

УДК 637.1

М.В. Грицаева, А.В. Серов, О.А. Слепышева, А.Г. Храмов

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОБИОНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В настоящее время лактоза и ее производные широко применяются в пищевой промышленности, медицине, при разработке элитной косметики. Особый интерес, благодаря своим уникальным свойствам, вызывает лактобионовая кислота, являющаяся продуктом окисления лактозы. Следовательно, разработка быстрого и надежного способа оценки качества как окислительных, так и получаемых в ходе ее синтеза продуктов весьма актуальна. Одним из перспективных направлений современного анализа углеводов является хроматография, однако метод ВЭЖХ для лактобионовой кислоты оказался трудоемким, а данных по ГЖХ не обнаружено. Показана возможность использования метода ГЖХ для анализа качества лактобионовой кислоты, описана методика и подобраны оптимальные условия хроматографирования. Установлено, что наилучшее разрешение пиков достигается в режиме программирования температуры от 175 до 260°C при скорости 6 град/мин и чувствительности пламенно-ионизационного детектора  $2 \cdot 10^{-9}$  А. Определено время удерживания лактобионовой кислоты и показано, что на него не влияет присутствие лактозы.

Лактоза, лактобионовая кислота, газо-жидкостная хроматография.

### Введение

Проблема получения и использования лактозы (молочного сахара) и ее производных изучается на протяжении более века. В настоящее время учеными получено значительное количество разнообразных производных лактозы, системный перечень которых составляет более 50 наименований [7].

Благодаря своим уникальным свойствам лактобионовая кислота применяется в медицине и при производстве элитной косметики за рубежом [1, 4]. Возможные направления применения лактобионовой ки-

слоты в пищевой промышленности исследуются и включают в себя сокращение времени сквашивания и созревания при изготовлении сыров и йогурта [14], поддержание стабильных гелевых структур, устранение горечи, улучшение аромата и вкусовых характеристик заквасок, а также защита от окисления частично гидрогенизированных растительных жиров [11]. Лактобионовая кислота (4-О-β-D-галактопиранозил-D-глюконовая кислота) является основным продуктом окисления лактозы и одним из наиболее перспективных ее производных (рис. 1).

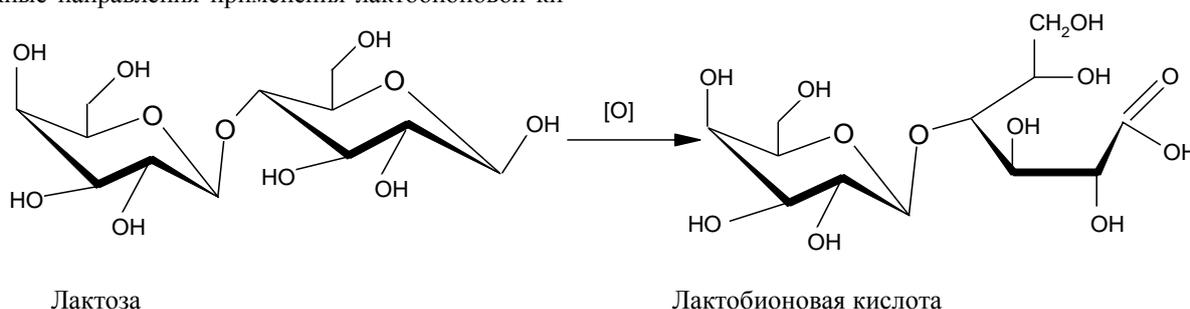


Рис. 1. Реакция окисления лактозы

Существуют различные способы получения лактобионовой кислоты путем окисления лактозы галогенами, электрохимическим способом, гетерогенным каталитическим и ферментативным окислением [10]. Содержание лактозы и ее производных в молочных продуктах можно определить йодометрически, методами Бертрана и феррицианидным или физико-химическими. Основной недостаток данных методов определения – это большая трудоемкость и длительность проведения испытаний. Международный опыт определения углеводов и их производных в молочных и в молочносодержащих продуктах основан на использовании метода хроматографии. Применение современных методов хроматографии позволяет количественно и качественно выделять сахара и их

производные с высоким разрешением и разделением в течение одного анализа [2, 5].

В настоящее время при анализе углеводов наибольшее распространение получила высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [12]. Согласно данным научной литературы [9, 13], в аппаратурно-процессовом отношении ВЭЖХ для лактобионовой кислоты – довольно трудоемкий процесс. Альтернативным методом является газо-жидкостная хроматография (ГЖХ). Известно, что метод газо-жидкостной хроматографии широко используется для разделения и идентификации различных углеводов, в том числе и лактозы [3]. Однако данных о применении метода ГЖХ для определения лактобионовой кислоты нами не найдено в литературе.

Для разделения углеводов методом газо-жидкостной хроматографии их переводят в различные производные, чаще всего в О-триметил-силиловые эфиры. Такие эфиры обладают высокой устойчивостью при температуре выше 200°C и высокой летучестью, а способ их получения прост и надежен. В работе [8] показана эффективность использования 25 м капиллярной колонки с неподвижной жидкой фазой OV-17 для разделения триметилсилиловых эфиров лактозы и ее производных в изотермическом режиме при температуре 230°C, дающая хорошее разрешение по компонентам.

Целью нашего исследования являлась разработка методики определения лактобионовой кислоты в присутствии лактозы методом ГЖХ, так как надежный контроль состава продуктов в ходе синтеза всегда актуален.

#### Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили лактобионовая кислота (Fluka, США) и лактоза (Rokiškiosūris, Литва). Работа выполнялась на газовом хроматографе «Цвет-100» с пламенно-ионизационным детектором. За основу методики идентификации лактобионовой кислоты был взят способ определения лактозы в молоке и молочных продуктах [3]. Вместо капиллярной колонки, работа с которой представляет определенную сложность, была использована насадочная стеклянная трехметровая колонка с внутренним диаметром 2 мм. В качестве насадки применяли сорбент Хроматон N-супер (0,125–0,160 мм), пропитанный 3%-м раствором OV-17. Предварительные эксперименты с лактозой в изотермическом режиме при температуре 260°C показали высокую эффективность работы такой колонки.

Учитывая, что конечный продукт, кроме лактобионовой кислоты, может содержать примесь лактозы, была приготовлена модельная система смеси компонентов по нижеприведенной методике. В колбе на 10 мл взвесили 2 мг лактобионовой кислоты и 2 мг лактозы. К анализируемым веществам добавили 0,2 мл N-(триметилсилил)имидазола, плотно закрыли колбу стеклянной пробкой и выдержали полученные растворы 30 минут при температуре 60–65°C. Во время нагревания смесь слегка встряхивали. Затем ее охладили до комнатной температуры, добавили 0,1 см<sup>3</sup> гексана, осторожно встряхивали до полного растворения и прилили 0,2 см<sup>3</sup> воды. После расслоения системы отбирали определенную дозу верхней фазы для газохроматографического анализа. Растворы необходимо проанализировать в течение первых двух часов с момента приготовления [6].

Для проведения анализа стеклянную хроматографическую колонку длиной 2,5 м с внутренним диаметром 2,5 мм заполнили готовой насад-

кой, присоединили ее к хроматографу и подавали газ-носитель азот (30–40 мл/мин), проводя термокондиционирование при следующих режимах: 2 часа при температуре 100°C, 2 часа при 150°C, 4 часа при 200°C и 8 часов при температуре 250°C. Расходы вспомогательных газов устанавливали на уровне 30 мл/мин для водорода и 300 мл/мин для воздуха. Дозирование растворов осуществлялось микрошприцем МШ-10, объем дозы 1–2 мкл. С целью идентификации пиков лактозы и лактобионовой кислоты на хроматограммах испытуемых образцов были приготовлены и проанализированы по той же методике отдельно взятые растворы лактозы и лактобионовой кислоты.

Для оптимизации процесса анализа и получения качественной картины разделения смеси лактозы и лактобионовой кислоты было принято решение программировать температуру. Температура нагрева термостата колонок программировалась в диапазоне от 160 до 260 °C при скорости 5–6 град/мин. Температура испарителя составляла 270 °C, а пламенно-ионизационного детектора – 260 °C. Чувствительность пламенно-ионизационного детектора (ПИД) варьировалась в пределах от  $2 \cdot 10^{-9}$  до  $5 \cdot 10^{-9}$  А. Скорость движения диаграммной ленты составляла 2400 мм/ч.

#### Результаты и их обсуждение

В связи с тем, что для хроматографирования лактобионовой кислоты и ее смеси с лактозой вместо капиллярной была использована насадочная трехметровая стеклянная колонка, возникла необходимость определить параметры настройки чувствительности пламенно-ионизационного детектора. Экспериментально было установлено, что интенсивность сигнала детектора при переходе от чувствительности  $5 \cdot 10^{-9}$  к  $2 \cdot 10^{-9}$  А существенно возрастает, что позволяет более надежно интерпретировать результаты анализа. Так как наилучшее разрешение пиков лактобионовой кислоты и лактозы достигается в режиме программирования температуры от 175 до 260°C со скоростью 6 град/мин и чувствительностью ПИД  $2 \cdot 10^{-9}$  А, поэтому все измерения в дальнейшем проводились при этих условиях.

Хроматографирование растворов лактозы и лактобионовой кислоты показало, что время удерживания их существенно отличается (рис. 2), следовательно, и на хроматограммах смеси можно ожидать хорошее разделение данных компонентов.

Экспериментальное исследование модельной смеси лактозы и лактобионовой кислоты при тех же условиях подтвердило, что пики всех компонентов: гексана (1), лактобионовой кислоты (2) и лактозы (3) – хорошо разделены (рис. 3). Кроме того, установлено, что переход от чистых веществ к их смеси не приводит к изменению времени удерживания компонентов.

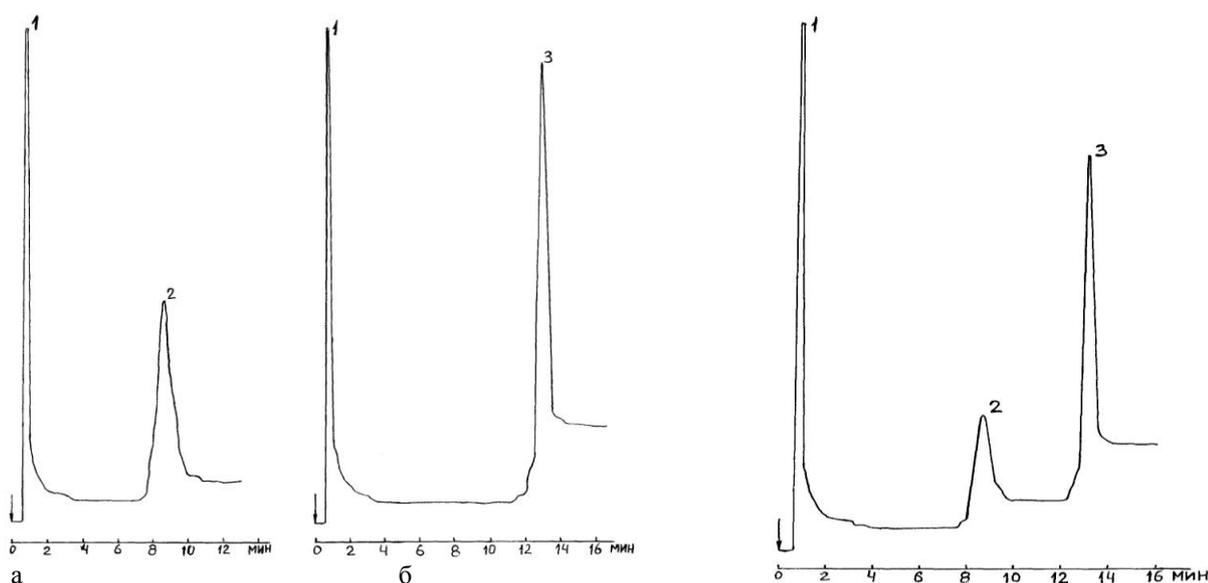


Рис. 2. Хроматограммы лактобионовой кислоты (а) и лактозы (б) при программировании температуры от 175 до 260°C со скоростью 6 град/мин и чувствительностью ПИД  $2 \cdot 10^{-9}$  А:1 – гексан; 2 – лактобионовая кислота; 3 – лактоза

Рис. 3. Хроматограмма смеси лактозы и лактобионовой кислоты при программировании температуры от 175 до 260°C со скоростью 6 град/мин и чувствительностью ПИД  $2 \cdot 10^{-9}$  А:1 – гексан; 2 – лактобионовая кислота; 3 – лактоза

При сопоставлении хроматограмм (рис. 2 и 3) видно, что переход от чистых веществ к их смеси не приводит к изменению времени удерживания компонентов. Хроматографирование смесей с различным соотношением лактобионовой кислоты и лактозы от 1:1 до 1:2 моль показало эффективность использования предложенной методики для идентификации лактобионовой кислоты, в том числе и в присутствии лактозы.

Таким образом, нами экспериментально установлено, что метод газо-жидкостной хроматографии может успешно применяться для идентификации

лактобионовой кислоты как в чистом виде, так и в ее смеси с лактозой. Были определены оптимальные условия программирования температуры и скорости нагревателя термостата колонок, время удерживания лактобионовой кислоты и доказано, что на него не влияет присутствие примеси лактозы.

Полученные результаты показали, что предложенная методика анализа с использованием газо-жидкостной хроматографии может быть использована для определения состава продуктов при получении лактобионовой кислоты путем окисления лактозы.

#### Список литературы

1. Грицаева, М.В. Лактобионовая кислота и перспективы ее использования / М.В. Грицаева, А.В. Серов, С.А. Рябцева, А.Г. Храпцов // Молочная промышленность. – 2008. – №12. – С. 51–52.
2. Денисович, Е.Ю. Применение международного опыта исследования при определении содержания массовой доли углеводов в молочных и молочносодержащих продуктах / Е.Ю. Денисович, О.С. Полякова, Е.А. Юрова [Электронный ресурс]. – URL: [http://www.vnimi.org/s\\_publ2004-080.html](http://www.vnimi.org/s_publ2004-080.html).
3. Кунижев, С.М. Унифицированные методы определения сахаров в пищевых продуктах с помощью газовой хроматографии / С.М. Кунижев, И.П. Чепурной, О.Э. Линке // Метрология и стандартизация аналитических измерений. – Новосибирск, 1990. – С. 138–139.
4. Лячина, Е. Полиоксикислоты – новое поколение косметических ингредиентов / Е. Лячина // Журнал по прикладной эстетике. – 2008. – № 6. – С. 62–65.
5. Рудаков, О.Б. Современная жидкостная хроматография / О.Б. Рудаков, К.К. Полянский, В.Ф. Селеменов // Масла и жиры. – 2005. – № 12(58). – С. 13–14.
6. Серов, А.В. Теоретическое обоснование и экспериментальные исследования химико-технологических проблем получения, определения и использования лактозы и ее производной лактулозы : дисс. ... д-ра техн. наук : 05.18.04 / Серов Александр Владимирович. – Ставрополь, 2004. – 307 с.
7. Синельников, Б.М. Лактоза и ее производные / Б.М. Синельников, А.Г. Храпцов, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева, А.В. Серов; науч. ред. акад. РАСХН А.Г. Храпцова. – СПб.: Профессия, 2007. – 768 с.
8. Lopez-Covarrubias, S. Obtention de beta-Lactosa, Lactulosa y de mezclas de Fructosa y Galactosa a partir de suero de queso desproteinizado / S. Lopez-Covarrubias // Rev. Agrochim. Y Technol. Aliment. – 1985. – Vol. 25. – № 3. – P. 355–361.
9. Meyer, A. Ion-Pair RP-HPLC Determination of Sugars, Amino Sugars, and Uronic Acids after Derivatization with p-Aminobenzoic Acid / A. Meyer, C. Raba, and K. Fischer // J. Anal. Chem. – 2001. – Vol. 73. – P. 2377–2382.
10. Roelfmma, W.A. Chemical reaction's reactions of lactose derivatives / W.A. Roelfmma, B.F. Kuster // Netherlands Milk Dairy J. – 1998. – № 42. – P. 469–483.
11. Saarela, M. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic Lactobacillus strains / M. Saarela, K. Hallamaa // International Dairy Journal. – 2003. – Vol. 13. – P. 291–302.

12. Sexton, D. Determination of Lactose by Reversed phase High Performance Liquid Chromatography / D. Sexton // Department of Chemistry East Tennessee State University. – 2004. – P. 94.
13. Simms, P. J. Separation of lactose, lactobionic acid and lactobionolactone by high-performance liquid chromatography / P. J. Simms, K. B. Hicks, R. M. Haines, A. T. Hotchkiss, jun. and S. F. Osman // J. Chromatogr. A. – 1994. – 667(1–2) – P. 67–73.
14. US Patent N 20040151802, A23C 009/12. Process for manufacturing cheeses and other dairy products and products thereof / Kraft Foods R & D, Inc. Prior November 6, 2003. Pat. August 5, 2004.

ГОУ ВПО «Северо-Кавказский  
государственный технический университет»,  
355028, Россия, г. Ставрополь,  
проспект Кулакова, 2.  
Тел./факс: (8652) 95-68-08  
e-mail: info@stv.runnet.ru

## SUMMARY

**M.V. Gritsaeva, A.V. Serov, O.A. Slepysheva, A.G. Khramtsov**

### **RESEARCH ON THE POSSIBILITY OF DETERMINING LACTOBIONIC ACID BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY**

At present lactose and its derivatives are widely used in medicine, food industry, luxury cosmetics. Due to its unique properties, the lactobionic acid, a product of lactose oxidation is of special interest. Therefore, the development of a quick and reliable method for assessing the quality of hydroxy acid, and the products obtained during its synthesis is highly topical. One of the perspective directions for modern analysis of carbohydrates is chromatography but the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) for lactobionic acid appeared to be labor-consuming and there are no data on gas-liquid chromatography (GLC). The possibility of using the gas-liquid chromatography to analyze the quality of lactobionic acid is shown; the method and optimal conditions of chromatography are described. It has been found that the best resolution of the peaks is reached in the mode of temperature programming from 175 to 260 °C at a rate of 6 deg/min and the sensitivity of flame ionization detector –  $2 \cdot 10^{-9}$  A. The time of lactobionic acid retention has been defined. It has been shown that it is not affected by the presence of lactose.

Lactose, lactobionic acid, gas-liquid chromatography.

North Caucasus State Technical University,  
2, Kulakova, Stavropol, 355029, Russia  
Phone/Fax: +7(8652)956808  
e-mail: info@stv.runnet.ru

