

Identifikácia a stanovenie organických kyselín vo víne izotachoforézou

JÁN FARKAŠ — MARIAN KOVAL — JOZEF POLONSKÝ

Súhrn. V práci sa použila metóda kapilárnej izotachoforézy na sledovanie obsahu jednotlivých kyselín vo víne. V priebehu 15 min možno súčasne jednou analýzou stanoviť 14 najčastejšie sa vyskytujúcich kyselín vo víne. Sledovalo sa 5 hlavných kyselín počas kvasenia muštu a vytvárania vína. Výhodou izotachoforézy je rýchlosť a dostatočná presnosť stanovenia kyselín vo víne; preto je vhodná na sledovanie fyzikálnochemických zmien a biochemických procesov pri vytváraní vína. Jej prednosťou je, že sa môže využiť aj pre sériové analýzy.

Pri sledovaní a kontrole kvality vína majú veľkú úlohu analytické metódy. Sú to najmä moderné fyzikálnochemické metódy, ktoré umožňujú rýchlejšiu a presnejšiu analýzu vína, na základe čoho sa usmerňujú procesy vývoja a ošetrovania vína.

V oblasti fyzikálnochemických analytických metód si vzhľadom na svoje možnosti, najmä pri separácii aniónov kyselín, zasluhuje osobitnú pozornosť kapilárna izotachoforéza. Táto nová elektroforetická technika sa začala rozvíjať najmä v sedemdesiatych rokoch. V tomto období bolo zostrojených niekoľko typov prístrojov [1, 2], z ktorých niektoré sú i komerčne prístupné, napr. firma LKB Bromma (Švédsko) a Shimadzu (Japonsko). Roku 1982 sa vyrobila i prvá prototypová séria prístroja pre túto techniku so spájanými kolónami v Ústave rádioekológie a využitia jadrovej techniky v Košiciach.

Z analytického hľadiska je veľmi ťažké stanoviť spoľahlivého ukazovateľa kyslosti vína. Hodnotenie kyslosti vína sa obmedzuje najmä na stanovenie titrovateľných kyselín, prípadne hodnoty pH. Tieto metódy nedávajú dostatočnú informáciu, preto sa dopĺňajú senzorickým hodnotením. Súčasná kvalitatívna a kvantitatívna analýza kyselín v zmesiach je doteraz problémom i v zmesiach omnoho jednoduchších, ako je víno. Komplexné analýzy kyselín vo víne sa robia iba zriedkavo. Dôvod možno vidieť v značnej časovej i experimentálnej náročnosti jednotlivých stanovení. Tieto sa zakladajú na chromatografických, enzymatických, príp. niektorých klasických

Doc. Ing. Ján Farkaš, CSc., RNDr. Marian Koval, Komplexný Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, 900 01 Modra.

Ing. Jozef Polonský, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava.

postupoch [14]. Medzi hlavné sledované zložky patrí kyselina vínna, jablčná, mliečna a octová.

Na stanovenie kyseliny vínnej bolo navrhnutých niekoľko postupov [3]. Najčastejšie sa používa pomerne rýchle kolorimetrické stanovenie [4], príp. zrážanie vo forme vínanu vápenatého [3]. Na stanovenie kyseliny jablčnej sa odporúčajú predovšetkým enzymatické postupy, príp. použitie ionexov na predseparáciu a následné kolorimetrické vyhodnotenie. Obidva postupy zahŕňajú empirické faktory [3]. Podobne sa predseparáciou ionexov stanovuje kyselina mliečna. Príslušná frakcia eluátu sa oxiduje na acetaldehyd, ktorý poskytuje farebnú reakciu [5]. Kyselina octová sa stanovuje v sume prchavých kyselín po destilácii vína vodnou parou. Pri vysokých obsahoch SO_2 a kyseliny mliečnej je potrebná korekcia výsledkov.

V ostatných rokoch problém stanovenia kyselín uspokojujúco vyriešila kapilárna izotachoforéza. Táto technika sa vyznačuje vysokou separačnou schopnosťou, rýchlosťou a presnosťou stanovenia, preto je vhodná na sledovanie fyzikálnochemických zmien a biochemických procesov, ktoré prebiehajú pri vytváraní vína. Na možnosti využitia kapilárnej izotachoforézy vo vinárskej technológii pri sledovaní kyselín, kationov a aminokyselín poukázali Farkaš a Polonský (1978), Bičar (1978), Sudraud a Chauvet (1979) a Kaiser a Hupf (1979).

Experimentálna časť

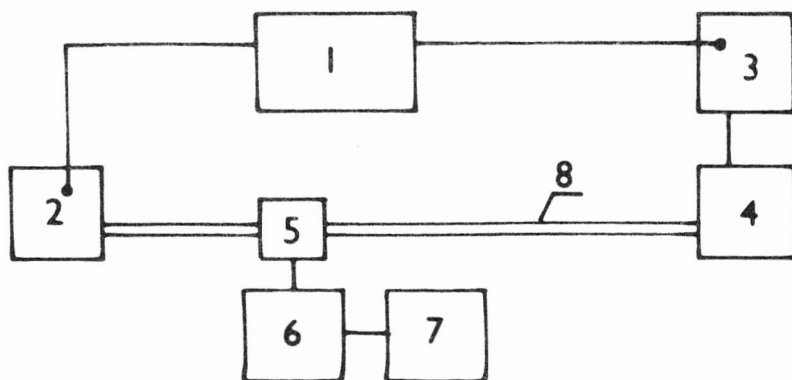
Meranie sme uskutočnili v KVÚVV, Modra, na prístroji zhotovenom na Chemickom ústave UK v Bratislave [10]. Bloková schéma použitého prístroja je na obrázku 1. Kapilára vnútorného priemeru 0,35 mm, dĺžky $l = 25$ cm z materiálu FEP je vybavená vodivostným detektorom.

Zdroj prúdu [11] umožňuje stabilizovať prúd v rozmedzí 0—500 μA (s presnosťou 0,01 % rel.), s napäťovým rozsahom 0—20 kV. Separáčna jednotka je podobná opísanej v [1]. Vzorka sa dávkovala mikrostriekačkou.

Pri stanovení jednotlivých kyselín vo víne sme vyskúšali separáciu v týchto systémoch:

1. 0,01 M HCl + histidín, pH 6,0,
2. 0,01 M HCl + BISTRIS propán, pH 6,0
3. 0,01 M HCl + kreatinín, pH 5,0
4. 0,01 M HCl + β -alanín, pH 4,0
5. 0,01 M HCl + β -alanín, pH 3,0.

Ako zakončujúci elektrolyt sa použila $5 \cdot 10^{-3}$ M kyselina kaprylová upravená TRISom na pH 8,0. Ako aditívum do vodiaceho elektrolytu sa pridal Mowiol (polyvinylalkohol) v koncentrácii 0,2 %. Kyselina chlorovodíková sa čistila izotermickou destiláciou, kyselina kaprylová viacnásobnou extrakciou s vodou, BISTRIS propán (firma Sigma, NSR) prechodom cez kolónu anexu, histidín (firma Reanal, Maďarsko), β -alanín, kreatinín a TRIS (firma Lachema, Brno) rekryštalizáciou v etanole.



Obr. 1. Bloková schéma zariadenia pre kapilarnu izotachoforézu. 1 — zdroj prúdu, 2, 3 — rezervoár vodiaceho, resp. zakončujúceho elektrolytu, 4 — dávkovacie zariadenie, 5 — detektor, 6 — vyhodnocovacie zariadenie, 7 — registračné zariadenie, 8 — kapilára.

Fig. 1. A block scheme for capillary isotachopheresis equipment. 1 — power supply, 2, 3 — reservoir of leading or terminating electrolyte, 4 — dosing equipment, 5 — detector, 6 — evaluating equipment, 7 — recording equipment, 8 — capillary.

Výsledky a diskusia

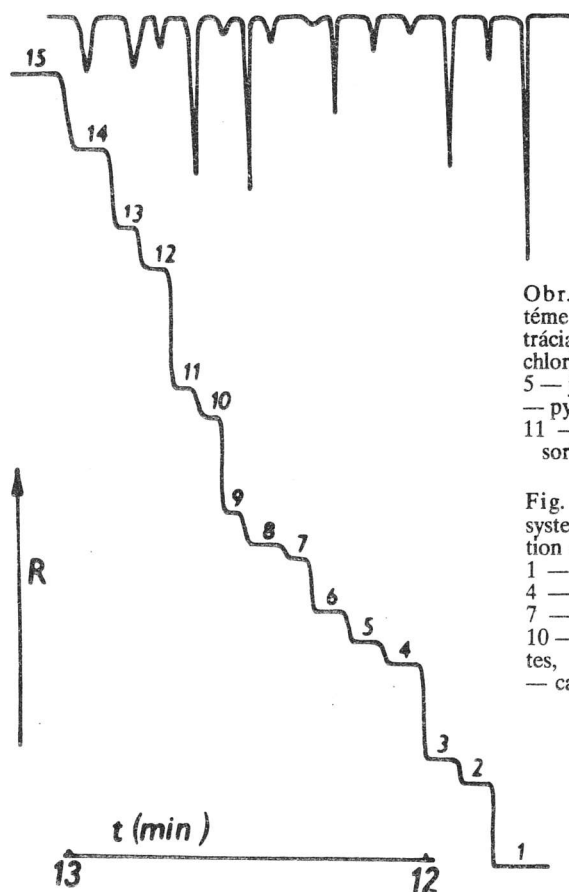
V prvej fáze sme sa snažili o najoptimálnejšiu separáciu hlavných sledovaných zložiek: síranov, vínanov, jablčnanov, mliečnanov, octanov, jantáranov a citrónanov v závislosti od ich pK hodnôt, resp. od pH vodiaceho elektrolytu. Uspokojujúce výsledky sme dosiahli v systéme 5 pri pH 3,0. Pretože čas analýzy za týchto podmienok bol pomerne dlhý (asi 21 min), snažili sme sa nájsť systém, v ktorom by bol čas analýzy kratší. Podarilo sa to za podmienok v systéme 2. Obrázok 2 ukazuje záznam modelovej zmesi kyselín za týchto podmienok. Pri sledovaní obsahu kyselín sme použili obidva systémy. Na zvýšenie pohyblivosti kyseliny jablčnej a citrónovej, ktoré sú pri pH 6,0 veľmi blízke, sme využili zvýšený náboj protiiónu, v našom konkrétnom prípade BISTRIS propánu — náboj 2^+ [12].

Pri ďalších pokusoch sme sledovali zmeny obsahu kyselín v priebehu kvasného procesu v hroznovom mušte a víne.

Zmeny obsahu jednotlivých kyselín pri vývoji vína sledované izotachforeticky vyplývajú zo záznamov na obrázkoch 3—5 a tabuľky 1.

Na obrázku 3 je izotachforeogram najdôležitejších kyselín v mušte. Zo záznamu na obrázku 4 a tabuľke 1 vidieť, že po prekvasení muštu sa znížil obsah kyseliny vínnej vyžrážaním vínanov, ako aj obsah kyseliny jablčnej, z časti ktorej vznikla kyselina mliečna. Pri ďalšom vývoji vína sa podstatne znížil obsah kyseliny vínnej a kyseliny jablčnej (obr. 5) a nepatrne stúpol obsah kyseliny mliečnej. Obsah kyseliny jantárovej sa už nemenil.

Znižovanie obsahu kyseliny vínnej a kyseliny jablčnej súvisí s vývojom vína.



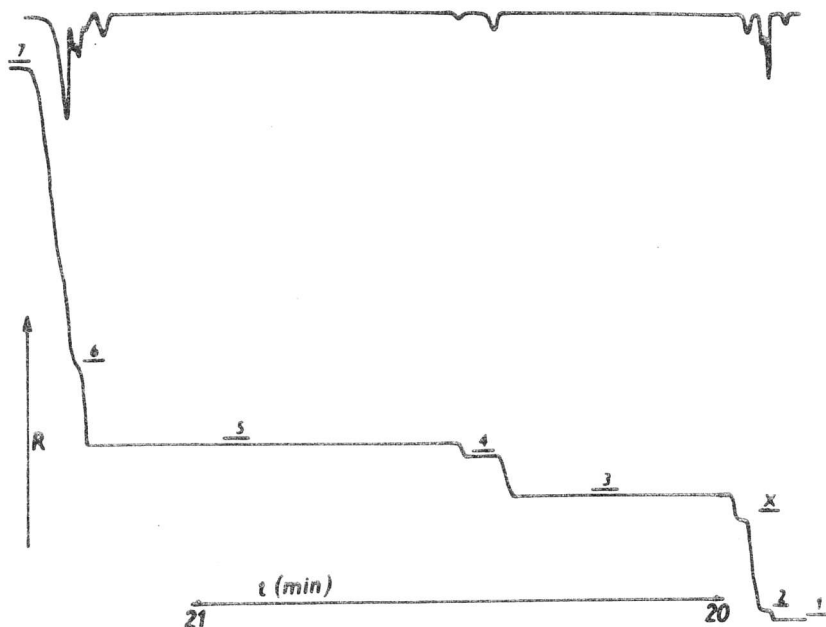
Obr. 2. Záznam modelovej zmesi kyselín v systéme č. 2. Injektované množstvo 1 μ l, koncentrácia asi 10^{-3} , prúd 40 μ A, R — odpor. 1 — chloridy, 2 — sírany, 3 — šťaveľany, 4 — vínany, 5 — jablčnany, 6 — jantárany, 7 — citrónany, 8 — pyrohroznany, 9 — octany, 10 — mliečnany, 11 — fosforečnany, 12 — asparagáty, 13 — sorbany, 14 — askorbany, 15 — kaprylany.

Fig. 2. A record of acid model mixture in the system No. 2. Injected amount 1 μ l, concentration ca. 10^{-3} , current 40 μ A, R — resistance. 1 — chlorides, 2 — sulphates, 3 — oxalates, 4 — tartrates, 5 — malates, 6 — succinates, 7 — citrates, 8 — pyruvates, 9 — acetates, 10 — lactates, 11 — phosphates, 12 — aspartates, 13 — sorbates, 14 — ascorbates, 15 — capriles.

Tabuľka 1. Zmeny v obsahu kyselín pri vývoji vína sledovaných izotachoforézou

Table 1. Changes in acid content during wine fermentation followed by means of isotachopheresis

Označenie vzorky Dátum analýzy	Obsah kyselín stanovený izotachoforézou [g.l ⁻¹]					Titrovateľné kyseliny [g.l ⁻¹]
	Kyselina vínna	Kyselina jablčná	Kyselina citrónová	Kyselina jantárová	Kyselina mliečna	
Mušt Rizling vlašský 24. 10. 1980	5,48	8,67	0,92	0,2	—	12,4
Víno Rizling vlašský 31. 10. 1980	4,97	6,50	0,94	0,77	0,35	
Víno Rizling vlašský 25. 11. 1980	3,50	5,97	1,09	0,75	0,40	10,8



Obr. 3. Záznam analýzy muštu Rizling vlašský v systéme č. 5. Injektované množstvo 2 μ l, riedenie 1 : 25, prúd 40 μ A, R — odpor. 1 — chloridy, 2 — sírany, 3 — vínany, 4 — citrónany, 5 — jablčnany, 6 — mliečnany, 7 — kaprylany, X — neidentifikovaná zóna.

Fig. 3. A record of analysis of Rizling vlašský must in the system No. 5. Injected amount 2 μ l, dilution 1 : 25, current 40 μ A, R — resistance. 1 — chlorides, 2 — sulphates, 3 — tartrates, 4 — citrates, 5 — malates, 6 — lactates, 7 — caprilates, X — unidentified zone.

Kyselina vínna sa vyzráža vo forme vínanov v dôsledku ich menšej rozpustnosti v prítomnosti alkoholu.

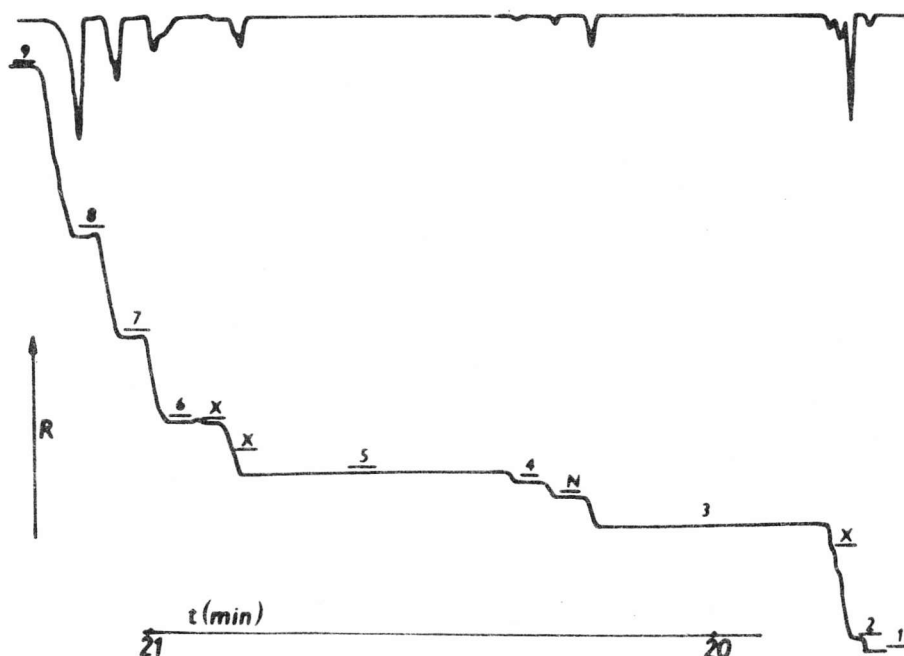
Kyselina jablčná sa znižuje vo víne účinkom mliečnych baktérií, pričom sa tvorí kyselina mliečna a vedľajšie produkty, ako prchavé kyseliny, 2,3-butándiol a iné [13]. Účinkom *Schizosaccharomyces pombe* vzniká z kyseliny jablčnej vo víne etanol.

Pri nadmernom obsahu kyselín vo víne sa ich odbúravanie podporuje, naproti tomu pri nízkom obsahu kyselín sa odbúravaniu zabraňuje.

Tabuľka 2 uvádza obsah najdôležitejších kyselín v rôznych druhoch vína pri stanovení izotachoforézou.

Pri porovnaní výsledkov stanovenia kyselín vo víne izotachoforézou a titračne je obsah kyselín vo víne stanovený pomocou izotachoforézy vždy vyšší, pretože sa stanovuje suma aniónov kyselín.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že aplikáciou izotachoforézy pri sledovaní obsahu kyselín pri vývoji vína možno lepšie sledovať procesy vytvárania vína a podľa potreby správne do nich zasahovať.

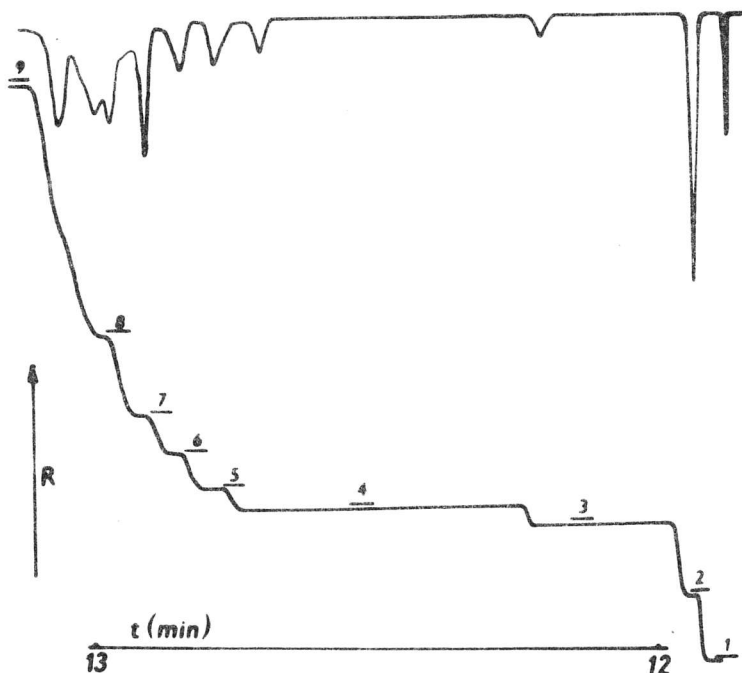


Obr. 4. Záznam analýzy vína Rizling vlašský v systéme č. 5. Injektované množstvo 2 μ l, riedenie 1:25, prúd 40 μ A, R — odpor. 1 — chloridy, 2 — sírany, 3 — vínany, 4 — citrónany, 5 — jablčnany, 6 — mliečnany, 7 — jantárany, 8 — octany, 9 — kaprylany, X — neidentifikované zóny.

Fig. 4. A record of analysis of Rizling vlašský wine in the system No. 5. Injected amount 2 μ l, dilution 1:25, current 40 μ A, R — resistance. 1 — chlorides, 2 — sulphates, 3 — tartrates, 4 — citrates, 5 — malates, 6 — lactates, 7 — succinates, 8 — acetates, 9 — caprilates, X — unidentified zones.

Tabuľka 2. Obsah najdôležitejších kyselín v rôznych druhoch vína
Table 2. The content of the most important acids in various wine sorts

Druh vína a pôvod	Obsah kyselín stanovených izotachoforézou [g.l ⁻¹]				Titrovateľné kyseliny [g.l ⁻¹]
	Kyselina vínna	Kyselina jablčná	Kyselina mliečna	Σ	
Veltlín zelený 1979					
JRD Modra	1,93	0,5	2,45	4,9	4,2
Veltlín zelený 1979	1,98	0,55	2,55	5,1	4,6
Muskát otonel 1979					
JRD Modra	1,68	2,57	0,70	4,95	3,9
Tramín 1979					
JRD Šenkvice	1,32	2,85	1,15	5,32	4,3
Rizling rýnsky 1979					
JRD Mojmirovce	3,60	6,10	0,3	9,7	8,6
Veltlín červený 1979					
JRD Rača	1,48	0,17	4,84	6,49	4,9
Veltlín červený 1979					
JRD Rača	1,35	0,30	4,95	6,60	4,8
Sauvignon 1980					
JRD Rača	1,85	6,6	0,75	9,2	8,9



Obr. 5. Záznam analýzy vína Rizling vlašský v systéme č. 2. Injektované množstvo 2 μ l, riedenie 1:25, prúd 40 μ A, R — odpor. 1 — chloridy, 2 — sírany, 3 — vínany, 4 — jablčnany, 5 — jantárany, 6 — citrónany, 7 — octany, 8 — mliečnany, 9 — kaprylany.

Fig. 5. A record of analysis of Ryzling vlašský wine in the system No. 2. Injected amount 2 μ l, dilution 1:25, current 40 μ A, R — resistance. 1 — chlorides, 2 — sulphates, 3 — tartrates, 4 — malates, 5 — succinates, 6 — citrates, 7 — acetates, 8 — lactates, 9 — caprilates

Výhodou izotachofórey je rýchlosť a dostatočná presnosť, pretože za asi 15 min sa jednou analýzou kvantitatívne stanoví obsah jednotlivých kyselín vo víne.

Z týchto dôvodov je izotachofórea vhodná aj na sériové analýzy pre veľkovýrobu.

Literatúra

1. EVERAERTS, F. M. — BECKERS, J. L. — VERHEGGEN, Th. P. E. M.: Izotachophoresis. Amsterdam—Oxford—New York, Elsevier 1976.
2. BOČEK, P. — DEML, M. — JANÁK, J.: J. Chromatogr., 106, 1975, s. 1.
3. AMERINE, M. A. — OUGH, C. S.: Methods for Analysis of Musts and Wines. New York—Chichester—Brisbane—Toronto, J. Wiley and Sons 1980.
4. HILL, G. — CAPUTI, A.: Amer. J. Enol. Vitic., 21, 1970, s. 153.
5. Recueil des méthodes internationales d'analyses des vins. 4. vyd. Paris, OIV 1978.
6. FARKAŠ, J. — POLONSKÝ, J.: Zborník z konferencie Progresívne metódy vo vinárskej technológii, Vysoké Tatry, 1978.
7. BIČAR, L.: Možnosti využitia novších analytických metód najmä izotachofórey vo vinárstve. Diplomová práca. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1978.

8. SUDRAUD, P. — CHAUVET, S.: Rapport des activités de recherches. Université de Bordeaux II, 1979—1980.
9. KAISER, K. — HUPF, H.: Dtsch. Lebensm.-Rdsch., 75, 1979, s. 346.
10. STANKOVIANSKY, S. — KANIANSKÝ, D. — KOVAL, M.: Czechoslov. patent 190 933.
11. STANKOVIANSKY, S. a spol.: Výskumná správa ČHÚ UK. Bratislava, 1980.
12. KANIANSKÝ, D. — MADAJOVÁ, V. — ZELENSKÝ, I. — STANKOVIANSKY, S.: J. Chromatogr.
13. FARKAŠ, J.: Technológia a biochémia vína. Praha, SNTL 1980.
14. PRÍBELA, A.: Analýza prírodných látok v požívatinách. Bratislava, Alfa 1978. 432 s.

Определение вида и количества органических кислот в вине путем изотахофореза

Резюме

В работе использован метод капиллярного изотахофореза для наблюдения за содержанием отдельных кислот в вине. В течение 15-ти минут можно одновременно одним анализом установить 14 наиболее часто встречающихся кислот в вине. Наблюдались 5 главных кислот в процессе брожения сока и образования вина. Преимуществом изотахофореза является скорость и достаточная точность определения кислот в вине; поэтому он пригоден для наблюдения за физико-химическими изменениями и биохимическими процессами при образовании вина. Метод можно использовать и для серийных анализов.

Acid determination in wine by means of isotachopheresis

Summary

The present work deals with a method of capillary isotachopheresis for content determination of separate acids in wine. This method enables by means of one analysis the 14 in wine most frequently occurring acids to be determined simultaneously — and this within 15 minutes. The 5 most important acids were subjected to investigation in the course of must fermentation and wine production. Advantage of isotachopheresis is the short time and adequate precision of acids' determination in wine; for these reasons it is suitable for investigating physical and chemical changes as well as bio-chemical processes during wine production. Its applicability in the serial analysis is also of great significance.