

MARIA CZARNECKA, ZBIGNIEW CZARNECKI, HALINA ROSZYK

## OCENA WYBRANYCH METOD OZNACZANIA KWASU MLEKOWEGO

### Streszczenie

Przeprowadzono ocenę i porównanie następujących metod oznaczania kwasu mlekowego: miareczkowej, kolorymetrycznej, fluorymetrycznej, enzymatycznej oraz HPLC. Opracowano metodę ilościowego oznaczania kwasu mlekowego w oparciu o technikę HPLC oraz porównano wyniki uzyskane tą metodą z wynikami uzyskanymi przy pomocy innych metod. Dokonano oceny dokładności tych metod w oparciu o odzysk, oraz ocenę precyzji na podstawie współczynnika zmienności.

### Wstęp

Zastosowanie fermentacji mlekowej w przemyśle spożywczym i paszowym staje się coraz bardziej powszechne. Główny produkt tej fermentacji – kwas mlekowy w różnych postaciach – znajduje coraz więcej zastosowań jako nowy dodatek technologiczny, wykazujący dużą przydatność w nowoczesnych procesach produkcji. Obecność kwasu mlekowego i jego ilość jest coraz częściej wykorzystywana jako jeden ze wskaźników jakości toksykologiczno-higienicznej produktów spożywczych takich jak wino, soki owocowe, warzywno itp. W niektórych przypadkach, np. w sokach owocowych kwas mlekowy jest składnikiem niepożądanym, a obecność jest wynikiem nieprawidłowo prowadzonego procesu technologicznego lub zakażenia mikrobiologicznego surowców i źle świadczy o higienie produkcji.

Dynamiczny rozwój badań naukowych oraz znaczny wzrost ich kapitałochłonności sprawia, iż coraz większą uwagę przywiązuje się do opracowania oraz doboru odpowiednich metod pomiarowych. Duży nacisk kładzie się na wykrywalność, dokładność i precyzję metod, przy równoczesnej możliwości zastosowania tych metod do szybkich, rutynowych analiz. Dotyczy to także kwasu mlekowego.

W przemyśle spożywczym i paszowym dokładne określenie zawartości kwasu mlekowego pozwala kontrolować:

- przebieg fermentacji mlekowej,
- tempo fermentacji mlekowej,
- zakłócenia procesu fermentacji.

Dotychczas stosowane metody oznaczania kwasu mlekowego w różnych produktach spożywczych, w oparciu o dane literaturowe, można podzielić na dwie grupy: grupę metod fizykochemicznych i grupę metod chromatograficznych.

Do metod fizykochemicznych zalicza się standardową metodę miareczkową, metodę destylacyjną, metody kolorymetryczne, metodę fluorymetryczną oraz metodę enzymatyczną. Metody chromatograficzne wykorzystywane do oznaczania kwasu mlekowego oparte są o techniki chromatografii bibułowej, chromatografii cienkowarstwowej, chromatografii gazowej oraz coraz bardziej rozpowszechnionej w ostatnich latach wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC).

Do niedawna jako standardową metodę oznaczania kwasu mlekowego stosowano metodę miareczkową [1]. Polega ona na zobojętnieniu występujących w próbie kwasów mianowanym roztworem NaOH i przeliczeniu ilości zużytego do miareczkowania ługu na zawartość kwasu mlekowego. Metoda stosowana jest powszechnie w odniesieniu do materiału zakiszanego. Pozwala ona uzyskać wiarygodne wyniki tylko w przypadku typowej homofermentacji, w której kwas mlekowy jest jedynym czynnikiem kształtującym kwasowość. W produktach heterofermentacji, w której obok kwasu mlekowego powstają inne kwasy i związki chemiczne wpływające na kwasowość, wynik metody miareczkowej jest zafałszowany.

Często jako jedyny wskaźnik świadczący o prawidłowości przebiegu fermentacji mlekowej w kiszonkach stosuje się pomiar pH. Uzyskany w ten sposób wynik świadczy również tylko o zmianie kwasowości badanego materiału, a nie o ilości powstałego kwasu mlekowego.

Metodą miareczkową oznaczany jest kwas mlekowy w metodzie destylacyjnej Leppera i Fliega [19] stosowanej dość powszechnie przy charakterystyce zakiszanych pasz zielonych. Oznaczanie to polega na oddestylowaniu z parą wodną kolejno kwasu octowego i masłowego, a następnie utlenieniu pozostałego w próbie kwasu mlekowego do kwasu octowego i oddestylowaniu tej frakcji. Wszystkie uzyskane frakcje są miareczkowane mianowanym roztworem NaOH i na tej podstawie oblicza się obecność poszczególnych kwasów w badanej próbie.

Bardziej selektywne są metody, w których kwas mlekowy przekształcony zostaje do aldehydu octowego pod wpływem stężonego kwasu siarkowego a ten oznaczany jest dalej metodą kolorymetryczną [8, 16]. W przypadku metody Dische-Laszlo [8] tworzy się barwny kompleks aldehydu octowego z roztworem hydrohinonu, zaś w metodzie Pilone i Kunke [16] barwny kompleks aldehydu octowego z dwuhydroksyfenylem. Natężenie zabarwienia otrzymanych kompleksów określa się fotometrycznie.

Druga z wymienionych metod znalazła zastosowanie do oznaczania kwasu mlekowego między innymi w winach.

Fluorymetryczna metoda oznaczania kwasu mlekowego [4] polega na utlenieniu kwasu mlekowego do aldehydu octowego przy użyciu siarczanu cerowego, a następnie utworzeniu kompleksu aldehydu octowego z cykloheksanodionem-1,3, który wykazuje właściwości fluorescencyjne. Metodę tę zastosowano do oznaczania kwasu mlekowego w winach.

Osobną grupę stanowią metody enzymatycznego oznaczania izomerów kwasu mlekowego tj. formy L (+) i D (-), z wykorzystaniem selektywnej dehydrogenazy L- i D- mleczanowej [2, 3, 5, 7, 9, 14, 18, 20]. Metoda ta polega na utlenianiu przez  $\text{NAD}^+$  kwasu mlekowego do pirogronianu, z wytworzeniem NADH. Ilość NADH oznaczona na spektrofotometrze odpowiada stechiometrycznie zawartości kwasu mlekowego przed reakcją. Oznaczanie kwasu mlekowego na tej drodze stosuje się najczęściej przy określaniu aktywności i zdolności fermentacyjnej kultur starterowych homofermentacyjnych bakterii kwasu mlekowego. Metoda znalazła także zastosowanie w przemyśle do oznaczania zawartości kwasu mlekowego w winach, sokach owocowych i warzywnych, w piwie, a także przy produkcji kwasu podczas fermentacji mlekowej mąki żytniej.

#### Stosowane kolumny i elenty / Columns and eluents

Kolumna i temperatura pracy Column and temperature	Eluent i prędkość przepływu Eluent and flow rate	Detektor Detector	Surowiec Material	Źródło informacji Literature
HPX 87 H 65°C	0,01 N $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,7 ml/min.	RI	soki jabłkowe kiszona kapusta	Czerwiecki i Szymczyk (1992)
Aminex A 25 70°C	1,0 N mrówczan sodu 1 ml/min.	RI	soki owocowe kiszona kapusta	Palmer i List (1973)
HPX 87 H 30°C	0,01 N $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0,6 ml/min.	RI	fermentowane sałatki	Bonestroo i wsp. (1992)
Phenomenex ROA 65°C	1,6mM fluoro masłowy 0,7 ml/min.	konduktom. CDM - II	kiszone ogórki	McFeeters (1993)
HPX 87 H 50°C	2 mM kwas siarkowy 0,6 ml/min.	UV	wina	Levi i wsp. (1993)
YMC ODS-AQ 25°C	20mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,7 ml/min	UV	sok pomarańcz.	Lee (1993)

Najnowszą techniką analizy kwasów organicznych jest wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa – HPLC [2, 6, 10, 11, 12, 13, 15, 17]. Skrócenie czasu analizy jednej próbki, wyższa czułość oraz wyeliminowanie etapu tworzenia pochodnych to zalety tej metody. Przeprowadzono wiele badań w celu określenia parametrów rozdzielności kwasów organicznych przy zastosowaniu HPLC. Właściwy dobór warunków analizy zależy przede wszystkim od sposobu oczyszczania prób oraz od parametrów rozdzielności w zależności od typu stosowanej kolumny i detektora (skład fazy ruchomej, szybkość przepływu fazy ruchomej oraz temperatury kolumny). W tabeli zestawiono rodzaje kolumn, stosowane eluenty i detektory do oznaczania kwasu mlekowego w różnych produktach pochodzenia roślinnego. Najczęściej spotykanymi kolumnami są kolumny jonowymienne HPX-87H termostatowane w temperaturze 65°C, zaś fazę ruchomą stanowią słabe roztwory kwasu siarkowego.

### Cel pracy

1. Opracowanie metody ilościowego oznaczania kwasu mlekowego w oparciu o technikę HPLC.
2. Porównanie wyników oznaczeń ilości kwasu mlekowego przy zastosowaniu wybranych metod stosowanych w praktyce laboratoryjnej, w oparciu o określenie dokładności i precyzji tych metod oraz czas ich wykonania.

### Materiał i metody badawcze

Jako materiał do oznaczeń kwasu mlekowego wybrano:

1. Mieszankę standardów wg McFeetersa ( odpowiadającą składem produktom heterofermentacji mlekowej):
  - 4,0 mg/ml kwasu mlekowego (firmy FLUKA),
  - 1,0 mg/ml kwasu octowego (PPH Polskie Odczynniki Chemiczne),
  - 0,5 mg/ml etanolu (firmy Romil Chemicals).
2. Materiał biologiczny – sok z kiszanej kapusty (poddany obróbce termicznej i zamrożony).

Zastosowano następujące metody oznaczania kwasu mlekowego:

- HPLC - wg McFeeters'a [12] w modyfikacji własnej. Zastosowano kolumnę typu Separon SGX C18 wypełnioną octadecylosilanem oraz refraktometr różnicowy RIDK-102: fazę ruchomą stanowił 2% roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$  dla korekty pH do 3,5; przepływ fazy ruchomej 0,2 ml/min; temperatura pracy kolumny 20°C; przesuw taśmy rejestratora 0,3 cm/min; objętość wstrzykiwanej próby 20 µl. W oryginalnej metodzie McFeetersa stosowano kolumnę Radial Pak C18 (Waters Associates) oraz eluent – 0,05M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , którego pH korygowano do wartości 2,5 przy pomocy stężonego  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,

- miareczkowa [1],
- kolorymetryczna [8],
- fluorymetryczna [4],
- enzymatyczna [3].

## Wyniki i dyskusja

Oceny dokładności metod oznaczania kwasu mlekowego dokonano w oparciu o odzysk, a ocenę precyzji na podstawie współczynnika zmienności. Oznaczenia wykonano w mieszaninie wzorcowej w dwudziestu powtórzeniach dla każdej z porównywanych metod.

Tabela 1

Analiza chromatograficzna mieszaniny wzorcowej  
HPLC assay of standard mixture solution  
Separon SGX C<sub>18</sub>, eluent: 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, [pH 3,5]

	Czas retencji Retention time [min.]	Powierzchnia piku (impulsy) (impulses)	Ilość kwasu mlekowego / Amount of lactic acid		
			Użyta do analizy Used in analysis [mg/ml]	Oznaczona w próbce Determined in the sample [mg/ml]	Odzysk R <sub>w</sub> Recovery [%]
Kwas mlekowy Lactic acid	7,33	2826638	4,0	3,96	99,0
	6,88	2775016	4,0	3,89	97,3
	6,76	2736018	4,0	3,84	96,0
	6,86	2769108	4,0	3,88	97,0
	6,88	2773852	4,0	3,89	97,3
	6,95	2815668	4,0	3,95	98,8
Średnia / Average				$\bar{x} = 3,90$	$\bar{x} = 97,6$
Odchylenie standardowe Standard deviation				$s = 0,042$	$S = 1,14$
Współczyn. zmienności Coefficient of variation				$v = 1,06\%$	$V = 1,10\%$

Pierwszą serię oznaczeń chromatograficznych wykonano na mieszaninie wzorcowej (tab. 1). Uzyskane wyniki charakteryzowały się niskim odchyleniem standardowym (S) i niskim współczynnikiem zmienności (V%), co świadczy o małym rozrzucie wyników i dużej precyzji metody. Odzysk w granicach 97–99% wskazuje na dużą

dokładność metody. W tabeli 2 zebrano wyniki analizy chromatograficznej soku z kiszzonej kapusty. W tym przypadku zarówno rozrzut wyników ( $V = 5,7\%$ ), jak i odzysk (śr. 117,8%) świadczyły o pewnych trudnościach przy oznaczaniu kwasu mlekowego w materiale biologicznym. Lee (10) stwierdził na przykład, że technika HPLC może być bardzo atrakcyjna do oznaczania kwasów organicznych ale generalnie nie prowadzi do dobrego rozdziłu wszystkich obecnych w próbce kwasów.

W dalszej części dokonano oceny wszystkich zastosowanych w pracy metod. W tym celu przeprowadzono po 20 oznaczeń każdą z metod (4 serie po 5 oznaczeń). Użytko wyraźnie zróżnicowane wyniki przedstawione w tabeli 3. Porównanie dokładności i precyzji testowanych metod obrazuje rysunek 1, przedstawiający rozrzut wyników dwudziestu równoległych oznaczeń, wykonanych każdą z metod. Otrzymane wyniki wskazują na istotne różnice pomiędzy poszczególnymi metodami w odniesieniu do ich selektywności, dokładności i precyzji. Dlatego też w toku dalszej pracy zrezygnowano ze stosowania metody kolorymetrycznej z uwagi na fakt, że daje ona wyniki znacznie zawyżone i bardzo mało powtarzalne, co ogranicza jej przydatność analityczną. Także metoda miareczkowa, z uwagi na jej brak specyficzności, może znaleźć zastosowanie jedynie do oznaczania kwasu mlekowego w produktach typowej homofermentacji.

Tabela 2

Analiza chromatograficzna soku z kiszzonej kapusty.

HPLC assay of sauerkraut juice.

Separon SGX C<sub>18</sub>, eluent: 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, [pH 3,5]

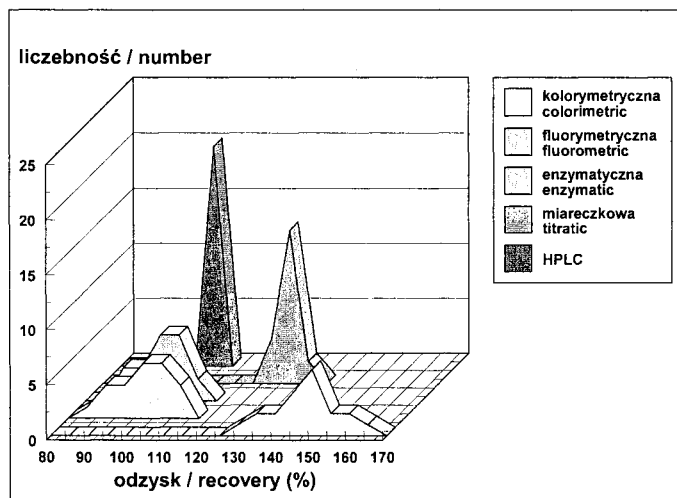
	Czas retencji Retention time [min.]	Powierzchnia piku (impulsy) (impulses)	Ilość kwasu mlekowego			Odzysk R <sub>w</sub> Recovery [%]
			Oznaczona w próbce Determined in the sample [mg/ml]	Dodanego Added [mg/ml]	Qznaczona w próbce wzmocnionej Determined in fortified sample [mg/ml]	
Kwas mlekowy / Lactic acid	7,26	2032980	14,25	5,0	19,78	110,2
	6,95	2082832	14,61	5,0	19,45	96,8
	6,90	1840674	12,90	2,0	15,58	134,0
	6,94	1971800	13,83	2,0	16,67	142,0
	6,64	2186152	15,33	2,0	17,45	106,0
Średnia / Average			$\bar{x} = 14,18$			$\bar{x} = 117,8$
Odchylenie standardowe / Standard deviation			$s = 0,8$			$s = 19,27$
Współczynnik zmienności / Coefficient of variation			$v = 5,7\%$			$v = 16,4\%$

W oparciu o uzyskane wyniki do dalszych prac nad oznaczaniem kwasu mlekowego wybrano metodę HPLC, metodę fluorymetryczną oraz enzymatyczną i zastosowano je do oznaczania zawartości kwasu mlekowego w soku z kiszzonej kapusty (tabela 4). Dokładność metod wynosiła: metody opartej o techniki HPLC –  $117 \pm 19\%$ , metody fluorymetrycznej  $91 \pm 12\%$ , metody enzymatycznej  $89 \pm 10\%$  – kwas L(+) oraz  $94 \pm 17\%$  – kwas D(-). Dwie z wymienionych metod (HPLC i fluorymetryczna) można wykorzystać do oznaczeń rutynowych, pod warunkiem dysponowania odpowiednim sprzętem [4, 12, 17]. Zastosowanie techniki HPLC do oznaczania kwasu mlekowego pozwala uzyskiwać w miarę dokładne i powtarzalne wyniki oraz daje możliwość jednoczesnego ilościowego oznaczania pozostałych produktów fermentacji mlekowej [10, 12, 13]. Metoda enzymatyczna może być polecana wyłącznie jako metoda badawcza przy określaniu form izomerycznych kwasu mlekowego [9, 18]. Pozwala ona na oznaczanie ilości izomerów L(+) i D(-) kwasu mlekowego w krótkim czasie, z dużą dokładnością i precyzją. Jest jednak metodą kosztowną i dlatego rzadko stosowaną do oznaczeń seryjnych.

Tabela 3

Ocena porównawcza metod oznaczania kwasu mlekowego.  
Comparison of lactic acid tested methods.

Metoda / Method	Mieszczina wzorcowa / Standard mixture				
	Ilość kwasu mlekowego / Amount of lactic acid (mg/ml)		Odzysk Recovery (%)	Współczynnik zmienności Coefficient of variation (%)	Czas wykonania 10 analiz (min.)
	użyta do analizy used in analysis	oznaczona metodą determined			
HPLC	4,0	$3,96 \pm 0,04$	$97,3 \pm 1,03$	1,1	360
Fluorymetryczna Fluorometric	4,0	$4,07 \pm 0,36$	$102 \pm 9,02$	8,8	240
Enzymatyczna Enzymatic	4,0	$4,31 \pm 0,30$	$107 \pm 7,40$	6,9	630
Kolorymetryczna Calorimetric	4,0	$6,10 \pm 1,22$	$152 \pm 30$	20,0	60
Miareczkowa Titritic	4,0	$5,24 \pm 0,22$	$131 \pm 5,50$	4,2	30



Rys.1. Ocena dokładności i precyzji testowanych metod.

Fig. 1. Accuracy and precision of compared methods.

Tabela 4

Oznaczenie kwasu mlekowego wybranymi metodami.

Lactic acid determination with different methods.

Metoda / Method	Ekstrakt z kiszanej kapusty / Sauerkraut juice													
	Ilość kwasu mlekowego / Amount of lactic acid (mg/ml)				Odzysk / Recovery (%)		Współczynnik zmienności / Coefficient of variation (%)							
	oznaczona w próbce / determined in sample		dodana do próbki / added to sample											
		oznaczona w próbce wzmocnionej / determined in fortified sample												
HPLC	14,2 ± 0,8		2,0		16,6		117 ± 19		16,0					
Fluorymetryczna / Fluorometric	15,4 ± 0,4		2,0		17,2		91 ± 12		13,5					
Enzymatyczna / Enzymatic	8,2 ± 0,1 L(+)		5,8 ± 0,2 D(-)		-		89 ± 10		94 ± 17		11,2		18,1	



## Wnioski

1. Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice dokładności i precyzji poszczególnych metod oznaczania kwasu mlekowego.
2. Z pięciu porównywanych metod trzy – HPLC, fluorymetryczna i enzymatyczna – charakteryzowały się właściwym odzyskiem i współczynnikiem zmienności.
3. Zastosowanie techniki HPLC i metody fluorymetrycznej pozwala uzyskiwać dokładne i powtarzalne wyniki w badaniach rutynowych, metoda enzymatyczna może być polecana raczej do celów badawczych przy określaniu form izomerycznych kwasu mlekowego.

## LITERATURA

- [1] Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 1975. 12th ed.: AOAC, Washington D.C.
- [2] Bonestroo M.H., Kusters B.J.M., de Wit J.C., Rombouts F.M.: Glucose and sucrose fermenting capacity of homofermentative lactic acid bacteria used as starters in fermented salads. *International Journal of Food Microbiology*, **15**, 1992, 365.
- [3] Boehringer Mannheim GMBH. UV-method for the determination of L(+) and D(-) lactic acid. Biochemica 1989 (enzymatic assay kit),
- [4] Burini G.: Indirect fluorometric determination of lactic acid in wine. *Journal of AOAC International* **76** (5), 1993, 1017.
- [5] Coutman I., Waklefeld A.W.: L<sup>+</sup> lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, H.U. (ed) *Methods of enzymatic analysis*, **3**, 1974, 1464. New York, NY: Academic Press.
- [6] Czerwiecki L., Szymczyk K.: Próba zastosowania techniki HPLC do oznaczania kwasu mlekowego w sokach jabłkowych i fermentowanych sokach warzywnych. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, **46**, 1992, 33.
- [7] Grönman S., Möttönen K.: Production of acids in rye flour baking. *Proceedings from 7th World Cereal and Bread Congress*, 1982, Prague.
- [8] Homolka J.: Diagnostyka biochemiczna. PZWL, Warszawa, 1960.
- [9] Jehanno D., Thuault D., Bourgeois C.M.: Development of a method for detection of lactic acid bacteria producing exclusively the L(+) - isomer of lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (12), 1992, 4064.
- [10] Lee H.S.: HPLC method for separation and determination of nonvolatile organic acids in orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 1991.
- [11] Levi V., Wehr T., Talmadge K., Zhu M.: Analysis of organic acids in wines by capillary electrophoresis and HPLC. *International Chromatography Laboratory*, **15**, 1993, 4.
- [12] McFeeters R.F., Thompson R.L., Fleming H.P.: Liquid Chromatographic analysis of sugars, acids and ethanol in lactic acid vegetable fermentations. *J. Assoc. of Anal. Chem.*, **67**, 1984, 710.
- [13] McFeeters R.F.: Single-Injection HPLC analysis of acids, sugars, and alcohols in cucumber fermentations. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 1439.

- [14] Möhler K., Looser S.: Enzymatische Bestimmung von Säuren in Wein. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **140**, 1968, 94.
- [15] Ohara H., Hiraga T., Katasho I., Inuta T., Yshida T.: HPLC monitoring system for lactic acid fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **75** (6), 1993, 470.
- [16] Pilone D., Kunkee R.: The colorimetric determination of lactic acid in wine. *Amer. J. Enol Viticult.* **21**, 1971, 12.
- [17] Palmer K.J., List D.M. Determination of organic acids in foods by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **21** (5), 1973, 903.
- [18] Postel W., Drawert F., Hagen W.: Enzymatische Untersuchungen über den Gehalt an L(+) und D(-) Lactat in Weinen. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **150**, 1973, 267.
- [19] Skulmowski J.: *Metody określania składu pasz i ich jakości*. PWRiL, Warszawa, 1974.
- [20] Tsai S.P., Coleman R.D., Moon S.H., Schneider K.A., Sanville Millard C.: Strain screening and development for industrial lactic acid fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **39/40**, 1993, 323.

## DETERMINATION OF LACTIC ACID IN PLANT MATERIAL

### S u m m a r y

HPLC method for determination of lactic acid in presence of other organic acids was elaborated and compared to the other methods. This method was compared to titratic, colorimetric, fluorometric and enzymatic procedures according to their specificity, accuracy and precision. ☒