислоты и глицерина – *Bacterium tartarophthorum*. Если выделяется углекислый газ – это *russ*, если он не выделяется – *turn*. Болезни подвержены красные вина, так как они содержат фенольные и красящие вещества. В результате вино мутное, потерявшее свой цвет.

Мышинный привкус – самое стойкое заболевание натуральных, специальных и игристых вин. Возбудителями являются нитевидные бактерии, плесени близкие к *Monilia vini* [30]. При заболевании происходит разложение глюкозы, фруктозы и сахарозы, появляется неприятный вкус, далее вино мутнеет, мышинный запах проявляется сильнее. Вылечить вино можно только на ранних стадиях развития болезни путем сульфитации, переливок, подкисления, при глубоком поражении его вылечить невозможно.

1.3.7 Фальсификация вин

Вино – это сложный объект для анализа, так как показатели, характеризующие уровень качества вин, представлены слишком широким спектром соединений [31]. Нужно отметить, что вино реже подвергается фальсификации, чем другая алкогольная продукция. Самыми известными способами фальсификации вин являются: полная подмена одного вина

другим (собственно говоря, подмена дорогого дешёвым), при этом меняют этикетку, контрэтикетки, кольеретки. Контрэтикетка иными словами – это дилер, на ней отображается основная информация (дата изготовления, состав, вес, способы эксплуатации и т.д.). По ГОСТу размер этикетки на вине должен быть 90*130 мм, а контрэтикетки, 65*80 мм. В результате такой подмены изменяются органолептические показатели, а также, может измениться крепость продукции. Для этого, добавляют синтетические красители, такие как, фуксин, анилиновые, нафталиновые, антраценовые краски, стоит отметить, что, многие из них опасны для человеческой жизни, а также сахар и спирт [32].

Следующим видом является разбавления винной продукции питьевой водой, целью разбавления является «исправление» кислых вин, такой метод в литературе называют – галлизация. Подделка букета вин – это один из распространённых методов, здесь используют смеси сложных эфиров, ВЖК (высшие жирные кислоты). Применение запрещённых антисептиков (салициловая кислота $C_7H_6O_3$), её используют для консервации вин легко закисающих (вин низкого качества). Приготовление «искусственных вин», в данном случае «самосбор» смеси компонентов, которые можно принять за вино, хотя они так таковыми не являются. В состав такого «самосбора» входят: дрожжи, вода, подсластители, фруктовые кислоты (в основном винная и лимонная), глицерин, спирт этиловый. Глицерин используют как отдельный вид фальсификации, по-другому метод называется – шеелизация. При его добавлении уменьшается горечь, увеличивается сладость во вкусе, уменьшается кислотность [33]. Комплексные методы – наиболее часто используемые. Цель таких методов – улучшение некачественных вин. Моделирование (маскировка) – один из распространённых способов фальсификации, в основе лежит внесение пищевых искусственных веществ (ароматизаторов). Идентификация ароматизаторов сложна тем, что в его составе такие же компоненты, что и в той или иной продукции, даже если концентрации этих соединений резко

отличаются (от типичных), то это не является поводом для положительного заключения о наличии ароматизаторов в вине, так как, выявленные различия могут быть вызваны в различной технологии производства [34]. Ароматизаторы – это пищевые добавки, которые придают улучшенный аромат и вкус продукту, они могут представлять из себя смесь ароматических веществ либо индивидуальное вещество. Ароматизаторы бывают: натуральные, идентичные натуральным, искусственные (табл.3) [35].

«Таблица 3. Виды ароматизаторов»

Натуральные	Идентичные натуральным	Искусственные
Вкусовая и ароматическая часть такого ароматизатора содержит натуральные вкусоароматические вещества и только.	Вкусовая и ароматическая часть такого ароматизатора содержит одно или несколько вкусоароматических веществ, которые полностью идентичны натуральным.	Вкусовая и ароматическая часть такого ароматизатора содержит одно или несколько искусственных вкусоароматических веществ или препаратов.

Индивидуальные ароматические вещества можно разделить на группы: (табл.4).

«Таблица 4. Индивидуальные ароматизаторы»

Ароматические (вкусоароматические) вещества натуральные	Ароматические (вкусоароматические) идентичные натуральным	Ароматические (вкусоароматические) искусственные
По-другому их называют душистыми, выделяют их из сырья растительного или животного происхождения.	Идентифицированные в сырье растительного и животного происхождения, получают такие вещества путём химического синтеза,	Получают их химическим синтезом, не идентифицированные до нынешнего времени в сырье растительного или животного происхождения.

	либо выделением из натурального сырья.	
--	--	--

Использовании натуральных ароматизаторов приводит к удорожанию той или иной продукции. При изготовлении фальсифицированных вин это невыгодно, поэтому изготовители заменяют их на более дешевые.

1.3.8 Признаки использования ароматических веществ в продукции

К критериям использования ароматических веществ можно отнести: присутствие растворителей, характерных веществ, нехарактерных оптических изомеров и отсутствие характерных веществ. Самым элементарным способом выявления ароматизаторов считается установление растворителей. Обычно, в качестве растворителей используют $C_3H_8O_2$ – пропиленгликоль, $C_9H_{14}O_6$ – триацетин, этиловый спирт-сырец, который содержит краситель, масло. Способ выявления базируется на том, что триацетин и этиленгликоль не содержатся в натуральных продуктах, поэтому при их обнаружении можно сделать вывод о том, что использовался ароматизатор. Нехарактерные ароматизаторы выявляют с помощью идентификации веществ, которые не присущи для той или иной продукции. Одним из доказательств присутствия ароматических веществ, может быть отсутствие для данного наименования ароматизаторов, к примеру, если в аромате грейпфрутового сока отсутствует нуткатон (высококачественный естественный ароматизатор), это свидетельствует о том, что продукт является подделкой, а значит, при его производстве был использован комплекс ароматизаторов, полученных не из грейпфрута. Присутствие ароматизаторов можно выявить с помощью оценки концентрации, к примеру, если в соке винограда метилантраниллата содержится больше 150 мг/дм^3 , то это не подлинный сок. Самым эффективным способом считается выявление ароматических веществ по оценке содержания их оптических и пространственных изомеров. Соединения, синтезируемые в растительных и

животных тканях имеют оптические или пространственные изомеры. Но в состав природных объектов они входят в виде одного изомера. Так 2-метилбутират в яблочном соке существует в виде S-изомера.

1.3.9 Определение фруктовых кислот, углеводов

Содержание ФК и углеводов оценивается в винах методом ОФ ВЭЖХ. Авторы Захарова А.М., Карцова Л.А., Гринштейн И.Л. исследовали этот вопрос в работе: «Определение органических кислот, углеводов и подсластителей в пищевых продуктах и биологически активных добавках методом ВЭЖХ».

Органические кислоты – это вкусовые компоненты в продукции, выступают как индикаторы качества, или порчи при хранении [36]. Такие фруктовые кислоты, как: лимонная, яблочная, содержатся в продуктах и способствуют лучшему усвоению пищи. Что касается углеводов, то они являются важнейшими органическими компонентами продуктов, которые имеют большую энергетическую ценность для человека (75%). Состав, соотношение углеводов в пище зависит от их вкуса, условий и срока годности. Одним из главных критериев качества многих продуктов, в том числе вин, является состав и концентрация углеводов (содержание нормируется в ГОСТах, ГОСТ 33287-2015). Определение органических (фруктовых) кислот, главное – информация об их составе считается самым важным показателем подлинности вина. Такие свойства вин как бактерицидные, вкусовые, ароматические, определяются фруктовыми кислотами [37]. В качественном и количественном составе кислот отражены особенности технологического процесса. Он позволяет выявить факты использования винограда плохого качества, искусственного изменения кислотности. В виноградных винах преобладает винная кислота. Если отмечается высокое содержание лимонной кислоты при сниженной концентрации винной, яблочной и молочной (либо их полном отсутствии), то это указывает на факт их фальсификации. Содержание кислот нормируется ГОСТ, как и другие показатели [38]. Органические кислоты

определяют различными методами, в том числе, ВЭЖХ [39]. Достоинством ВЭЖХ является то, что она даёт возможность разделения огромного количества фруктовых кислот и углеводов недорого и без длительной пробоподготовки [40,41,42,43].

Про то, какое положительное влияние на формирование технологических качеств и органолептических особенностей виноградного колера оказывают органические кислоты говорится в работах Бурцева Б.В.:« Расширение ассортимента вырабатываемых в России специальных вин определяет необходимость более глубокого изучения процессов, протекающих при получении виноградного колера – одного из важнейших купажных компонентов ряда специальных вин, а также различных факторов, определяющих его качество, в частности влияние органических кислот» [44, 45].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реагенты, оборудование и объекты исследования

Оборудование:

1. Жидкостный хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы Agilent Technologies 1220
2. Хроматографический шприц Agilent 1220;
3. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse C18 (4.6×100мм), произведена в Agilent;
4. Колонка хроматографическая ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм), произведена в Agilent;
5. Колонка хроматографическая ZORBAX NH₂ (4.6×150мм), произведена в Agilent;
6. Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
7. Аналитические весы.
8. Спектрофотометр Unicо 2800

Реагенты:

1. Ортофосфорная кислота, х.ч;
2. Ацетонитрил (Macron Fine Chemicals) в качестве элюента;
3. Дистиллированная вода;
4. Метанол.

Объекты исследования:

1. Различные вина (Красное Кагор, красное Torre Tallada, белое Шардоне);
2. Фруктовые кислоты (молочная, винная, щавелевая, лимонная, уксусная, янтарная);
3. Клюква.

2.2 Методика выполнения эксперимента

2.2.1 Хроматографический анализ

ВЭЖХ анализ вин, фруктовых кислот, клюквы осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220, оборудованном УФ-спектрофотометрическим детектором. Образцы исследовали при оптимальных условиях: длина волны составляла от 210 – 600 нм, объем вводимой пробы составил 50 мкл. Обработывали данные в программе LC 1220 OpenLAB online.

В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали ацетонитрил, ацетонитрил подкисленный ортофосфорной кислотой, метанол.

Для приготовления растворов использовали точные навески фруктовых кислот, которые далее растворяли либо в дистиллированной воде, либо в ацетонитриле, подвергая ультразвуковой обработке при температуре 25 °С до полного растворения.

Хроматографическое удерживание фруктовых кислот (молочная, винная, щавелевая, лимонная, уксусная, янтарная) исследовали на колонках ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм), ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм) и ZORBAX NH₂ (4.6×150мм), в качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил-буфер в соотношении 2:8 или 8:2, ацетонитрил (подкисленный ортофосфорной кислотой КН₂РО₄), или метанол-буфер в соотношении 7.5: 2.5. Длины волн составили от 210 – 290 нм, а объем вводимой пробы 50 мкл.

2.2.2 Метод количественного измерения

Количественное содержание кислот оценивали ВЭЖХ методом абсолютной градуировки.

Были получены градуировочные кривые по 5 – 7 сериям стандартных растворов для лимонной и винной кислот. Были получены уравнения, описывающие эти зависимости, с высокими коэффициентами корреляции.

Данные зависимости использовались далее для количественного определения лимонной и винной кислот.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Подбор хроматографических условий

Жидкостная хроматография имеет большое значение в современном мире, применяется для анализа различных веществ, в том числе в анализе вин. Высокоэффективная жидкостная хроматография является точным, быстрым, экономичным, и верным методом для анализа вина.

В зависимости от природы подвижной и неподвижной фаз различают нормально – фазовую (НФХ) и обращённо – фазовую (ОФ) хроматографию. В НФ (нормально – фазовой) ВЭЖХ неподвижная фаза – полярная (SIL), ПФ – неполярная (гексан, как классический вариант). Что касается обращённо – фазовой, в ней НФ – неполярная (C6, 16, C18), а полярная (H₂O, CH₃CN, MeOH).

Гидрофильная хроматография – это идеальный вариант для анализа кислотного состава вин, так как она сочетает в себе варианты нормально – фазовой и обращённо – фазовой хроматографии. В наши дни большинство анализов полярных веществ проводится методом ОФ ВЭЖХ. Но на неполярной неподвижной фазе (НФ) не происходит разделения органических кислот.

Цель работы – исследовать возможности гидрофильной хроматографии в анализе и идентификации вин, в том числе, подобрать такие условия, в которых происходило разделение органических кислот.

Началом нашей работы было исследование хроматографического поведения фруктовых кислот на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). Элюентом послужил: ацетонитрил-вода в соотношении 8:2 длина волны при этом 210 нм.

Замена в данном хроматографическом режиме элюента на метанол-вода 7.5: 2.5 не привел к изменению результатов. А, следовательно, использование данной НФ независимо от состава элюента в изократическом режиме не позволяет разделить фруктовые кислоты. (табл. 5).

Таблица 5. Анализ фруктовых кислот при 210 нм

Вводимое вещество	Длина волны λ , нм	Элюент, Время удерживания t_R	Элюент, Время удерживания t_R
Молочная кислота	210	АСN:H ₂ O (8:2) 0,894	MeOH:H ₂ O(75:25) 0,779
Винная кислота	210	АСN:H ₂ O (8:2) 0,916	MeOH:H ₂ O(75:25) 0,975
Щавелевая кислота	210	АСN:H ₂ O (8:2) 0,962	MeOH:H ₂ O(75:25) 0,955
Лимонная кислота	210	АСN:H ₂ O (8:2) 0,953	MeOH:H ₂ O(75:25) 0,991
Уксусная кислота	210	АСN:H ₂ O (8:2) 0,958	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,063
Янтарная кислота	210	АСN:H ₂ O (8:2) 0,919	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,002

Следующим шагом была оценка влияние рН среды на хроматографическое поведение фруктовых кислот. Для этого образцы кислот вкалывались при рН=3.1 и рН=1.64. Элюентом был ацетонитрил-ортофосфорная кислота (КН₂РО₄) при длине волны 210 нм. (табл.6).

Таблица 6. Анализ щавелевой кислоты

Вводимое вещество	Длина волны λ , нм	Элюент, Время удерживания t_R	Элюент, Время удерживания t_R
Щавелевая кислота	210	АСN:КН ₂ РО ₄ рН=3,1 0,990	АСN:КН ₂ РО ₄ рН=1,64 1,042

Далее при рН=1.64 мы прокололи смесь кислот. В этих условиях компоненты быстро элюируются и не удерживаются в данном варианте.

Для увеличения времени удерживания мы поменяли соотношение элюента ацетонитрил-вода 2:8. При тех же условиях мы кислоты растворили в воде и вкололи. Смена состава элюента и рН среды не улучшили разделение (рис.1).

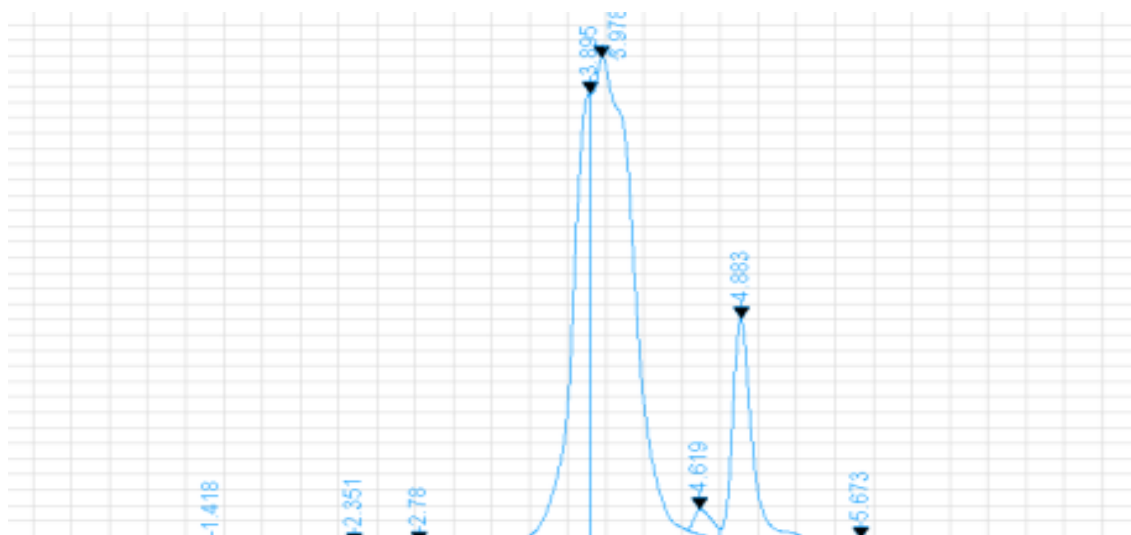


Рисунок 1 – Анализ смеси фруктовых кислот. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода-ортофосфорная кислота 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 210 нм, скорость потока 1мл/мин.

Следующим этапом было исследование хроматографического поведения кислот в кислой среде. Для этого к элюенту ацетонитрил-вода 2:8 мы добавили каплю ортофосфорной кислоты, а кислоты растворили в воде и вкололи. По полученной хроматограмме можно сделать вывод, что кислая среда подходит для разделения фруктовых кислот наилучшим образом (табл.7).

Таблица 7. Анализ фруктовых кислот в кислой среде

Вводимое вещество	Длина волны λ , нм	Элюент, Время удерживания t_R	Элюент, Время удерживания t_R
Молочная кислота	210	ACN:H ₂ O (2:8) 1,729	ACN:H ₂ O(2:8)+KH ₂ PO ₄ 0,977
Винная кислота	210	ACN:H ₂ O (2:8) 1,122	ACN:H ₂ O(2:8)+KH ₂ PO ₄ 1,028
Щавелевая кислота	210	ACN:H ₂ O (2:8) 1,072	ACN:H ₂ O(2:8)+KH ₂ PO ₄ 0,956
Лимонная кислота	210	ACN:H ₂ O (2:8) 1,037	ACN:H ₂ O(2:8)+KH ₂ PO ₄ 1,070
Уксусная кислота	210	ACN:H ₂ O (2:8) 0,891	ACN:H ₂ O(2:8)+KH ₂ PO ₄ 1,275

Янтарная кислота	210	ACN:H ₂ O (2:8) 1,296	ACN:H ₂ O(2:8)+KH ₂ PO ₄ 1,312
------------------	-----	-------------------------------------	--

После выбора условий хроматографии мы проанализировали белое вино Шардоне (Тамани). Для начала сняли УФ спектр, получили значения ($\lambda = 193$ нм $A_1 = + 0.884$), ($\lambda = 288$ нм $A_2 = +0.081$). Хроматограммы также снимали при $\lambda = 210$ нм, что составляет максимум поглощения для кислот. Вино смешали с водой, элюент ацетонитрил-вода-ортофосфорная кислота. Данный вид анализа нам не подошёл, так как компоненты элюируются быстро.

Особенности хроматографического поведения кислот исследовали на колонке ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). Далее, проколола смесь винной, уксусной и янтарной кислот при длине волны 210 нм, разделения не наблюдалось.

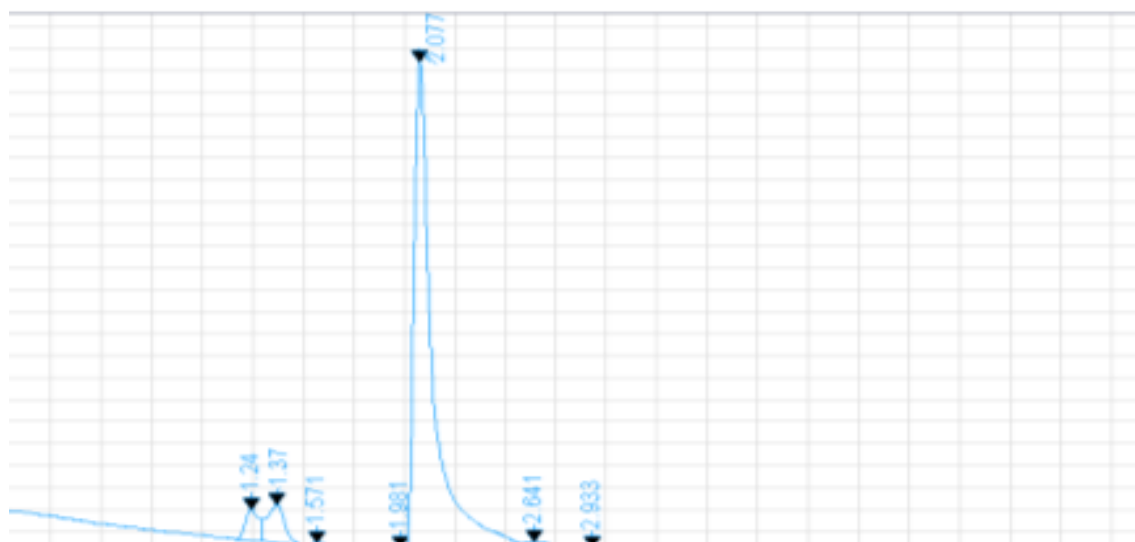


Рисунок 2 – Анализ смеси винной, уксусной и янтарной кислот. НФ: ZORBAX NH₂ (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 210 нм, скорость потока 1мл/мин.

Следующим видом неподвижной фазы была колонка с силикагелем ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм). В этой хроматографической системе в

качестве элюента использовали как смесь ацетонитрил-вода, так и метанол – вода в соотношениях 2:8 и 75:25 соответственно.

Времена удерживания, полученные в трех хроматографических системах, приведены в таблице 8.

Наиболее подходящей системой является система с неподвижной фазой силикагель, при использовании в качестве элюента системы ацетонитрил-вода 2:8.

Таблица 8. Анализ фруктовых кислот с разными элюентами и колонками

Вводимое вещество	Элюент, Время удерживания, Колонка NH ₂	Элюент, Время удерживания, Колонка SIL	Элюент, Время удерживания, Колонка SIL
Молочная кислота	АСN:H ₂ O(2:8) 1,860	АСN:H ₂ O(2:8) 1,931	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,797
Винная кислота	АСN:H ₂ O(2:8) 1,886	АСN:H ₂ O(2:8) 1,764	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,743
Щавелевая кислота	АСN:H ₂ O(2:8) 1,888	АСN:H ₂ O(2:8) 1,854	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,672
Лимонная кислота	АСN:H ₂ O(2:8) 1,886	АСN:H ₂ O(2:8) 1,783	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,749
Уксусная кислота	АСN:H ₂ O(2:8) 2,475	АСN:H ₂ O(2:8) 4,138	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,732
Янтарная кислота	АСN:H ₂ O(2:8) 2,237	АСN:H ₂ O(2:8) 2,206	MeOH:H ₂ O(75:25) 1,709

Согласно литературным данным, образцы вина хроматографировали в спектральном диапазоне 210-600 нм (210, 230, 254, 270, 290, 330, 370, 420, 460), на колонке ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм) элюент ацетонитрил-вода 2:8. В данном режиме можно ожидать деления фруктовых кислот присутствующих в вине.

Искусственную смесь кислот прокололи при двух длинах волн: 210 нм и 230 нм, на колонке ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм) элюент ацетонитрил-вода 2:8 (рис.3,4)

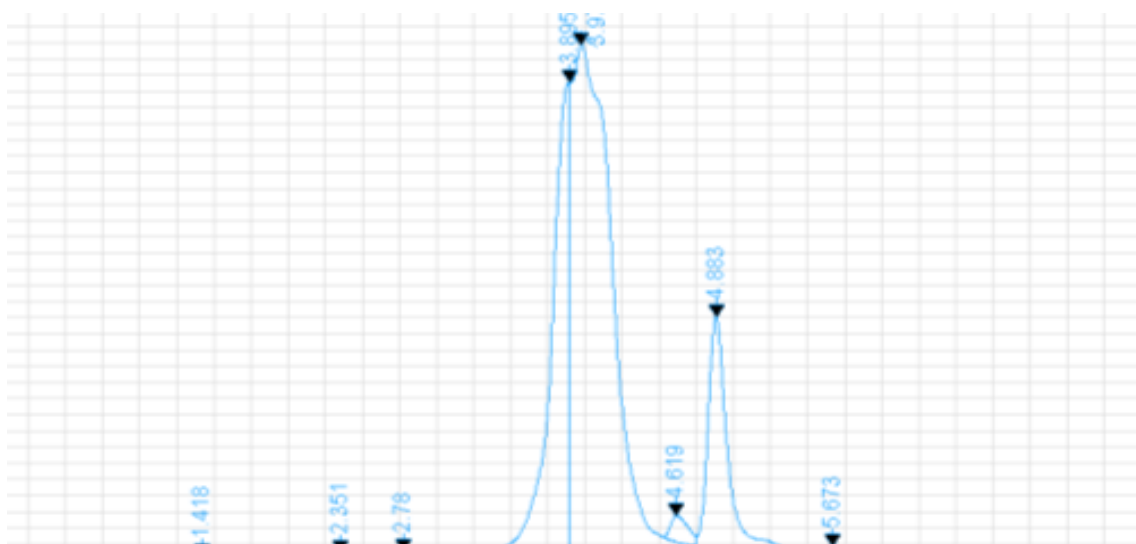


Рисунок 3 – Анализ смеси фруктовых кислот. НФ: ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 210 нм, скорость потока 1мл/мин.

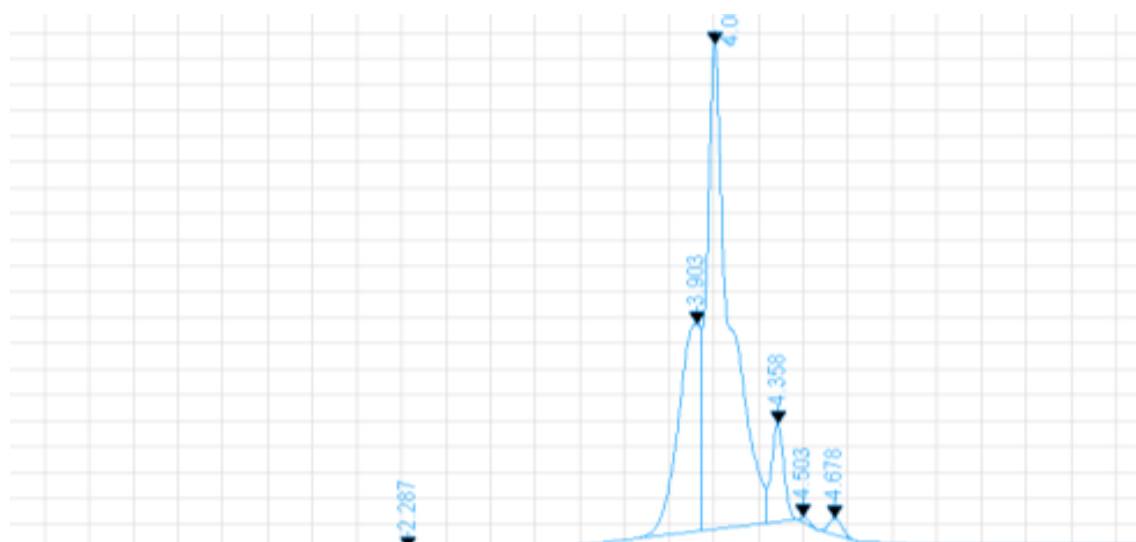


Рисунок 4 – Анализ смеси фруктовых кислот. НФ: ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 230 нм, скорость потока 1мл/мин.

Как видно из хроматограмм, спектральная картина на этих волнах поглощения различается, различие в спектральном соотношении может быть также использовано для дополнительной идентификации кислот, обладающих схожими временами удерживания, например винной и лимонной.

Исходя из полученных результатов, в аналогичных условиях были проколоты образцы кислот и вин, при длинах волн 210-290 нм, на колонках ZORBAX NH2 (4.6×150мм) и ZORBAX RX-SIL (4.6×150мм).

Таким образом, можно заключить, что обычный режим ОФ ВЭЖХ не дает разделения смеси кислот в изократическом режиме без использования градиента. Гидрофильный режим с использованием аминофазы также не дает удовлетворительных результатов, кроме того на аминофазе наблюдали обратные пики, что тоже затрудняет проведение идентификации.

Использование в гидрофильном режиме колонки с силикагелем и элюента ацетонитрил-вода 2:8, позволяет значительно улучшить разделение. Для кислот, обладающих близкими временами удерживания в качестве вспомогательного параметра для идентификации, можно рекомендовать спектральное отношение при разных длинах детектирования. Ниже приведен расчет коэффициентов, характеризующих данные спектральные соотношения:

$$D = \frac{h_{210}}{h_{230}} \text{ нм}$$

$$D_M = \frac{2845,44556}{2343,36646} = 1,21 \text{ - молочная}$$

$$D_V = \frac{3012,30298}{1978,05383} = 1,52 \text{ - винная}$$

$$D_{Щ} = \frac{3552,43408}{3884,54541} = 0,91 \text{ - щавелевая}$$

$$D_L = \frac{2999,73218}{2441,44019} = 1,23 \text{ - лимонная}$$

$$D_U = \frac{1325,23376}{161,94839} = 8,18 \text{ - уксусная}$$

$$D_{Я} = \frac{2594,30981}{726,90594} = 3,57 \text{ - янтарная}$$

Так, например, время удерживания винной кислоты 1,76 мин, а лимонной – 1,78, а спектральные соотношения этих двух кислот при длине волны 210и 230 нм, 1,52 и 1,23, соответственно, таким образом, включение этого параметра в идентификацию позволит снять затруднение при качественном анализе.

Что касается возможности разделения других компонентов вин, например, антоцианов. Данные соединения, придающие разнообразные оттенки синего и фиолетового, в том числе и красному вину, можно обнаружить и в соке ягод клюквы. Мы провели анализ сока, выжатого из свежих ягод клюквы в различных хроматографических системах, полученные результаты приведены на рисунках 5-12. Используемый диапазон волн 210 – 600 нм (210, 230, 254, 270, 480, 520, 580, 600).

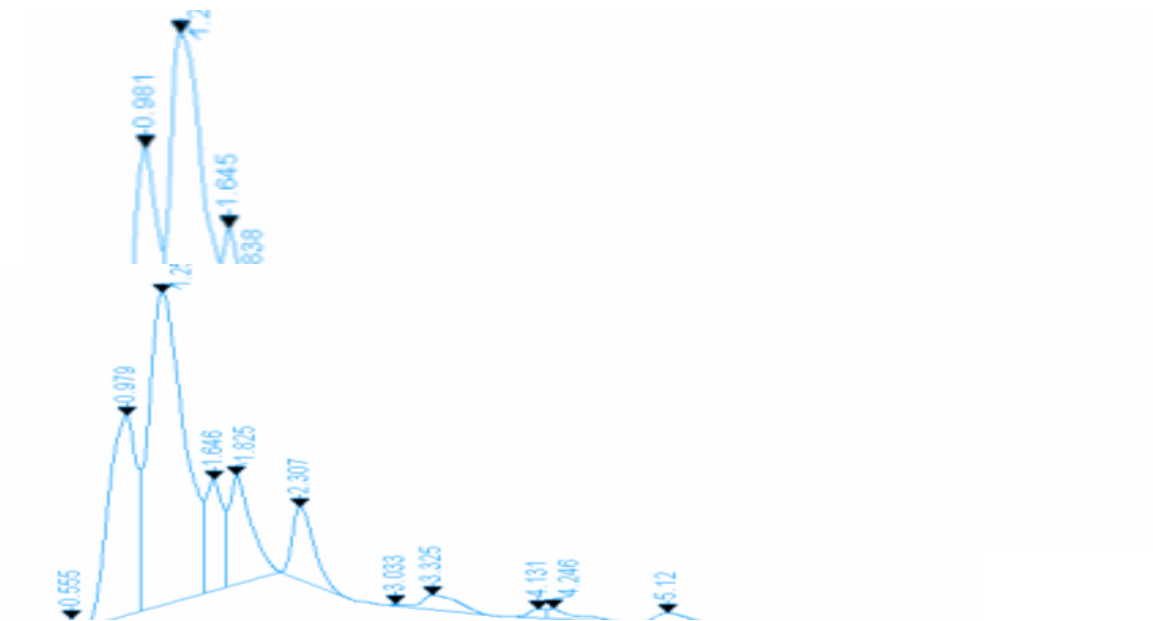


Рисунок 5 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 230 нм, скорость потока 1мл/мин.

Рисунок 6 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 254 нм, скорость потока 1мл/мин.

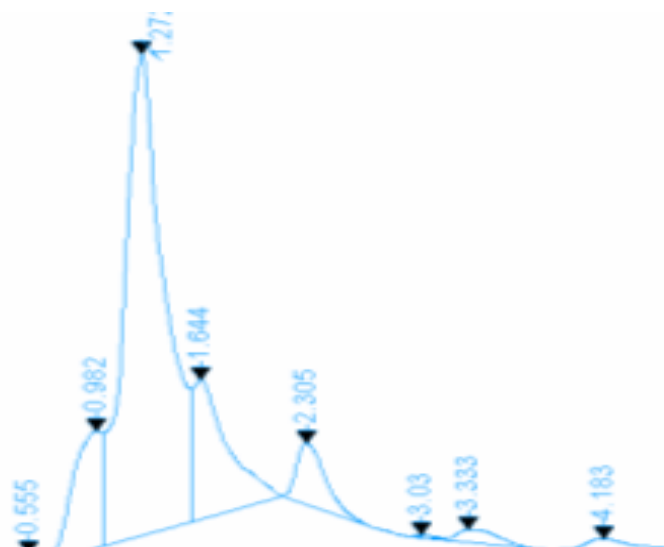


Рисунок 7 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 270 нм, скорость потока 1мл/мин.

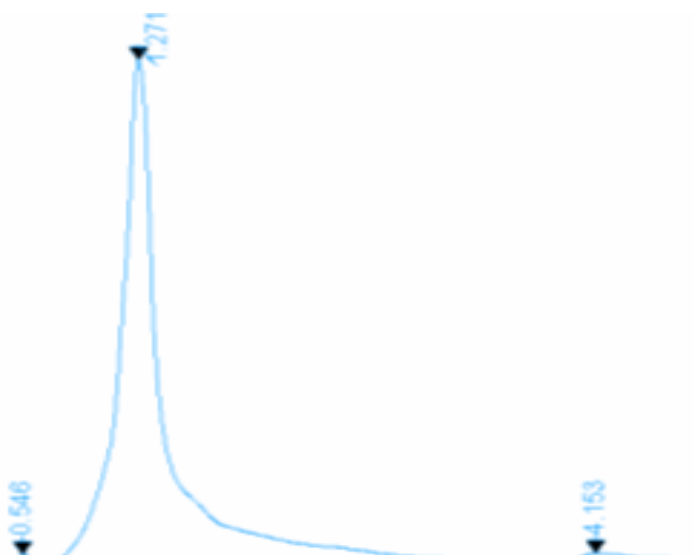


Рисунок 8 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 480 нм, скорость потока 1мл/мин.

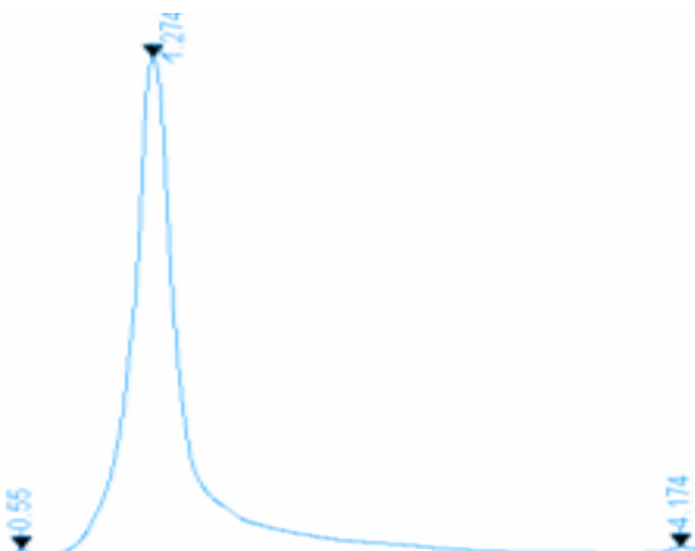


Рисунок 9 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 520 нм, скорость потока 1мл/мин.

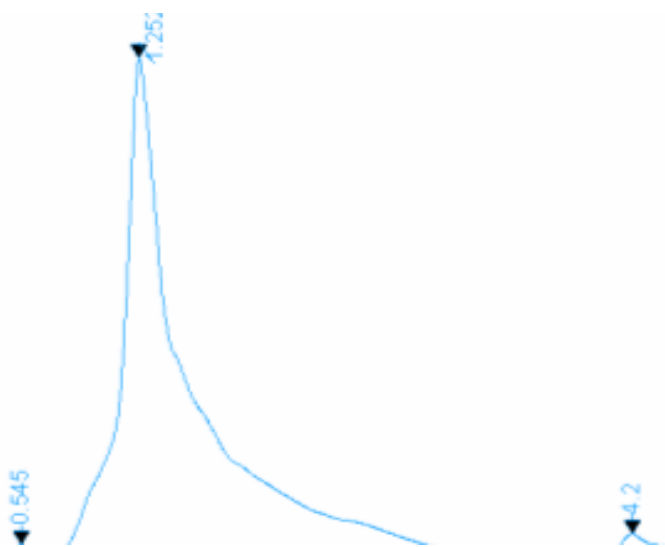


Рисунок 10 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 580 нм, скорость потока 1мл/мин.

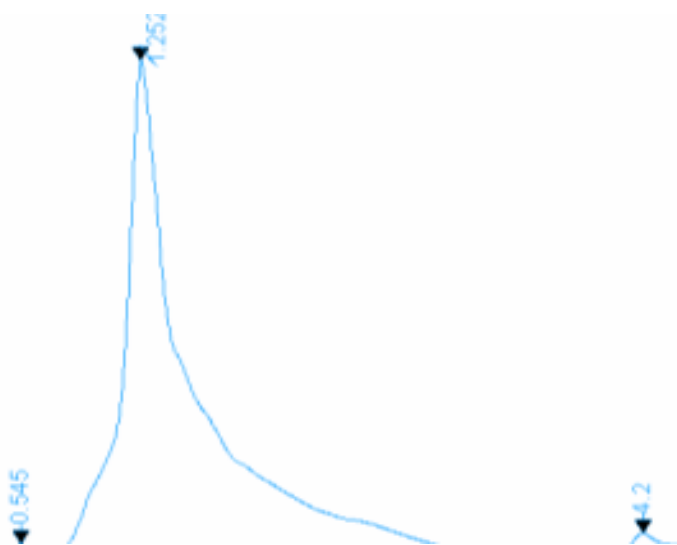


Рисунок 11 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 580 нм, скорость потока 1мл/мин.

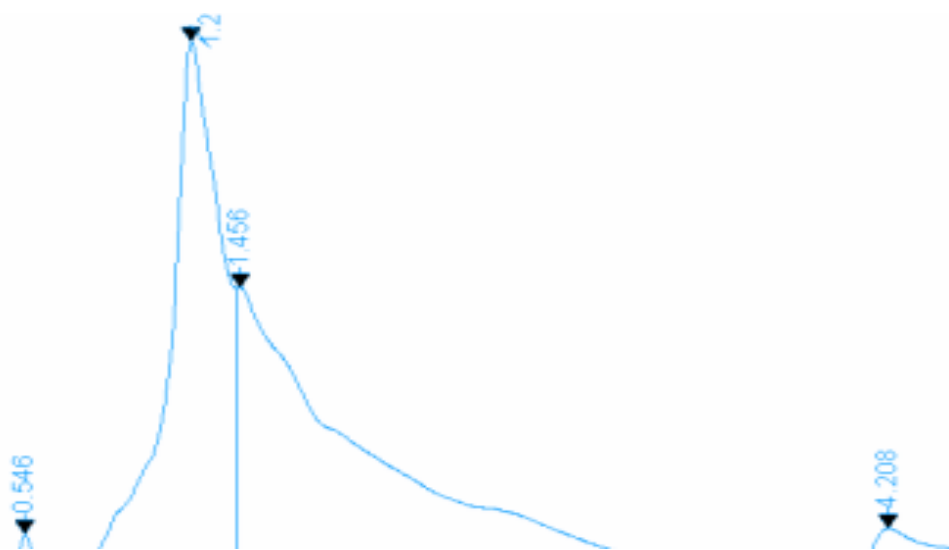


Рисунок 12 – Анализ Клюквы. НФ: ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм). ПФ: ацетонитрил-вода 2:8, спектрофотометрический детектор с длиной волны 600 нм, скорость потока 1мл/мин.

Вина: красные Кагор и «Torre Tallada», белое «Шардоне» прокололи на ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×100мм) при длинах волн 210 – 460 нм (210, 230, 254, 270, 290, 330, 370, 420, 460), элюент – ацетонитрил: вода 2:8.

Анализ хроматографического поведения экстракта клюквы показывает, что разделение антоцианов лучше происходит на фазе C18, в классическом ОФ режиме ВЭЖХ. И в образцах красного вина эти натуральные красители лучше выписываются в таких же условиях.

А значит, гидрофильную хроматографию в анализе вин можно рекомендовать, как альтернативу более дорогому и трудоемкому процессу градиентного элюирования, только для анализа и обнаружения фруктовых кислот.

Остальные компоненты вин лучше делятся в ОФ-режиме ВЭЖХ.

3.2 Количественное измерение

В работе также были построены градуировочные кривые для лимонной и винной кислот для их количественной оценки в составе вин, при исследовании последних на предмет фальсификации. Полученные зависимости приведены на рисунках 13 и 14.

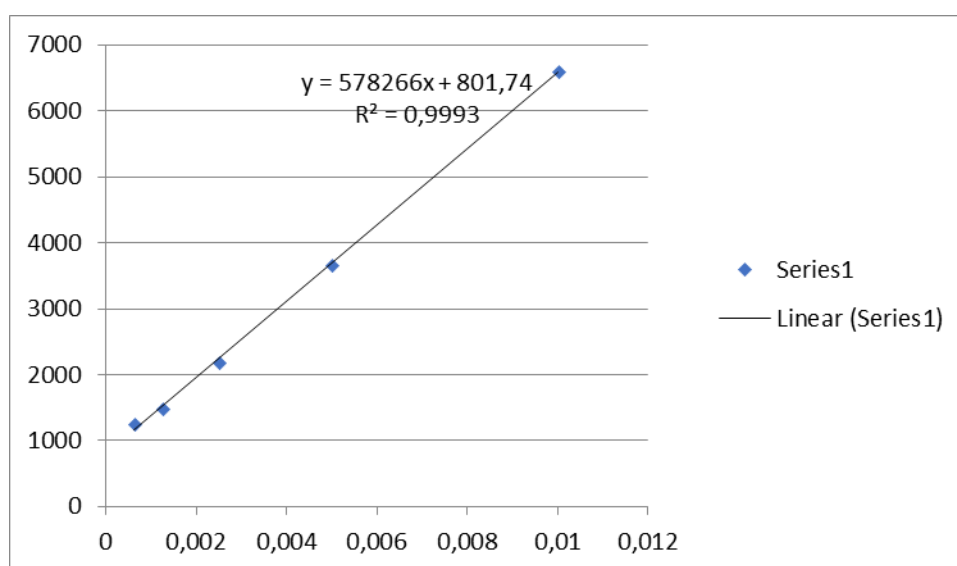


Рисунок 13 - Градуировочная кривая винной кислоты

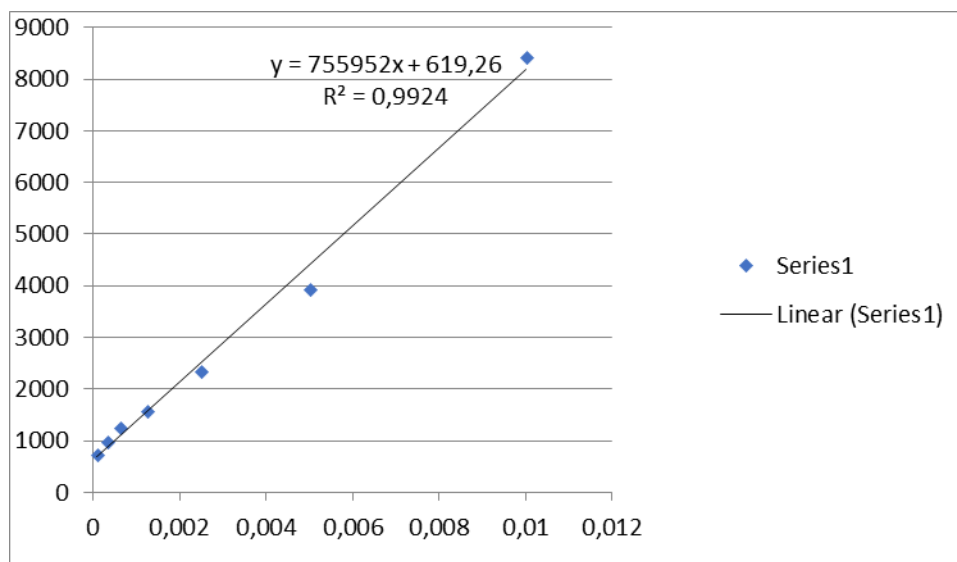


Рисунок 14 - Градуировочная кривая лимонной кислоты

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из анализа литературных данных показаны возможности ВЭЖХ в контроле фруктовых кислот, вин, в частности, возможности ее гидрофильного режима.

Исследованы особенности поведения фруктовых кислот в различных хроматографических системах. Показано, что наиболее оптимальным является гидрофильный режим с использованием колонки с силикагелем и водно-ацетонитрильного элюента.

Показана возможность применения спектральных соотношений для повышения достоверности идентификации фруктовых кислот.

Использование гидрофильной хроматографии может быть рекомендовано только для определения кислотного состава вин, остальные компоненты лучше обнаруживаются и разделяются в ОФ ВЭЖХ.

В работе получены градуировочные зависимости площади пиков от концентрации лимонной и винной кислот, которые могут использоваться для количественного анализа вин при выявлении факта их фальсификации.

Щелочной пробой и методом ТСХ подтверждена натуральность окраски исследованных в работе красных вин.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рудаков, О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. – Воронеж: ВГУ, 2003. – 299 с.
2. Сычев, С.Н. Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания в ВЭЖХ. – Орел: ОрелГТУ, 2000. – 212 с.
3. Хроматография. Основные понятия. Терминология. Сборник научно-нормативной терминологии / под ред. В.А. Даванкова. – М.: РАН, 1997. – Вып. 114. – 48 с.
4. Сычев С.Н., Гаврилина В.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография: аналитика, физическая химия, распознавание многокомпонентных систем: Учебное пособие. – СПб.: Издательство «Лань», 2013. – 256 с.: ил. – (Учебники для вузов. Специальная литература).
5. Bogusław Buszewski, Sylwia Noga // J. Anal. Bioanal Chem. 2012. Vol. 402. No.1. p. 231–247.
6. Hildebrand, J.H. Regular and related solutions / J.H. Hildebrand, J.M. Prausnitz, R.L. Scott. – New York: Van-Nosrand-reinhold, 1970. – P. 228.
7. Snyder, I.R. Principles of adsorption chromatography. – New York: Dekker, 1968. – P. 413.
8. И.Н. Дмитриевич, Г.Ф. Пругло, О.В. Фёдорова, А.А. Комиссаренков // Хроматографические методы анализа. Часть III. Санкт-Петербург, 2014. – 53 с.
9. Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. // Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. Производственное издание. Москва. 1986. с.213.
10. Оганесянц Л.А. О состоянии виноградарства и виноделия Российской Федерации // Виноделие и виноградарство. – 2013. – № 1. С. 4-6.

11. This P. Historical origins and genetic diversity of wine grapes / P. This, T. Lacombe, M. R. Thomas // Trends in Genetics. – 2006. – Vol. 22 – №29. – P. 511-519.
12. Valamoti S.M. Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? / S.M. Valamoti, M.Mangafa, Ch. Koukouli-Chrysanthak, D. Malamidou // Antiquity. – 2007. – №81. – P. 54-61.
13. Таран, Н.Г. Влияние сорта винограда и зоны его произрастания на качество виноматериалов для игристых вин / Н.Г. Таран, И.И. Пономарева // Научные труды ГНУ СКЗНИИСИВ, 2013. – № 4. – С. 241-245.
14. Магомедова, Е.С. Биохимические особенности винограда сорта Ркацители в зависимости от экологических – Махачкала, 2000. – 25 С.
15. Воробьева, Т.Н. Научно-практические аспекты обеспечения качества виноградной продукции в условиях техногенного / Т.Н. Воробьева, А.А. Ширшова, Ю.Ф. Якуба // Плодоводство и виноградарство Юга России. – Краснодар: СКЗНИИСИВ, 2014. – № 29 (5). – P. 138-148.
16. Гугучкина, Т.И. Управление формированием качества продуктов переработки винограда/ Т.И. Гугучкина, М.И. Панкин, Л.М. Лопатина. – Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. – С.307.
17. Гаина, В.С. Значение сортов Шардоне и Пино черный для виноделия Молдавии // Садовство, виноградарство и виноделие Молдавии, 1990. – № 5. – С. 29-30.
18. Ключникова, Г.Н. Влияние уровня урожайности. Качества винограда и генетического происхождения новых сортов на качество вина / Е.Н. Даурова, А.Б. Мужиченко // Magarach. Виноградарство и виноделие, 2001, № 4. – С. 6-9.
19. R. Jackson., Wine Science (4 th Edition) Principles and Applications. Academic Press, The latest textbook on winemaking. – New York, 2008. – P. 700.

20. Экспертиза напитков / В.М. Позняковский, В.А. Помозова, Т.Ф. Киселёва, Л.В. Пермякова 5-е изд., испр. И доп. – Новосибирск: Сиб.унив. изд-во, 2002. – 384 с.
21. Герасимов М.А. Технология вина. – 3-е изд. – Москва, 1964; Сборник технологических инструкций, правил и нормативных материалов по винодельческой промышленности / Под ред. Г.Г. Валуйко, А.В. Трофимченко. – 7-е изд. – Москва, 1998, Клиновский З.Н., Мержаниан А.А. Технология вина – Москва. – 53 с.
22. Шепелев, А.Ф., Печенежная И.А. Товароведение и экспертиза продовольственных товаров: Уч. Пособие – Москва: ИКЦ «Март»; 2004. – 992 с.
23. Елизарова, Л.Г. Алкогольные напитки / Л.Г. Елизарова, М.А. Николаева – М: Экономика, 1997. – 174 с.
24. Гамидуллаев, С.Н. Товароведение и экспертиза продовольственных товаров: Учебное пособие / С.Н. Гамидуллаев, Е.В. Иванова, С.Л. Николаева и др. – СПб: Альфа, 2000. – 432 с.
25. Агабальянц, Г.Г. Химико-технол. Контроль виноделия: Уч. Пособие – Москва.: Пищевая промышленность, 1968. – 612 с.
26. Герасимова В.А., Белокурова Е.С., Вытовтов А.А. Товароведение и экспертиза вкусовых товаров. – СПб.: Питер, 2005. – 416с.
27. Справочник по виноделию. Под редакцией В.М. Малтабар и Э.М. Шприцмана // Москва, Пищ. Промышленность, 1973. – 408с.
28. Справочник по товароведению продовольственных товаров / Т.Г. Родина, М.П. Николаева, Л.Г. Елисеева и др.; Под ред. Т.Г. Родиной – М: КолосС, 2003. – 608 с.
29. Глазунов Л.И., Царану И.Н. Технология вин и коньяков. – М: Агропромиздат, 1988 – 342 с.
30. Товароведение и экспертиза потребительских товаров: Учебник. – М.: ИНФРА – М, 2003. – 544 с.

31. Серажутдинова, Л.Д. Некоторые аспекты испытаний алкогольной продукции / Л.Д. Серажутдинова, А.В. Зверев, М.А. Малых // Методы оценки соответствия. – 2007. – № 9. – С. 17-18.
32. Оселедцева, И.В. Практическая реализация современного подхода к вопросам по установлению подлинности коньячной продукции / И.В. Оселедцева, Т.И. Гугучкина, Э.М. Соболев // Изв. вузов «Пищевая технология». – № 2-3. – 2010. – С. 104-108.
33. Савчук, С.А. Идентификация винодельческой продукции методом высокоэффективной хроматографии и спектрометрии / С.А. Савчук, В.Н. Власов // Виноград и вино России, 2000. – №5. – С. 5-13.
34. Гугучкина, Т.И. Решение проблем обеспечения безопасности винодельческой продукции путем установления ее аутентичности / Т.И. Гугучкина, Н.М. Агеева, И.В. Оселедцева [и др.] // Оптимизация технологико-экономических параметров, структуры агроценозов и регламентов возделывания плодовых культур винограда. Том 2. Тематич. сбор. мат-лов Межд. науч.-практич. конференции. – Краснодар: ГНУ СевероКавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства, Департамент сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности Краснодарского края, 2008. – С. 164-168.
35. Determination of Carbohydrates by HPLC-ECD with a Novel Stationary Phase Prepared from PolystyreneBased Resin and Tertiary Amines / T. Masuda et [al.] // J. Analytical Sciences. 2001. V.17. P. 895-898.
36. Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC / T. Ikegami et [al.] // Anal. Bioanal. Chem. 2008. V.15. P 125-135.
37. Davis M. W. A rapid modified method for compositional carbohydrate analysis of lignocellulosics by high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD) // J. of wood chemistry and technology. – 1998. – V. 18. – № 2 – P. 235-252.

38. Ergonul P.G., Nergiz C. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC // Czech J. Food Sci. 2010. V. 28. P. 202-205.
39. Kordi-Krape M. Determination of Organic Acids in White Wines by RP-HPLC // Food technol. biotechnol. – 2001. V.39. – № 2. – P. 93-99.
40. Zeppa G., Conterno L., Gerbi V. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 272-276.
41. HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions / V. Nour et [al.] // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 2010. V. 38, № 1. P. 44-48.
42. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище Р 4.1.1672-2003. М.: Минздрав России, 2004. P. 183 с.
43. Nour V. HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions / V. Nour, E.M. Trandafi, I. Ionica // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. – 2010. – V. 38. – № 1. – P. 44-48.
44. Гугучкина, Т. И. Влияние охратоксинаА на органические кислоты вина / Т. И. Гугучкина, Н. М. Агеева, Е. Н. Гонтарева // Виноделие и виноградарство. – 2004. – № 6. – С. 22.
45. Метод оценки гигиеничности винограда и вина по концентрации органических кислот / Т. И. Гугучкина, Н. М. Агеева, Е. Н. Гонтарева, Г. Ф. Музыченко // Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии. – Краснодар, 2005. – Т. 2: Виноделие. – С. 220–225.
46. Bjeldans, L. F. Mutagenic activity of quercetin and related compounds / L. F. Bjeldans, G. W. Chong // Science. 1977. – V. 197. – P. 577-578.

47. Suolinna, E. M. The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells / E. M. Suolinna., R. N. Buchsbaum, E. Racker // *Cancer Research.* – 1975. – V. 35. – P. 1865-187.

