

## Stanovenie kyseliny vínnej vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a kolorimetrickou metódou

MIROSLAV ŠPAŇÁR — MÁRIA CUPÁKOVÁ — JÚLIUS PERENYI

Súhrn. Vypracovalo sa stanovenie kyseliny vínnej v kvasničných vínnych kaloch metódou HPLC. Stanovenie sa robilo použitím reverznej fázy na kolóne LiChrosorb 10 RP-18 s mobilnou fázou izopropylalkohol—voda (30 : 70). Absorbancia sa merala pri 254 nm. Na porovnanie sa použila kolorimetrická metóda. Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že z hľadiska prístrojovej dostupnosti je pre prevádzkové využitie vhodná kolorimetrická metóda stanovenia kyseliny vínnej v kvasničných vínnych kaloch. Miera presnosti  $M'$  je 1,17 %. HPLC sa lepšie uplatňuje pri stanovení celkového obsahu kyseliny vínnej v rôznorodom materiáli.

Kyselina vínna je jednou z dôležitých zložiek nielen vína, ale aj odpadových surovín, ktoré zostávajú po spracovaní. Mnohé z týchto odpadových surovín obsahujú značné množstvá kyseliny vínnej vo forme vínanu draselného. Kyselina vínna a vínany sa môžu získavať z hroznových výliskov i kvasničných vínnych kalov, ktoré obsahujú okrem kvasiniek a vínanu aj drobné kúsky zrníek, strapín a pod. Tie sa odstraňujú zachytávaním na sitách alebo centrifugovaním pred destiláciou, čím sa získajú jemné kaly. Spôsob získavania soli kyseliny vínnej z kvasničných vínnych kalov pri výrobe vína opísali viacerí autori [1, 2]. Podľa Litvinenka sa z kvasničných vínnych kalov oddestiluje alkohol, výpalky sa filtrujú a kyselina vínna sa získava vo forme vápenatej soli.

Na stanovenie kyseliny vínnej vo víne sú známe niektoré metódy, ktoré možno použiť aj na jej stanovenie v kvasničných vínnych kaloch a výpalkoch, kde je kyselina vínna prítomná v značných koncentráciách.

Výťažnosť kyseliny vínnej i jej obsah možno sledovať rozličnými analytickými metódami. Pri tomto štúdiu možno použiť alkalimetrické titračné metódy. Základom týchto metód je prevedenie kyseliny vínnej na vínan vápenatý alebo hydrogenvínan draselný. Vážkové a odmerné metódy sú pomerne

---

Miroslav Špaňár, RNDr. Mária Cupáková, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Ing. Július Perenyi, Štátna inšpekcia akosti výrobkov potravinárskeho priemyslu, Podjavorinskej 4, 815 49 Bratislava.

práce, zdĺhavé, preto sa v analytickej praxi častejšie používajú rýchle a presné fyzikálnochemické metódy. Používajú sa najmä kalorimetrické, refraktometrické a chromatografické metódy, z nich predovšetkým plynová a vysokotlaková kvapalinová chromatografia.

Heatherbell [3] separoval organické kyseliny z cukru v etanolicom extrakte po prevedení na ich olovnaté soli. Kyseliny sa stanovili vo forme trimetylsilyl derivátov plynovou chromatografiou na kolónach so stacionárnymi fázami SE-52 a XE-60. Baker [4] opisuje izoláciu organických kyselín na ionexoch a ich následné stanovenie plynovou chromatografiou.

Aj keď plynovou chromatografiou môžeme dosiahnuť dobré výsledky pri stanovení organických kyselín, nevýhodou tejto metódy je pomerne zdĺhavá príprava vzorky na stanovenie, čo môže mať za následok značné chyby metódy.

Použitie kvapalinovej chromatografie sa ukazuje veľmi výhodné a nachádza čoraz väčšie uplatnenie. Stahl a spol. [5] separovali organické kyseliny na mikrokryštalickej celulóze po odstránení ionogénnych látok zo vzorky chromatografiou na katexe. Palmer [6] stanovil organické kyseliny na kolóne Aminex A-25. Grushka [7] použil na stanovenie reverznú fázu. Metódu, ktorá si vyžaduje minimálnu prípravu vzorky na analýzu, vypracoval Turkelson [8] používajúc na stanovenie ionexovú kolónu.

V tomto článku sa opisuje metóda stanovenia kyseliny vínnej v kvasničných vínnych kaloch vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou na kolóne LiChrosorb 10 RP-18 s mobilnou fázou izopropylalkohol — voda (30 : 70). Na vlastné stanovenie sa použil vodný výluh z kvasničných vínnych kalov a výluh okyslený HCl. Retenčný čas kyseliny vínnej bol 156 s. Na porovnanie sa použila kolorimetrická metóda.

## Experimentálna časť

### Materiál a metódy

Na analýzu sa použili kvasničné vínne kaly, z ktorých sa pripravil výluh povarením vzorky s vodou (1 : 10) 15 min, druhý výluh sa pripravil tak isto ale po okyslení kalov kyselinou chlorovodíkovou.

**Kolorimetria.** Pri kolorimetrickom stanovení sa vzorky vyčírili 27 % roztokom octanu sodného v kyseline octovej za prídavku aktívneho uhlia. Prídaním 2 % vanadičnanu amónneho vzniklo v octane sodnom oranžovo-červené zafarbenie, ktoré sa meralo na Spekole 10 (Carl Zeiss, Jena) pri vlnovej dĺžke 560 nm. Koncentrácia kyseliny vínnej sa stanovila metódou analytickej kalibračnej krivky.

*Vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC).* Stanovenie kyseliny vínnej sa urobilo na chromatografe SP 8 100 Spectra-Physics s použitím UV detektora. Základné podmienky stanovenia: kolóna — LiChrosorb 10 RP-18, mobilná fáza — izopropylalkohol—voda (30 : 70), detekcia 254 nm, prietok mobilnej fázy 0,7 ml . min<sup>-1</sup>, tlak 7,3 MPa.

*Pracovný postup:* 10 µl vzorky sa po príslušnom zriedení redestilovanou vodou (1 : 50) nastreklo na chromatografickú kolónu kvapalinového chromatografu. Retenčný čas kyseliny vínnej bol 156 s.

### Výsledky a diskusia

Kyselinu vínnu v kvasničných vínnych kaloch sme stanovili vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a kolorimetrickou metódou. Tieto dve metódy sme porovnali rozdielnou prípravou vzoriek na analýzu. Výsledky uvádzame v tabuľkách 1—3. Výhodou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie je predovšetkým minimálna príprava vzorky na analýzu. Vzorka vodného výluhu sa priamo po zriedení nastrekuje na kolónu kvapalinového chromatografu. Retenčný čas kyseliny vínnej bol 156 s. Z hľadiska reprodukovateľnosti sa ukazuje výhodnejšia kolorimetrická metóda. Miera presnosti  $M'$  s 95 % hladinou významnosti bola pri HPLC vodného výluhu 8,65 % a vodného výluhu okysleného HCl 6,22 %. Pri kolorimetrickej metóde je  $M'$  1,17 %.

Príprava vzoriek bola daná metódou samou. V prípade, že vodný výluh vzorky z kvasničných vínnych kalov bol okyslený kyselinou chlorovodíkovou, ako si to vyžadovala metóda, zistili sme vyšší obsah kyseliny vínnej. Rozpustnosť a vytesňovanie kyseliny vínnej z jej solí v kvasničných vínnych kaloch závisí od viacerých faktorov, ku ktorým patrí pH, teplota, prítomnosť koloidov a pod. Tento postup stanovenia, resp. prípravy vzorky môžeme voliť vtedy, ak nám to v praxi dovoľuje technologický postup a ak nám ide iba o extrakciu kyseliny vínnej. Pri kolorimetrickom stanovení kyseliny vínnej touto metódou sa kyselina vínná vytesňuje roztokom octanu sodného v kyseline octovej. Táto metóda je rýchla a vyhovuje požiadavkám praxe. Kolorimetrická metóda nie je však taká citlivá ako HPLC.

Záverom možno konštatovať, že na rýchle stanovenie kyseliny vínnej v prevádzke i vzhľadom na možnosti prístrojového vybavenia je vhodná kolorimetrická metóda. Na stanovenie celkového obsahu kyseliny vínnej v takom rôznorodom materiáli sa však lepšie osvedčila HPLC.

Tabuľka 1. Stanovenie kyseliny vínnej vo vodnom výluhu neokyslených kvasničných  
vínnych kalov metódou HPLC

Table 1. Determination of tartaric acid in water extract of unacidulated fermenting  
wine lees by means of the HPLC method

Meranie <sup>(1)</sup>	Plocha píku <sup>(2)</sup> [mm <sup>2</sup> ]	Kyselina vínna <sup>(3)</sup> [g · l <sup>-1</sup> ]	RF
1	51 622	33,15	771,106
2	52 305	33,54	779,671
3	48 593	31,16	724,706
4	52 180	33,46	778,198
5	46 940	30,10	700,052
Vodný výluh <sup>(4)</sup>			
$\bar{x}$	$s$	$v$	$M'$
32,28	1,3964	0,0432	8,65 %

RF — odozvoový faktor,<sup>(5)</sup>  $\bar{x}$  — priemerná hodnota kyseliny vínnej v g · l<sup>-1</sup>,<sup>(6)</sup> —  $s$  — smerodajná odchýlka,<sup>(7)</sup>  $v$  — variačný koeficient,<sup>(8)</sup>  $M'$  — miera presnosti s 95 % hladinou významnosti.<sup>(9)</sup>

(<sup>1</sup>)Measuring, (<sup>2</sup>)Peak area, (<sup>3</sup>)Tartaric acid, (<sup>4</sup>)Water extract, (<sup>5</sup>)RF — response factor, (<sup>6</sup>) $\bar{x}$  — average value of tartaric acid, (<sup>7</sup>) $s$  — standard deviation, (<sup>8</sup>) $v$  — variation coefficient, (<sup>9</sup>) $M'$  — accuracy degree with 95 % prominence.

Tabuľka 2. Stanovenie kyseliny vínnej vo vodnom výluhu vínnych kalov okyslených  
HCl metódou HPLC

Table 2. Determination of tartaric acid in water extract of wine lees acidulated with  
HCL by means of the HPLC method

Meranie <sup>(1)</sup>	Plocha píku <sup>(2)</sup> [mm <sup>2</sup> ]	Kyselina vínna <sup>(3)</sup> [g · l <sup>-1</sup> ]	RF
1	90 328	46,22	977,121
2	83 072	43,80	948,267
3	82 228	43,52	944,704
4	91 408	46,58	981,162
5	91 915	46,75	983,038
Výluh s HCl <sup>(4)</sup>			
$\bar{x}$	$s$	$v$	$M'$
45,37	1,4106	0,0311	6,22 %

(<sup>1</sup>)Measuring, (<sup>2</sup>)Peak area, (<sup>3</sup>)Tartaric acid, (<sup>4</sup>)Extract with HCl. For other explanation see Table 1.

Tabuľka 3. Stanovenie kyseliny vínnej vo vodnom výluhu kolorimetrickou metódou  
Table 3. Determination of tartaric acid in water extract by means of the colourimetric method

Meranie <sup>(1)</sup>	Kyselina vínna <sup>(2)</sup> [g · l <sup>-1</sup> ]
1	31,2
2	31,6
3	31,8
4	31,2
5	31,2

$$\bar{x} = 31,4, s = 0,1843, v = 0,0058, M' = 1,17 \%$$

<sup>(1)</sup>Measuring, <sup>(2)</sup>Tartaric acid.

### Literatúra

1. HRONČEK, J. et al.: Výskum uplatnenia desolvatačno-extrakčnej technológie. Priebežná správa. Bratislava, Výskumný ústav potravinársky 1981.
2. LITVINENKO, V. N.: Pat. ZSSR, 223585, 1968.
3. HEATHERBELL, D. A.: J. Sci. Food Agr., 25, 1974, s. 1095.
4. BAKER, D. W.: J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 56, 1973, s. 1257.
5. STAHL, E.—LAUB, E.—WOLLER, R.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 156, 1974, s. 321.
6. PALMER, J. K.—LIST, D. M.: J. Agr. Food Chem., 21, 1973, s. 903.
7. GRUSHKA, E.—DURST, H. D.—KIKTA, E. J.: J. Chromatogr., 112, 1975, s. 673.
8. TURKELSON, V. T.—RICHARDS, M.: Anal. Chem., 50, 1978, s. 1420.

### Определение винной кислоты методом жидкостной хроматографии под давлением и калориметрическим методом

#### Резюме

Было разработано определение винной кислоты в дрожжевых винных осадках методом жидкостной хроматографии под давлением. Определение производилось при помощи резервной фазы на колонке LiChrosorb 10 RP—18 с подвижной фазой изопропилалкогольвода (30 : 70). Абсорбция измерялась при 254 нм. В качестве сравнительного был использован калориметрический метод. На основании полученных результатов можно констатировать, что с точки зрения доступности аппаратуры для производственного использования достаточен калориметрический метод определения винной кислоты в дрожжевых винных осадках. Степень точности  $M'$  составляет 1,17 %. Метод жидкостной хроматографии под давлением находит лучшее применение при определении общего содержания винной кислоты в разнородном материале.

## Determination of tartaric acid by means of high-pressure liquid chromatography and by the colorimetric method

### Summary

In this work a method of determining tartaric acid in fermenting wine lees by means of HPLC was worked out. This determination was accomplished by means of a reversing phase on the LiChrosorb 10 RP-18 column with the mobile phase of isopropylalcohol-water (30 : 70). Absorption capacity was measured at 254 nm. The colorimetric method was used for the sake of comparison. On the basis of the results obtained by authors it was stated, that from the standpoint of instrumental procurability, the colorimetric method of tartaric acid determination in fermenting wine lees was sufficient enough to be used in practice. The accuracy degree  $M'$  was 1,17 %. The HPLC method is more suitable for the determination of total contents of tartaric acid in heterogeneous materials.