

УДК 543.544:543.544

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

© 2016 г. Л. Н. Боршевская¹, Т. Л. Гордеева, А. Н. Калинина, С. П. Синеокий

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

¹E-mail: larbor3@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.11.2015 г.
После доработки 11.02.2016 г.

Разработан эффективный и экономичный спектрофотометрический метод определения молочной кислоты в индивидуальном состоянии и в продуктах питания, биологических и культуральных жидкостях. Метод заключается в спектрофотометрическом определении окрашенного продукта реакции лактат-ионов с хлоридом железа(III) при 390 нм. Определены оптимальные условия реакции, построен градуировочный график в диапазоне от 0.3 до 10 г/л молочной кислоты с коэффициентом корреляции 0.9999. Метод не требует сложной пробоподготовки.

Ключевые слова: спектрофотометрия, молочная кислота, хлорид железа(III).

DOI: 10.7868/S004445021608003X

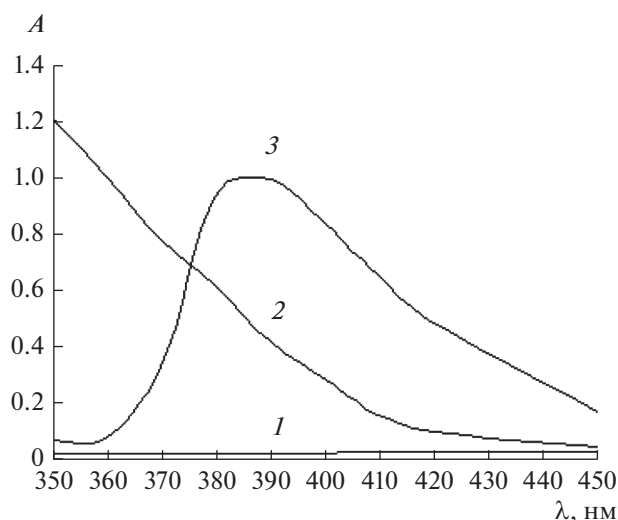
Молочную кислоту ($\text{CH}_3\text{CHONCOOH}$) широко применяют в пищевой, косметической, фармацевтической, кожевенной, химической и других отраслях промышленности, поэтому разработка экономичных методов определения молочной кислоты имеет большое значение. Мировое потребление молочной кислоты составляет несколько десятков тысяч тонн и ожидается его значительное увеличение [1].

Эффективные и недорогие методы определения молочной кислоты могут найти широкое применение прежде всего для контроля ферментации бактериальных штаммов молочнокислых бактерий, которые традиционно используют для получения молочной кислоты, а также для контроля качества продуктов питания, сельскохозяйственного сырья и др. В настоящее время наиболее точными методами определения молочной кислоты являются различные варианты ВЭЖХ, включая ионный [2], ион-парный [3], ионоэксклюзионный [4] и обращенно-фазовый [5]. Использование метода ВЭЖХ в рутинной практике ограничено тем, что для его осуществления требуется сложная пробоподготовка, а также наличие дорогостоящего оборудования и высококвалифицированных специалистов.

Для определения молочной кислоты также используют метод, основанный на окислении ее до ацетальдегида и определении последнего либо бисульфитным методом [6], либо окрашиванием *n*-гидроксифенилом в присутствии ионов металлов [7]. Недостатком данной группы методов

является то, что перед определением молочной кислоты необходимо удаление примесей белков и углеводов с использованием 12-вольфрамфосфорной кислоты, CuSO_4 и CaO . В качестве окислителей используют KMnO_4 , H_2SO_4 или Ce(IV) , работа с которыми требует особых мер предосторожности. Анализ занимает несколько часов, при этом результаты могут быть недостаточно точными из-за неполного удаления примесей из исследуемого образца.

Для определения молочной кислоты используют также ферментативный метод, основанный на преобразовании молочной кислоты в пируват под действием фермента лактатдегидрогеназы в присутствии НАД^+ , который в свою очередь восстанавливается до НАДН. Содержание молочной кислоты в пробе пропорционально количеству образовавшегося в ходе ферментативной реакции НАДН, которое определяют спектрофотометрически при 340 нм [8]. Для осуществления данного метода необходимо использование дорогостоящих очищенных препаратов L- и D-лактатдегидрогеназ с определенной ферментативной активностью. Кроме того, метод сложен в исполнении и требует большой аккуратности при проведении измерений из-за нестабильности НАД^+ и НАДН. Для определения молочной кислоты ферментативным методом имеются коммерческие наборы реактивов, однако их стоимость чрезвычайно высока – порядка 400 \$ за 100 тестов [9, 10].



Спектры поглощения молочной кислоты (10 г/л) относительно дистиллированной воды (1); хлорида железа(III) (2 г/л) относительно дистиллированной воды (2); лактата железа(III) относительно раствора хлорида железа(III) (3).

Таким образом, актуальна задача разработки эффективных и простых в исполнении способов определения молочной кислоты. Спектрофотометрические методы анализа высокоселективны и чувствительны. Их часто используют в лабораториях из-за простоты и доступности.

Цель настоящей работы – разработка простого, экономичного и экспрессного спектрофотометрического метода определения L- и D-изомеров молочной кислоты, пригодного, в частности в микробиологическом производстве для определения молочной кислоты в культуральной жидкости.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Спектрофотометр 10S UV-Vis (Genesys, США) ($l = 1$ см).

Материалы, реагенты, растворы. Использовали $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ч. (Химмед, Россия), молочную кислоту х. ч. (89% DL, VAG Chemie, Германия), ледяную CH_3COOH х. ч. (99.8%, Химмед, Россия), этанол х. ч. (Реахим, Россия), глицерин ч. (Химмед, Россия), бычий сывороточный альбумин (98–99% Sigma, США). Растворы готовили растворением соответствующих навесок и аликвот в деионированной воде.

Построение градуировочного графика. Навеску 1.2 г молочной кислоты с известной концентрацией (89%, $\rho = 1.2$ г/мл) помещали в мерную колбу емк. 10 мл и разбавляли водой. Получали стандартный раствор с концентрацией молочной кислоты 89 г/л. Из этого стандартного раствора

готовили серию растворов молочной кислоты методом двукратных разбавлений.

Готовили 0.2%-ный раствор хлорида железа(III). Навеску 0.3 г хлорида железа(III) помещали в мерную колбу емк. 100 мл, разбавляли водой до метки и перемешивали до полного растворения соли. Раствор должен иметь комнатную температуру $25 \pm 5^\circ\text{C}$. К 2 мл 0.2%-ного раствора хлорида железа(III) добавляли 50 мкл раствора молочной кислоты соответствующей концентрации и перемешивали. Оптическую плотность полученных окрашенных растворов измеряли при 390 нм. Раствор контрольного опыта содержал 2 мл 0.2%-ного раствора хлорида железа(III). Светопоглощение окрашенных растворов в зависимости от концентрации молочной кислоты, взятой для реакции, использовали для расчета параметров уравнения прямой, соответствующей прямолинейному участку градуировочного графика. Обработку результатов и построение градуировочного графика выполняли с использованием статистической программы Statistica 6.0.

Методика спектрофотометрического определения молочной кислоты. К 2 мл 0.2%-ного раствора хлорида железа(III) добавляли 50 мкл исследуемого раствора, содержащего молочную кислоту, перемешивают и измеряют оптическую плотность при 390 нм относительно раствора контрольного опыта (2 мл 0.2%-ного раствора FeCl_3). Реакцию и измерения проводят при $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Окрашенный раствор сохраняет устойчивость в течение 15 мин.

Определение молочной кислоты в культуральной жидкости. Культуральную жидкость отделяют от клеток центрифугированием. Супернатант разбавляют в 20 раз деионированной водой. Молочную кислоту в образце определяют по методике спектрофотометрического определения молочной кислоты. Концентрацию молочной кислоты вычисляют по градуировочному графику с учетом 20-кратного разбавления исследуемого образца.

Определение молочной кислоты в составе кисломолочного продукта. Сыворотку отделяют от осадка центрифугированием и разбавляют в 10 раз деионированной водой. Молочную кислоту в образце определяют по методике спектрофотометрического определения молочной кислоты. Концентрацию молочной кислоты вычисляют по градуировочному графику с учетом 10-кратного разбавления исследуемого образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр поглощения. Взаимодействие хлорида железа(III) и молочной кислоты в водном растворе приводит к образованию лактата железа(III), окрашивающего раствор в желто-зеленый цвет. Получены спектры поглощения компонентов ре-

Таблица 1. Влияние примесей на определение молочной кислоты (5 г/л)

Примесь	Концентрация примеси, г/л	Измеренная концентрация D/L-молочной кислоты, г/л	Погрешность, % ($n = 3$)
Уксусная кислота	100	4.94	1.3
Этанол	96	4.90	2.0
Глицерин	100	4.99	0.2
Бычий сывороточный альбумин	100	5.07	1.4

акционной смеси: раствора хлорида железа(III) и раствора молочной кислоты, а также продукта их взаимодействия — лактата железа(III) (рисунок). Как видно, максимум поглощения лактата железа(III) наблюдается при 390 нм. Светопоглощение молочной кислоты в заданном диапазоне близко к нулю, а раствора хлорида железа(III) — существенно ниже, чем для продукта реакции — лактата железа(III). В результате исследований выбрали аналитическую длину волны 390 нм.

Влияние концентрации хлорида железа(III). Изучали влияние концентрации хлорида железа(III) на светопоглощение продукта реакции при 390 нм. Раствор хлорида железа(III) в интервале концентраций от 0.05 до 0.3% добавляли к раствору молочной кислоты с фиксированной концентрацией 10 г/л. Измерения проводили относительно растворов хлорида железа(III) с соответствующими концентрациями. Светопоглощение раствора увеличивалось с повышением концентрации хлорида железа(III), достигая оптимального значения при концентрации 0.2%. Дальнейшее увеличение концентрации реагента не увеличивает интенсивности окраски образующегося раствора лактата железа(III).

Влияние времени. Изучали интенсивность окраски продукта реакции — раствора лактата железа(III) в интервале от 1 до 30 мин при 390 нм. Для проведения реакции использовали 0.2%-ный раствор хлорида железа(III) и раствор молочной кислоты с концентрацией 10 г/л. Окраска лактата железа(III) стабильна в интервале от 1 до 15 мин, затем происходит небольшое снижение оптической плотности, что может быть связано с частичным разложением продукта реакции.

Влияние примесей на определение молочной кислоты. Исследовали влияние этанола, белков, глицерина, уксусной кислоты — побочных продуктов брожения, присутствующих в культуральных жидкостях при микробиологическом производстве молочной кислоты, а также в продуктах питания. Исследуемые примесью вещества в объеме 100 мкл добавляли в реакционную смесь, содержащую 2 мл 0.2%-ного раствора хлорида железа(III) и 50 мкл 0.5%-ного раствора молочной

кислоты, и измеряли оптическую плотность полученных растворов при 390 нм. Сравнивали результаты анализа полученных растворов и раствора, содержащего 2 мл 0.2%-ного раствора хлорида железа(III), 50 мкл 0.5%-ного раствора молочной кислоты и 100 мкл воды. Результаты представлены в табл. 1. Видно, что влияние исследуемых веществ незначительно и не превышает 2%. Таким образом, разработанный метод позволяет определять молочную кислоту в составе сложных смесей и не требует очистки целевого продукта на стадии пробоподготовки.

Градуировочный график. Оптическая плотность раствора лактата железа(III) (A) пропорциональна концентрации молочной кислоты (c) в интервале от 0.5 до 11 г/л. Уравнение градуировочного графика имеет вид: $A = 0.1414c - 0.0222$, коэффициент корреляции равен 0.9999, уровень достоверности 0.000001, величина достоверности аппроксимации 0.9998.

Аналитическое применение. Разработанный метод применен для определения молочной кислоты в водном растворе, в составе культуральной жидкости при микробиологическом производстве, а также в составе кисломолочного продукта, полученного заквашиванием молока молочнокислыми бактериями.

Для оценки точности разработанного метода сравнили результаты исследований, полученных предложенным спектрофотометрическим методом и с использованием ВЭЖХ (табл. 2). Статистическая обработка данных ($n = 3$) показала, что результаты спектрофотометрического метода попадают в доверительный интервал результатов измерений методом ВЭЖХ. Различия результатов не превышает 3%. Предложенный метод дает достаточно точные результаты определения количества молочной кислоты как в индивидуальном состоянии, так и в составе сложных смесей типа культуральной жидкости или продуктов питания.

Таким образом, представленный спектрофотометрический метод прост, чувствителен, экономичен и занимает немного времени, не требует сложной пробоподготовки, дает достаточно точные результаты. Кроме того, предложенный ме-

Таблица 2. Сравнение результатов (г/л) определения молочной кислоты, полученных спектрофотометрическим методом и с помощью ВЭЖХ

Образец	Спектрофотометрический метод	ВЭЖХ	Погрешность, % (n = 3)
Водный раствор молочной кислоты	89.8 ± 1.6	88.9 ± 1.6	1.0
Культуральная жидкость	91.8 ± 1.9	93.6 ± 1.7	1.9
Кисломолочный продукт	10.8 ± 0.2	11.1 ± 0.2	2.7

тод позволяет тестировать как L-, так и D-изомеры молочной кислоты.

Метод можно использовать в рутинной практике генетических и микробиологических лабораторий при создании или тестировании штаммов-продуцентов молочной кислоты, отработке методов культивирования и т.д. Также предложенный метод необходим для контроля производства молочной кислоты на заводах, занимающихся микробиологическим производством молочной кислоты.

Следует отметить, что хотя оптимальной для измерения оптической плотности лактата железа(III) является длина волны 390 нм, существует возможность использования данного метода при 400–405 нм (рисунок), что немного снижает его чувствительность, но позволяет избежать использования дорогостоящего спектрофотометрического оборудования.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57914X0013) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышлен-

ных микроорганизмов” (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI59214X0002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://abercade.ru/research/analysis/7626.html> (05.11.2015)
2. *Miura Y., Ohno H., Koh T.* // *Bunseki Kagaku*. 1994. V. 43. № 10. P. 745.
3. *Lebuhn M., Hartmann A.* // *J. Chromatogr.* 1993. V. 629. P. 255.
4. *Lesh M.J., Wilkinson E.L., Zolfaghari M.R., Schreiber M.A.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1993. V. 16. № 11. P. 2415.
5. *Ohara H., Hiraga T., Katasho I., Inuta T., Yoshida T.* // *J. Ferm. Bioeng.* 1993. V. 75. P. 470.
6. *Friedemann T.E., Catonlo M., Shatter P.A.* // *J. Biol. Chem.* 1927. V. 73. P. 335.
7. *Barker S.B., William H.* // *J. Biol. Chem.* 1941. V. 138. P. 535.
8. *Paradis D., Nadeau D.* // *J. Tissue Cult. Meth.* 1982. V. 7. № 4. P. 175.
9. <http://www.biovision.com/lactate-colorimetric-fluorometric-assay-kit-2903.html> (05.11.2015)
10. <http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=13815> (05.11.2015)