

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ
ANALYTICAL CHEMISTRY

УДК 543.422.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-60-1-18-26>

Поступила в редакцию 17.01.2023
Received 17.01.2023

В. В. Жилко, Н. В. Нехань

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

**ПРИМЕНЕНИЕ КАТИОННОГО КРАСИТЕЛЯ ПИРОНИНА G (Y)
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО
И ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫСШИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ
В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКЦИИ**

Аннотация. Для экстракционно-фотометрического и экстракционно-флуориметрического определения содержания карбоновых кислот в молочных продуктах предложено использование гептан-октанольного экстракта ионного ассоциата высших карбоновых кислот с катионным красителем – пиронина G (Y). Образующийся ионный ассоциат характеризуется максимумом оптической плотности при 510 нм и интенсивной флуоресценцией с максимумом при 566 нм. Максимальная оптическая плотность и интенсивность флуоресценции ионного ассоциата наблюдается при его экстракции октанол/гептаном из водных растворов с pH = 11,25. Рассчитан квантовый выход ионных ассоциатов высших карбоновых кислот с пиронином G относительно стандартного раствора флуоресцеина. Разработана методика экстракционно-флуориметрического определения гидрофобных кислот в молоке и сыре. Методика апробирована при определении содержания карбоновых кислот в образцах молока и сыра. Содержание высших карбоновых кислот, определяемое по методике с пиронином G, в молоке составило $(6,6 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$ М, в сыре – $(1,1 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$ моль/кг. Полученные результаты экстракционно-фотометрического и экстракционно-флуориметрического определения карбоновых кислот в молочных продуктах позволяют рекомендовать к использованию разработанную методику в практике учреждений соответствующего профиля.

Ключевые слова: экстракция, пиронин G (Y), фотометрия, флуориметрия, карбоновые кислоты, катионные красители

Для цитирования. Жилко, В. В. Применение катионного красителя пиронина G (Y) для количественных фотометрического и флуориметрического определения высших карбоновых кислот в молочных продуктах с использованием экстракции / В. В. Жилко, Н. В. Нехань // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2024. – Т. 60, № 1. – С. 18–26. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-1-18-26>

V. U. Zhyhlo, N. V. Nekhan

Belarusian State University, Minsk, Belarus

**APPLICATION OF CATIONIC DYE PYRONIN G (Y) FOR QUANTITATIVE PHOTOMETRIC
AND FLUORIMETRIC DETERMINATION OF HIGHER CARBOXYLIC ACIDS
IN DAIRY PRODUCTS USING EXTRACTION**

Abstract. In this work we propose to use a heptane-ethanol extract of the ionic associate of higher carboxylic acids with a cationic dye – pyronin G (Y) for quantitative extraction-photometric and extraction-fluorimetric determination of carboxylic acids in dairy products. The resulting ion associate is characterized by a maximum of optical density at 510 nm and intense of fluorescence with a maximum at 566 nm. The maximum optical density and fluorescence intensity of the ion associate is observed during its extraction with octanol/heptane from aqueous solutions with pH = 11.25. The quantum yield of ionic associates of higher carboxylic acids with pyronine G (Y) relative to the standard solution of fluorescein was calculated. A technique has been developed for the extraction-fluorimetric determination of hydrophobic acids in milk and cheese. The method has been tested in the determination of carboxylic acids content in milk and cheese samples. The content of higher carboxylic acids, determined by the method with pyronin G, in milk was $(6.6 \pm 0.15) \cdot 10^{-4}$ M, in cheese – $(1.1 \pm 0.10) \cdot 10^{-3}$ mol/kg. The obtained results of extraction-photometric and extraction-fluorimetric determination of carboxylic

acids in dairy products make it possible to recommend the developed method in the practice of institutions of the corresponding profile.

Key words: extraction, pyronin G (Y), photometry, fluorimetry, carboxylic acids, cationic dyes

For citation. Zhylyko V. U., Nekhan N. V. Application of cationic dye pyronin G (Y) for quantitative photometric and fluorimetric determination of higher carboxylic acids in dairy products using extraction. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 1, pp. 18–26 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-1-18-26>

Введение. Высшие карбоновые кислоты (ВКК) в окружающей среде могут присутствовать в виде свободных карбоновых кислот, моно-, ди- или триглицеридов, а также фосфолипидов. В этих объектах животного и растительного происхождения свободные кислоты обычно содержат от 12 до 22 атомов углерода, хотя количество C_{16} – C_{20} превалирует. В этих образцах свободные карбоновые кислоты, как правило, являются лишь следовой фракцией.

В некоторых источниках [1] отмечается наличие значительных количеств свободных ВКК в молоке и молочных продуктах. Органические кислоты образуются в молочных продуктах в результате нескольких процессов: гидролиза молочного жира в процессе липолиза, естественного биохимического метаболизма или бактериального роста. Таким образом, количественное определение органических кислот важно для контроля за ростом бактерий и их деятельностью, а также за питательной ценностью продукта в связи с тем, что, например, органические кислоты в сочетании с аминокислотами, лактонами, метилкетонами, спиртами и фенольными соединениями определяют аромат большинства сыров [2].

Замечено также, что содержание свободных жирных кислот постепенно изменяется в процессе созревания сыра. В молодом сыре уксусная и пропионовая кислоты преобладают над фракцией C_{12} – C_{18} . Показано, что концентрация более длинных жирных кислот увеличивается в процессе созревания сыра. Точное количественное определение свободных жирных кислот в молоке и молочных продуктах имеет большое значение, так как они в значительной степени влияют на вкусовые качества данных продуктов. Например, короткоцепочечные жирные кислоты с восемью атомами углерода в основной цепи и менее в зависимости от их относительного содержания могут придавать как приятный, так и прогорклый вкус конечному продукту. Следовательно, содержание свободных жирных кислот может служить важным показателем качества молочной продукции [3].

Количественный химический анализ образцов животного происхождения обычно предусматривает извлечение и концентрирование, очистку концентрата и дальнейшее количественное определение ВКК. Так как образцы могут иметь весьма различные химические и физические свойства, то и методы их очистки и концентрирования весьма различны. Необходимо отметить влияние выбора пробоподготовки, которая может в значительной степени влиять на результат анализа.

Обычно выбор метода концентрирования обусловлен объемом пробы, концентрацией определяемого органического соединения и чувствительностью конечного метода определения. Часто наилучшим и наиболее распространенным методом предварительного отделения карбоновых кислот является жидкостная экстракция органическим растворителем непосредственно из пробы либо после ее предварительной обработки. Данный метод концентрирования весьма эффективно сочетается с флуориметрией и фотометрией.

Перспективно сочетание жидкостного концентрирования с оптическими методами анализа, которые сами по себе являются весьма высокочувствительными и перспективными. Применяют экстракционные системы различных типов, выбор которых зависит от химической природы определяемой кислоты, состава растворенных веществ и условий проведения экстракции.

В экстракционно-фотометрических методах количественного определения гидрофобных анионов, в частности ВКК, вопрос подбора подходящего катионного красителя является нередко ключевым. Не менее важным считается и обоснованный подбор необходимых значений pH полярной фазы для процесса экстракции, ведь ВКК сильно экстрагируются в неполярную фазу в молекулярной форме. Для их экстракции нами предложен стабильный в сильнощелочных условиях катионный краситель пиронин G (ПГ) [4], который не только хорошо поглощает свет

в УФ-оптическом диапазоне, но и сильно флуоресцирует. Таким образом, ПГ перспективен для количественного определения ВКК.

Материалы и методы исследования. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Solar PB 2201, измерение интенсивности флуоресценции – спектрофлуориметре Solar CM 2203 при температуре 20 ± 1 °С. Для поддержания заданной температуры использовался термостат TW-2.

Для проведения исследований были использованы следующие вещества: пиронин G – Fluka Chemie AG – «ч.»; гептан эталонный, н-октанол-1 – «ч.»; хлорид натрия – «ч.»; глицин, соляная кислота – «х. ч.»; гидроксид натрия – «ч. д. а.»; хлороформ – «ч. д. а.»; метанол – «ч.»; диэтиловый эфир – «х. ч.»; этанол – пищевой высшей очистки.

Для ионных ассоциатов ВКК с ПГ определен квантовый выход. Для определения квантового выхода были сравнены интенсивности флуоресценции исследуемого ионного ассоциата и стандартного вещества – раствора флуоресцеина в карбонат-бикарбонатном буферном растворе с pH = 9,6. Квантовый выход стандартного раствора флуоресцеина $\Phi = 0,85$. Значения оптических плотностей обоих растворов одинаковы и не превышают 0,02. Расчет квантового выхода осуществлялся по формуле:

$$\Phi_{PG} = \Phi_{ST} \frac{I_{PG} \cdot A_{ST}}{I_{ST} \cdot A_{PG}},$$

где Φ_{PG} – квантовый выход ионного ассоциата ВКК с ПГ; Φ_{ST} – квантовый выход стандартного раствора флуоресцеина; I_{PG} – интенсивность флуоресценции ионного ассоциата ВКК с ПГ; I_{ST} – интенсивность флуоресценции стандартного раствора флуоресцеина; A_{PG} – оптическая плотность ионного ассоциата ВКК с ПГ; A_{ST} – оптическая плотность стандартного раствора флуоресцеина.

Квантовый выход ионного ассоциата ВКК с ПГ составил $0,21 \pm 0,1$. Значение квантового выхода для ионного ассоциата ВКК с ПГ свидетельствует о применимости данного красителя для количественного флуориметрического анализа.

Выбор экстракционных систем. В ходе эксперимента было изучено несколько экстракционных систем, предложенных в литературе [5–8], которые можно отнести к наиболее распространенным их комбинациям, где в качестве неполярной фазы были выбраны хлороформ или гептан, а в качестве полярной – комбинация простейших спиртов, воды, диэтилового эфира.

Экстракционная система хлороформ/этанол(метанол)/вода. Аликвота молока объемом $1,5 \text{ см}^3$ смешивалась с $5,0 \text{ см}^3$ этанола, $2,5 \text{ см}^3$ хлороформа и $0,6 \text{ см}^3$ воды. Таким образом, было достигнуто объемное соотношение метанол : хлороформ : вода 2 : 1 : 0,8 соответственно. Смесь встряхивалась в течение 15 мин, после чего к ней было добавлено $2,5 \text{ см}^3$ хлороформа и $2,5 \text{ см}^3$ 2%-го раствора безводного сульфата натрия (с целью уменьшения растворимости неполярной фазы в воде). Соотношение объемов фаз в полученной смеси составило 2 : 2 : 1,8 (метанол : хлороформ : вода). Данная смесь после перемешивания в течение 5 мин расслоилась на две фазы. Объем нижнего (хлороформного) слоя составил примерно $7,6 \text{ см}^3$ вместо $5,0 \text{ см}^3$, что свидетельствует о значительной растворимости полярной фазы в хлороформе в первую очередь этанола. Данный процесс в большой степени затрудняет дальнейшее количественное определение ВКК, так как невозможно точно измерить объем органической фазы и, соответственно, отбираемую на анализ долю кислоты.

Замена этанола на более полярный метанол в описанной выше методике привела к гораздо более эффективному разделению фаз. Объем хлороформного слоя составил $5,0 \text{ см}^3$. Нижняя фаза была отфильтрована через фильтровальную бумагу, содержащую около 2 г безводного сульфата натрия. Таким образом был получен чистый прозрачный фильтрат. Однако в дальнейшем при смешивании его с гептаном раствор стал мутным. Данное явление, по-видимому, обусловлено значительной растворимостью содержащихся в молоке коллоидообразующих веществ (предположительно фосфолипидов) в хлороформе. Это сделало невозможным дальнейшее использование смеси хлороформ–метанол–вода в качестве экстракционной системы для количественного определения карбоновых кислот в молочных продуктах.

Экстракционная система гептан–метанол–вода. К 1,5 см³ молока было добавлено 5,0 см³ метанола, 2,5 см³ гептана и 0,6 см³ воды. После встряхивания смеси в течение 15 мин к ней было добавлено еще 2,5 см³ гептана и 2,5 см³ 2%-го раствора безводного сульфата натрия. Полученная смесь встряхивалась в течение 5 мин. Однако попытка отказаться от хлороформа в предложенной выше схеме, заменив его на гептан, привела к тому, что фазы разделились плохо. Таким образом, экстракционная система гептан–метанол–вода также оказалась неподходящей для проведения количественного анализа содержания карбоновых кислот в молочных продуктах.

Экстракционная система гептан–диэтиловый эфир–этанол (метанол). К пробе молока объемом 2,0 см³ нами было прибавлено 2,0 см³ этанола, 0,2 см³ концентрированной серной кислоты и 7,5 см³ смеси диэтиловый эфир–гептан (1 : 1). Полученная смесь встряхивалась в течение 5 мин. В результате фазы разделились без применения центрифугирования. Верхний слой (эфир–гептан) чистый, прозрачный, следовательно, необходимости в его фильтровании нет. Роль серной кислоты, используемой в ходе пробоподготовки, заключалась в разрушении коллоидной структуры молока и переведении ВКК в молекулярную форму, хорошо экстрагирующуюся в гептановую фазу. С целью изучения данной системы этанол был заменен на метанол. Разделение фаз при этом произошло не так эффективно.

Экстракционная система гептан–этанол–вода. Для упрощения системы была произведена замена эфира на гептан в описанной выше схеме. Это дало хорошие результаты: разделение фаз произошло без центрифугирования, верхний гептановый слой был чистым и прозрачным. Данная комбинация растворителей является приемлемой и для экстракции карбоновых кислот из сыра. Это было подтверждено следующим образом: к тщательно измельченному образцу сыра массой около 0,2 г было добавлено 2,5 см³ этанола, 2,4 см³ воды, 0,1 см³ концентрированной серной кислоты и 5,0 см³ гептана. Полученная смесь тщательно встряхивалась в течение 5 мин. Фазы разделились без центрифугирования. Фильтрование также не понадобилось, так как гептановый слой был абсолютно прозрачным.

Результаты и их обсуждение. Наиболее подходящей для извлечения ВКК из молочных продуктов нами была признана система гептан–этанол–вода, поскольку она удовлетворяет основным требованиям, предъявляемым к подобным системам. Используемые растворители являются общедоступными и нетоксичными, а их комбинация обеспечивает эффективное разделение фаз без проведения дополнительных операций, таких как центрифугирование и фильтрование.

Полученный экстракт был использован для дальнейшего количественного определения ВКК по следующим, разработанным нами, экстракционно-фотометрической и экстракционно-флуориметрической методикам.

Экстракционно-флуориметрическая методика позволяет определять низкие значения карбоновых кислот (предел обнаружения методики составляет $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л молока и $1 \cdot 10^{-4}$ моль/кг сыра), в то же время экстракционно-фотометрическая методика проще и довольствуется использованием только спектрофотометра (возможно использование и фотоколориметра).

Данные разработанные нами методики сходны, но различаются некоторыми нюансами пробоподготовки и самого анализа, поэтому целесообразно рассматривать их отдельно. Дополнительно приведем полученный нами спектр поглощения ПГ в гептан-октанольном (5%-м) растворе. Этот спектр (рис. 1) позволяет выбрать длины волн для возбуждения и измерения излучаемого света.

Экстракционно-фотометрическая методика количественного определения ВКК в молочных продуктах с помощью ПГ. В качестве органической фазы был выбран раствор 5%-го н-октанола в гептане. Такая комбинация растворителей является оптимальной и способствует почти полному переводу ассоциата в органическую фазу [9, 10].

Строим градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации пальмитиновой кислоты. Для этого по навеске приготавливаем $2 \cdot 10^{-3}$ М раствор ПГ в воде. По навеске методом последовательных разбавлений готовим $2 \cdot 10^{-4}$ М раствор пальмитиновой кислоты в гептане. В пробирки с пришлифованными пробками вносим по 0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 см³ $2 \cdot 10^{-4}$ М раствора пальмитиновой кислоты. Туда же вносим по 5 см³ 5%-го раствора октанола в гептане и органическую фазу доводим гептаном до 6 см³, затем вносим в пробирки по 0,5 см³

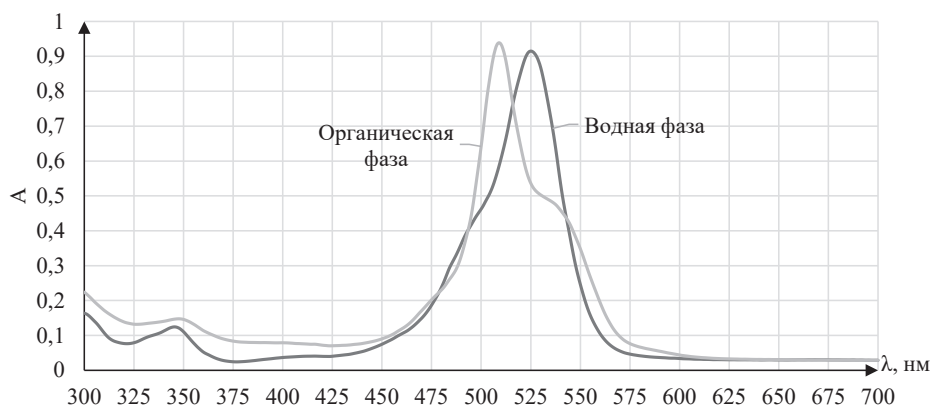


Рис. 1. Спектр ПГ в воде (рН = 11,25), $C = 4,7 \cdot 10^{-4}$ М, $l = 1$ см и ассоциата ПГ с пальмитиновой кислотой в гептане (содержит 5 % октанола), $C = 4,7 \cdot 10^{-4}$ М, $l = 1$ см

Fig. 1. Spectrum of pyronine G in water (pH = 11.25), $C = 4.7 \cdot 10^{-4}$ M, $l = 1$ cm and associate of pyronine G with palmitic acid in heptane (contains 5 % octanol by volume), $C = 4.7 \cdot 10^{-4}$ M, $l = 1$ cm

$2 \cdot 10^{-3}$ М раствора ПГ, $0,3 \text{ см}^3$ $0,2$ М NaOH и объем водной фазы доводим водой до 6 см^3 . Полученные растворы перемешиваем 2–3 мин, термостатируем 3–5 мин при 20 ± 1 °С и органическую фазу фотометрируем при длине волны 510 нм в $1,0$ см кювете. Пример калибровочной прямой представлен на рис. 2.

Экстракция карбоновых кислот из молока. В девять пробирок с пришлифованными пробками вносим по $2,1 \text{ см}^3$ этанола и по $0,2 \text{ см}^3$ концентрированной серной кислоты. Затем в три пробирки вносим по $1,0 \text{ см}^3$ исследуемого молока, в три другие – по $0,5 \text{ см}^3$ исследуемого молока и по $0,5 \text{ см}^3$ воды, в три оставшиеся пробирки – по $0,5 \text{ см}^3$ исследуемого молока, по $0,5 \text{ см}^3$ воды и $1,0 \text{ см}^3$ $4,00 \cdot 10^{-4}$ М раствора пальмитиновой кислоты в гептане. Объем растворов доводим гептаном до $6,6 \text{ см}^3$. Растворы перемешиваем 5 мин, после чего органический слой из каждой пробирки переносим в чистые пробирки. Процедуру экстракции повторяем дважды для достижения максимально полного извлечения карбоновых кислот из исследуемого молока.

Ход измерения. Исследуемый раствор ВКК в гептане объемом $1,0 \text{ см}^3$ вносим в пробирки с пришлифованными пробками. Туда же добавляем по $1,0 \text{ см}^3$ 25%-го раствора октанола в гептане, органическую фазу доводим гептаном до $6,0 \text{ см}^3$, затем в пробирки вносим по $0,5 \text{ см}^3$ $2,0 \cdot 10^{-3}$ М раствора ПГ, $0,3 \text{ см}^3$ $0,2$ М NaOH и объем водной фазы содержимого пробирок доливаем водой до $6,0 \text{ см}^3$. Полученные растворы перемешиваем 2–3 мин, термостатируем 3–5 мин при 20 ± 1 °С, органическую фазу фотометрируем при длине волны 510 нм в $1,0$ см кювете.

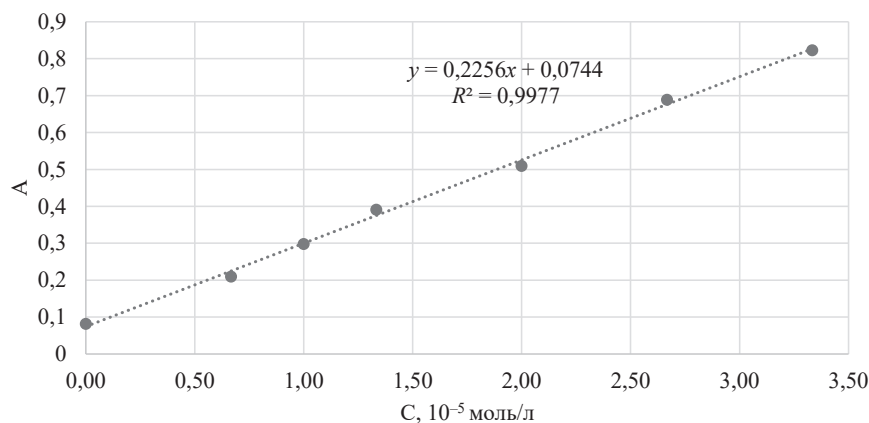


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации введенной в органическую фазу пальмитиновой кислоты

Fig. 2. Dependence of optical density on the concentration of palmitic acid introduced into the organic phase

Концентрацию определяем по градуировочному графику (рис. 2). Правильность метода была подтверждена методом добавок и методом разбавления. Результаты определения приведены в табл. 1. Предел обнаружения методики составляет $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л молока.

Таблица 1. Результаты определения концентрации карбоновых кислот после трехкратной экстракции ($P = 0,95$; $n = 3$)

Table 1. Results of determining the concentration of carboxylic acids after three extractions ($P = 0.95$; $n = 3$)

Образец	Концентрация кислот в исходном образце, М	Концентрация кислот в образце с добавлением пальмитиновой кислоты с поправкой на добавленные количества, М	Концентрация кислот в разбавленном в 2 раза образце с поправкой на разбавление, М
Молоко детское «Депи» 3,2%-й жирности (Минский молочный завод № 1)	$(6,87 \pm 0,14) \cdot 10^{-4}$	$(6,54 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$	$(6,40 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$

Экстракция карбоновых кислот из сыра. В девять пробирок с пришлифованными пробками вносим по $2,5 \text{ см}^3$ этанола, $2,4 \text{ см}^3$ воды и по $0,1 \text{ см}^3$ концентрированной серной кислоты. Затем в три пробирки добавляем по $0,2 \text{ г}$ исследуемого сыра, в три другие – по $0,125 \text{ г}$, а в три оставшиеся пробирки – по $0,125 \text{ г}$ сыра и по $0,3 \text{ см}^3$ $8,00 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ раствора пальмитиновой кислоты в гептане. Объем растворов доводим гептаном до $10,0 \text{ см}^3$. Растворы перемешиваем 5 мин, после чего органический слой из каждой пробирки переносим в чистые пробирки. Процедуру экстракции повторяем дважды для достижения максимально полного извлечения карбоновых кислот из сыра.

Ход измерения. Исследуемый раствор ВКК в гептане объемом $0,2 \text{ см}^3$ вносим в пробирки с пришлифованными пробками. Туда же добавляем по $1,0 \text{ см}^3$ 25%-го раствора октанола в гептане, доводим органическую фазу гептаном до $6,0 \text{ см}^3$. Затем в пробирки вносим по $0,5 \text{ см}^3$ $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ раствора ПГ, $0,3 \text{ см}^3$ $0,2 \text{ М}$ NaOH и объем водной фазы содержимого пробирок доводим водой до $6,0 \text{ см}^3$. Полученные растворы перемешиваем 2–3 мин, термостатируем 3–5 мин при $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, и органическую фазу фотометрируем при длине волны 510 нм в $1,0 \text{ см}$ кювете.

Правильность метода подтверждена методом добавок и методом разбавления. Результаты определения приведены в табл. 2. Предел обнаружения методики составляет $1 \cdot 10^{-4}$ моль/кг сыра.

Таблица 2. Результаты определения концентрации карбоновых кислот в сыре ($P = 0,95$; $n = 3$)

Table 2. Results of determining the concentration of carboxylic acids in cheese ($P = 0.95$; $n = 3$)

Образец	Концентрация кислот в исходном образце, моль/кг	Концентрация кислот в образце с добавлением пальмитиновой кислоты с поправкой на добавленные количества, моль/кг	Концентрация кислот в разбавленном в 2 раза образце с поправкой на разбавление, моль/кг
Сыр «Столичный» 45%-й жирности (Минский молочный завод № 1)	$(1,06 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$	$(1,08 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	$(1,07 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$

Экстракционно-флуориметрическая методика количественного определения ВКК в молочных продуктах с помощью ПГ. Строим градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации пальмитиновой кислоты. Для этого по навеске приготавливаем $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ раствор ПГ в воде. По навеске приготавливаем $4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ раствор пальмитиновой кислоты в гептане и разбавляем его в 25 раз. В пробирки с пришлифованными пробками вносим по $0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,65 \text{ см}^3$ $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ раствора пальмитиновой кислоты. Туда же добавляем по $4,35 \text{ см}^3$ 5%-го раствора октанола в гептане и доводим органическую фазу гептаном до 5 см^3 , затем вносим в пробирки по $0,35 \text{ см}^3$ $4,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ раствора ПГ, 2 см^3 глицинового буфера ($\text{pH} = 11,25$) и объем водной фазы доливаем водой до 10 см^3 . Полученные растворы перемешиваем 2–3 мин, измеряем интенсивность флуоресценции органической фазы при длине волны 566 нм в 1 см кювете. Пример калибровочной прямой представлен на рис. 3.

Для проверки корректности методики и полноты переноса ВКК были использованы метод разбавления и метод добавок.

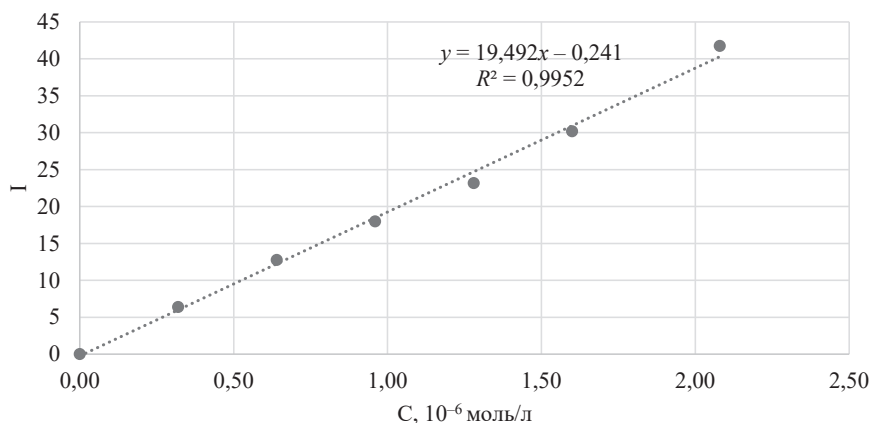


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации введенной в органическую фазу пальмитиновой кислоты

Fig. 3. Dependence of the fluorescence intensity on the concentration of palmitic acid introduced into the organic phase

Ход измерения. В девять пробирок с пришлифованными пробками вносим по 2,1 см³ этанола и по 0,2 см³ концентрированной серной кислоты. Затем в три пробирки добавляем по 1,0 см³ исследуемого молока, в три другие – по 0,5 см³ исследуемого молока и по 0,5 см³ воды, в три оставшиеся пробирки – по 0,5 см³ исследуемого молока, 0,5 см³ воды и 1,0 см³ 4,0 · 10⁻⁴ М раствора пальмитиновой кислоты в гептане. Объем растворов доводим гептаном до 6,6 см³. Растворы перемешиваем 5 мин и переносим органический слой из каждой пробирки в чистые пробирки. Процедуру экстракции повторяем дважды для достижения максимально полного извлечения карбоновых кислот из исследуемого молока. Затем экстракт был внесен в экстракционную систему, описанную выше, вместо объема пальмитиновой кислоты для определения интенсивности флуоресценции (табл. 3).

Таблица 3. Результаты определения концентрации карбоновых кислот ($P = 0,95$; $n = 3$)

Table 3. Results of determining the concentration of carboxylic acids ($P = 0.95$; $n = 3$)

Образец	Концентрация кислот в исходном образце, М	Концентрация кислот в образце после добавления пальмитиновой кислоты с поправкой на добавленные количества, М	Концентрация кислот в разбавленном образце с поправкой на разбавление, М
Молоко детское «Депи» 3,2%-й жирности (Минский молочный завод № 1)	$(6,75 \pm 0,10) \cdot 10^{-4}$	$(6,62 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(6,56 \pm 0,08) \cdot 10^{-4}$

Аналогично экстракционно-фотометрической методике определения ВКК в сыре разработана экстракционно-флуориметрическая методика, результаты которой представлены в табл. 4.

Таблица 4. Результаты определения концентрации карбоновых кислот в сыре ($P = 0,95$; $n = 3$)

Table 4. Results of determining the concentration of carboxylic acids in cheese ($P = 0.95$; $n = 3$)

Образец	Концентрация кислот в исходном образце, моль/кг	Концентрация кислот в образце с добавлением пальмитиновой кислоты с поправкой на добавленные количества, моль/кг	Концентрация кислот в разбавленном в 2 раза образце с поправкой на разбавление, моль/кг
Сыр «Столичный» 45%-й жирности (Минский молочный завод № 1)	$(1,28 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$(1,14 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	$(1,17 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$

Согласно [6] концентрация ВКК ($C_{12}-C_{18}$) в исследуемых образцах молока и сыра (период созревания – 1 год), найденная методом капиллярной газовой хроматографии, равна $2,9 \cdot 10^{-4}$ М и $3,9 \cdot 10^{-3}$ моль/кг соответственно. Некоторые ученые проводили анализ ВКК ($C_{12}-C_{18}$) в молоке путем направленного на флуоресценцию модифицирования жирных кислот с последующим

хроматографірованіем (ВЭЖХ) полученных производных [11]. Содержание ВКК в молоке составило $9,1 \cdot 10^{-4}$ М. О зрелости сыров свидетельствует, например, концентрация ВКК ($C_{12}-C_{18}$) в образцах швейцарского сыра (период созревания – 9 месяцев), которая составила $8,9 \cdot 10^{-3}$ моль/кг и была определена с помощью флюидной газовой хроматографии [1].

Заклучение. В работе предложены и использованы для реальных образцов новые экстракционно-фотометрическая и экстракционно-флуориметрическая методики количественного определения ВКК в молочных продуктах с использованием эффективной экстракционной системы гептан–этанол–вода, предложенной нами. Вышеуказанные методики были использованы для определения содержания ВКК в молоке и сыре. Содержание ВКК, определяемое по методике с ПГ, в молоке составило $(6,6 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$ М, в сыре – $(1,1 \pm 0,10) \cdot 10^{-3}$ моль/кг. Полученные результаты хорошо согласуются между собой и с данными из литературных источников. Был также получен квантовый выход для ионного ассоциата ВКК с ПГ в гептан-октанольной системе. Рассчитанный квантовый выход ассоциата ВКК с ПГ ($0,21 \pm 0,1$) свидетельствует о применимости указанного красителя для количественного определения ВКК в молочных продуктах.

Список использованных источников

1. Богатова, О. В. Химия и физика молока / О. В. Богатова, Н. Г. Догарева. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. – 137 с.
2. Izco, J. M. Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis / J. M. Izco, M. Tormo, R. Jimenez-Flores // J. Dairy Sci. – 2002. – Vol. 85, № 9. – P. 2122–2129. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74290-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74290-2)
3. Tuomala, T. Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction – gas-chromatography / T. Tuomala, H. Kallio // Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung. – 1996. – Vol. 203, № 3. – P. 236 – 240. <https://doi.org/10.1007/bf01192870>
4. Жилко, В. В. Катионные красители и их использование для количественного экстракционно-фотометрического определения высших карбоновых кислот / В. В. Жилко, Н. В. Нехань // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 1. – С. 33–40. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-1-33-40>
5. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women / M. Silva [et al.] // Food chem. – 2005. – Vol. 93, № 2. – P. 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.026>
6. De Jong, C. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis / C. De Jong, H. T. Badings // J. High Resolut. Chromatogr. – 1990. – Vol. 13, № 2. – P. 94–98. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240130204>
7. Subramanian, A. Cheddar cheese classification based on flavor quality using a novel extraction method and Fourier transform infrared spectroscopy / I. A. Subramanian, W. J. Harper, L. E. Rodriguez-Saona // J. Dairy Sci. – 2009. – Vol. 92, № 2. – P. 87–94. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1449>
8. Gonzalez-Cordova, A. F. Quantitative determination of short-chain free fatty acids in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography / A. F. Gonzalez-Cordova, B. Vallejo-Cordoba // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49, № 10. – P. 4603–4608. <https://doi.org/10.1021/jf010108d>
9. Жилко, В. В. Подбор катионных красителей и условий экстракции для фотометрического определения высших карбоновых кислот / В. В. Жилко, Н. В. Климашевич // Актуальные задачи химии: исследования и перспективы: сб. материалов конф. – Житомир: Изд-во ЖГУ им. И. Франко, 2018. – С. 23.
10. Жилко, В. В. Экстракция высших карбоновых кислот с катионным красителем Пиронин G в сильнощелочной среде / В. В. Жилко, Н. В. Климашевич, А. Л. Козлова-Козыревская // Аналитика РБ-2018: сб. ст. 6-й Респ. конф. по аналит. химии с междунар. участием, Минск, Беларусь, 16–18 мая 2018 г. – Минск: Колорград, 2018. – С. 70.
11. Chi-vu, L. Simple and sensitive analysis of long-chain free fatty acids in milk by fluorogenic derivatization and high-performance liquid chromatography / L. Chi-vu, W. Hsin-Lung, C. Su-Hwei // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, № 1. – P. 71–73. <https://doi.org/10.1021/jf010986b>

References

1. Bogatova O. V. *Chemistry and physics of milk*. Orenburg, Orenburg State University, 2004. 137 p. (in Russian).
2. Izco J. M., Tormo M., Jimenez-Flores R. Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 2002, vol. 85, no. 9, pp. 2122–2129. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74290-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74290-2)
3. Tuomala T., Kallio H. Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on-line supercritical fluid extraction – gas-chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1996, vol. 203, no. 3, pp. 236–240. <https://doi.org/10.1007/bf01192870>
4. Zhylko V. U., Nekhan N. V. Cationic dyes and their use for quantitative extraction-photometric determination of higher carboxylic acids. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National*

Academy of Sciences of Belarus. Chemical series, 2021, vol. 57, no. 1, pp. 33–40 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-1-33-40>

5. Silva M., Silva M. T., Brandao S., Gomes J. C., Peternelli L. A., Franceschini S.C.C. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. *Food chemistry*, 2005, vol. 93, no. 2, pp. 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.026>

6. De Jong C., Badings H. T. Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1990, vol. 13, no. 2, pp. 94–98. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240130204>

7. Subramanian A., Harper W. J., Rodriguez-Saona L. E. Cheddar cheese classification based on flavor quality using a novel extraction method and Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 2009, vol. 92, no. 2, pp. 87–94. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1449>

8. Gonzalez-Cordova A. F., Vallejo-Cordoba B. Quantitative determination of short-chain free fatty acids in milk using solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no. 10, pp. 4603–4608. <https://doi.org/10.1021/jf010108d>

9. Zhylko V. U., Klimashevich N. V. Selection of cationic dyes and extraction conditions for the photometric determination of higher carboxylic acids. *Aktual'nye zadachi khimii: issledovaniya i perspektivy: sb. materialov konf. [Actual problems of chemistry: research and prospects: Collection of conference materials]*. Zhitomir, Publishing house of I. Frank ZhSU, 2018, pp. 23 (in Russian).

10. Zhylko V. U., Klimashevich N. V., Kozlova-Kozyrevskaya A. L. Extraction of higher carboxylic acids with the cationic dye Pironin G in a strongly alkaline medium. *Analitika RB-2018: sbornik statei 6-i Respublikanskoi konferencii po analiticheskoi khimii s mezhdunarodnym uchastiem, Minsk, Belarus', 16–18 maya 2018 g. [Analytics RB-2018: Collection of articles of the 6th Rep. Conf. on Analytical Chemistry]*. Minsk, Kolorgrad Publ., 2018, pp. 70 (in Russian).

11. Chi-vu L., Hsin-Lung W., Su-Hwei C. Simple and sensitive analysis of long-chain free fatty acids in milk by fluorogenic derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no. 1, pp. 71–73. <https://doi.org/10.1021/jf010986b>

Информация об авторах

Жилко Вячеслав Владимирович – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры. Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220050, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zhylko@tut.by

Нехань Наталья Викторовна – магистр химических наук, аспирант, преподаватель. Белорусский государственный педагогический университет имени М. Танка (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: n.klimashevich@mail.ru

Information about the authors

Zhylko Viachaslau U. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Associate Professor of the Department. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220050, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zhylko@tut.by

Nekhan Natalia V. – M. Sc. (Chemistry), Postgraduate Student; Lecturer. Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n.klimashevich@mail.ru