Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 3

БИОХИМИЯ

И. А. ЕГОРОВ и Н. Б. БОРИСОВА

РАЗДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЕТОКИСЛОТ В ВИНЕ МЕТОДОМ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 V 1955)

Кетокислоты наряду с другими органическими кислотами во многом определяют ход протекающих биохимических реакций в технологии виноделия и в последующей — выдержке вина. Разработка количественных методов определения кетокислот затрудняется тем, что они содержатся в винах в малых количествах.

Задачей данной работы являлась разработка способа определения кетокислот в вине методом хроматографии на бумаге, отличающимся, как известно, большой чувствительностью и точностью.

Н. М. Сисакян и Э. Н. Безингер (1) впервые использовали метод распределительной хроматографии на бумаге для разделения аминокислот вина. А. К. Родопуло (2) при помощи этого метода количественно определил в сусле и вине щавелевую, винную, яблочную, лимонную и янтарную кислоты. В основу нашего исследования была положена реакция образования гидразонов кетокислот при взаимодействии их с фенилгидразином и дальнейшее разделение гидразонов при помощи хроматографии на бумаге. Кавалини и Фронтали (3) использовали этот же прием при изучении кетокислот в крови, печени и других тканях и органах животных.

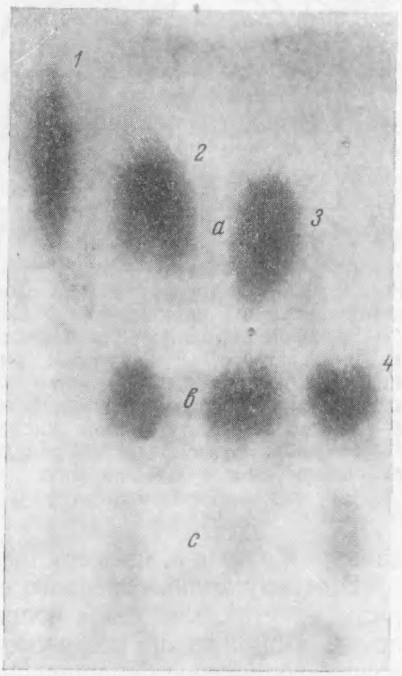


Рис. 1. Хроматограмма гидразонов кетокислот. *1* — кетоглютаровая кислота; *2* — смесь кетоглютаровой и пировиноградной кислот; *3* — кетокислоты, выделенные из шампанского; *4* — пировиноградная кислота

По нашему методу выделение кетокислот из вина в виде гидразонов производится следующим образом. 10 мл вина помещается в небольшую делительную вороночку, туда же добавляется 1 мл 0,4% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 *н* HCl. Содержимое воронки хорошо перемешивалось и оставлялось при комнатной температуре на 45 мин. для образования гидразонов. Специальные опыты показали, что за это время все кетокислоты вина вступят в реакцию с фенилгидразином. В случае наличия в вине кетокислот в количествах, пре-

вышающих 75 мг на 1 л, количество добавляемого 2,4-динитрофенилгидразина должно быть увеличено до 1,5—2 мл.

Образовавшиеся гидразоны вместе с непрореагировавшим фенилгидразином извлекаются серным эфиром, для чего в воронку добавляется 5 мл эфира, смесь перемешивается и после четкого разделения слоев эфирный слой отделяется, а к водному (винному) остатку добавляется еще 5 мл эфира, все снова перемешивается и эфир отделяется. Такое извлечение повторяется 5 раз. Полученные эфирные экстракты соединяются вместе и упариваются на водяной бане под небольшим вакуумом. Остаток подсушивается в вакуум-эксикаторе, после чего он растворяется в 3 мл водного 2 *н* аммиака. Аммиачный раствор, содержащий соли кетокислот, промывается эфиром для удаления свободного фенилгидразина и нейтральных гидразонов. Промывка производится до тех пор, пока последние порции эфира не будут давать окраски от прибавляемого раствора щелочи. Затем из водно-аммиачного раствора гидразонов кетокислот берется проба в количестве 0,1 мл и наносится на полоску хроматографической бумаги. Наиболее приемлемой бумагой, по нашим данным, является плотная хроматографическая бумага типа картон, изготовляемая Ленинградской фабрикой.

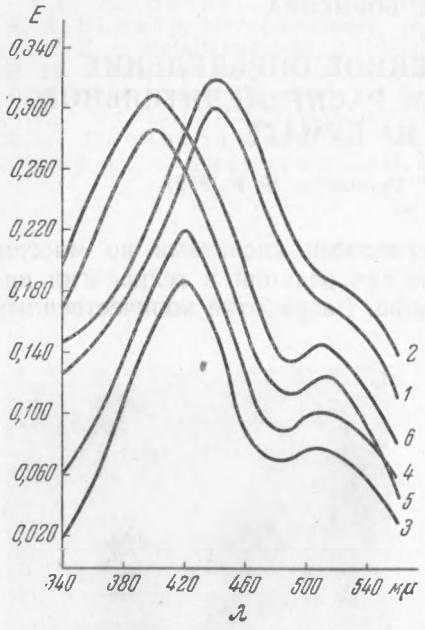


Рис. 2. Спектры поглощения гидразонов кетокислот в щелочном растворе. *1* — гидразон пировиноградной кислоты из шампанского; *2* — гидразон пировиноградной кислоты; *3* — изомер пировиноградной кислоты из шампанского; *4* — изомер пировиноградной кислоты; *5* — гидразон кетоглютаровой кислоты из шампанского; *6* — гидразон кетоглютаровой кислоты

В качестве растворителя при бумажной хроматографии применялась смесь, состоящая из бутилового спирта, этилового спирта и воды в отношении 40 : 10 : 50 частей по объему.

На рис. 1 представлена фотография хроматограммы гидразонов кетокислот.

На хроматограмме отчетливо выделяются три пятна — *a*, *b* и *c*. Пятно *a* по величине R соответствует кетоглютаровой кислоте, *b* — пировиноградной кислоте и *c* — согласно данным Кавалини, изомеру пировиноградной кислоты.

В основу количественного определения разделенных таким путем гидразонов кетокислот была положена цветная реакция гидразонов со щелочью. Прибавление к гидразонам 1 *н* раствора NaOH вызывает темное красно-коричневое окрашивание, по интенсивности которого судят о количестве кетокислот.

Для того чтобы убедиться в наличии кетоглютаровой и пировиноградной кислот в вине, мы, кроме хроматографического разделения их на бумаге, сняли спектры поглощения света гидразонами химически чистых кетокислот в щелочном растворе и гидразонами кислот, выделенных из шампанских вин. Полученные данные представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что гидразоны пировиноградной и кетоглютаровой кислот имеют различные максимумы поглощения света. Гидразон пировиноградной кислоты имеет максимум поглощения света при λ 440 мμ, а ее изомер — при 420 мμ, максимум же поглощения света гидразоном кетоглютаровой кислоты падает на 400 мμ. Существенно также, что ход кривых поглощения света гидразонами в щелочном растворе кетокислот хи-

мически чистых и выделенных описанными методами из шампанского вина совершенно идентичен.

Таким образом, на основании данных хроматографических исследований и данных спектрофотометрического анализа можно считать установленным наличие в винах кетоглютаровой и пировиноградной кислот.

Для количественного определения этих кислот в винах вырезались участки хроматографической бумаги, соответствующие кетоглютаровой кислоте и пировиноградной кислоте вместе с ее изомером. Вырезанные участки бумаги разрезаются на мелкие кусочки и помещаются в центрифужные пробирки, куда добавляется 4 мл 1 *н* NaOH. Нарезанные кусочки бумаги хорошо перемешиваются в щелочном растворе и через 10 мин. центрифугируются 20 мин. при 3000 оборотах в минуту. Затем окрашенный прозрачный раствор сливается и по истечении 45 мин. колориметрируется.

В нашей работе применялся фотоэлектрический колориметр модель ФЭК № 1 с синим светофильтром № 3. Толщина слоя жидкости в кювете 3 мм. Для расчета количества кетокислот мы пользовались калибровочной шкалой, которая составлялась с использованием химически чистых реактивов — пировиноградной кислоты (в виде ее натриевой соли) и α-кетоглютаровой кислоты.

Таблица 1

Содержание пировиноградной и кетоглютаровой кислот в различных винах (в мг на 1 л вина)

Вино	Пировиноградн. к-та	Кетоглютаров. к-та
Шампанское сладкое	15	30
„ сухое .	18,5	32,5
„ полусладкое	18,5	32,5
Шампанское полусухое	16,5	34,0
Вино типа херес . .	7,5	17,0
„ воскеваз . . .	7,5	20
„ плодоягодное .	23,5	36,5

В табл. 1 приводятся результаты определения пировиноградной и кетоглютаровой кислот в различных образцах вин.

Таким образом, анализы вин показали наличие в них пировиноградной и кетоглютаровой кетокислот, причем последняя во всех исследованных винах находится в преобладающем количестве.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
19 V 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Н. М. Сисакян, Э. Н. Безингер, ДАН, 69, № 4 (1949). [2] А. К. Родопуло, Виноделие и виноградарство, № 8, 8 (1952), [3] D. Cavallini, N. Frontali, Biochim. et Biophys. Acta, 13, No. 3, 313 (1954).