

Využitie izotachofórey na stanovenie látok viažúcich oxid siričitý vo víne

Ing. JOZEF KOVÁČ, CSc., Doc. Ing. JÁN FARKAŠ, CSc. — Výskumný ústav potravinársky, Biotechnologické centrum MODRA, pracovisko Biotechnológie nápojov;

RNDr. MICHAL SVOBODA, CSc. — Výskumný ústav liečiv, MODRA.

Kľúčové slová: oxid siričitý, formy a účinok oxidu siričitého, izotachofórea, látky viažúce oxid siričitý vo víne

ÚVOD

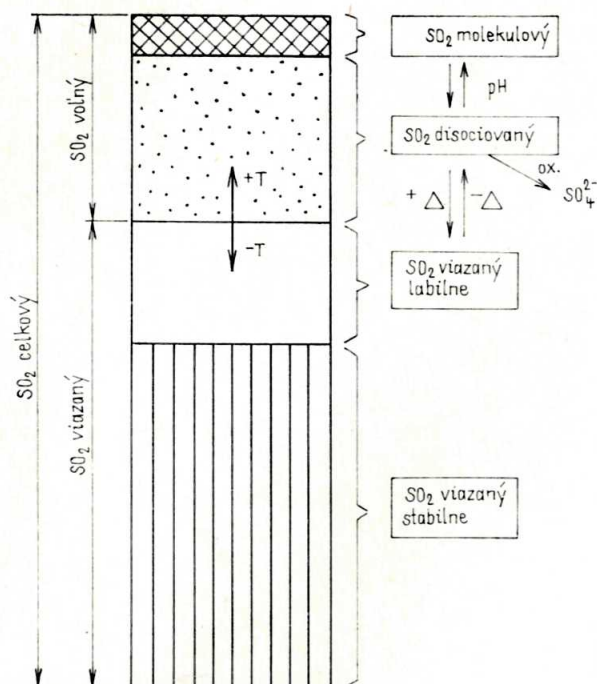
Oxid siričitý je v súčasnom období z hľadiska technológie výroby vína nenahraditeľný prostriedok, ktorý zabezpečuje fyzikálno-chemickú a mikrobiologickú stabilitu, t.j. trvanlivosť vinárskych produktov. Napriek množstevnému účinku SO_2 v muštach a vínach je však zo zdravotného hľadiska oprávnená požiadavka na zníženie jeho obsahu vo víne ako požívatine [1]. Vyhovieť tejto požiadavke možno len racionálnou aplikáciou oxidu siričitého a cielavedomou technológiou výroby vína. Najdôležitejšou úlohou vinárskeho technológa v procese výroby vína, pokiaľ ide o znižovanie celkového obsahu SO_2 vo vínach, je zabezpečiť vo víne minimálny obsah látok, ktoré oxid siričitý adične viažu, a tým ho prakticky inaktivujú.

Väzba oxidu siričitého vo víne

Z určitej dávky oxidu siričitého pridaného do vína zostáva len časť vo forme **voľného SO_2** ; ďalšia časť sa viaže na rôzne látky, prítomné vo víne. Prehľad a rozdelenie foriem SO_2 vo víne je vidieť na obrázku 1. Z hľadiska **antimikrobiálneho** účinku najdôležitejšia je časť molekulového SO_2 , ovplyvnená najmä hodnotou pH vína, ktorá je v rovnováhe s disociovanou časťou vo forme HSO_3^- a SO_3^{2-} . Spolu tvoria frakciu voľného SO_2 . Táto je zodpovedná za celkový **redukčný, antioxidačný, protienzymový** a **antimikrobiálny** účinok aplikovaného SO_2 a spolupôsobí pri vytváraní dobrého zdravotného stavu vína, jeho sviežosti, farby a celkového sensorického dojmu. Určitá časť voľného SO_2 sa stráca nevratnou chemickou oxidáciou na sírany. Frakcia **viazaného SO_2** je z hľadiska vyššie spomínaných účinkov prakticky inaktívna. Podiel labilne viazaného SO_2 vzniká zlúčením voľného SO_2 s látkami, ktoré vytvárajú vratné adičné zlúčeniny (napr. väzbou SO_2 na kyselinu pyrohroznovú, antokyány a pod.) a za určitých podmienok je schopná SO_2 z väzby uvoľniť. K uvoľneniu SO_2 z väzby dochádza účinkom zvýšenej teploty, ako aj v dôsledku poklesu obsahu voľného SO_2 . Časť SO_2 , tvorená stabilne viazaným oxidom siričitým, vzniká v dôsledku pevných nevratných adičných väzieb SO_2 , hlavne s acetaldehydom. Táto časť SO_2 tvorí akýsi „balast“, nemá žiaduci efekt

vo víne a jej podiel na celkovom obsahu SO_2 je snaha znížiť [2].

Hlavnými zložkami vína, ktoré účinne viažu SO_2 , sú produkty metabolizmu kvasiniek, najmä acetaldehyd, kyselina pyrohroznová a kyselina 2-oxoglutarová. Acetaldehyd a kyselina pyrohroznová sú bezprostredné produkty glykolýzy; kyselina 2-oxoglutarová je medziprodukt trikarboxylového cyklu a produkt deaminácie kyseliny glutámovej.

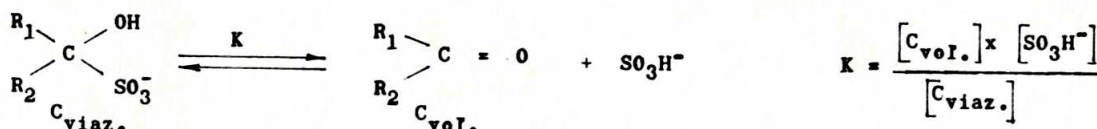


Δ = zmena SO_2 voľného

Obr. 1. Rozdelenie foriem SO_2 v muštach a vínach

Tabuľka 1. Väzby SO₂ s rôznymi zložkami muštu a vína [3]

Zlúčenina	K /pri 20 °C a pH 3,3/	Percento molekúl zlúčených s HSO ₃ ⁻	
		25 mg.l ⁻¹ SO ₂ voľného	50 mg.l ⁻¹ SO ₂ voľného
Acetaldehyd	1,5.10 ⁻⁶	>99,5	>99,5
Kyselina pyrohroznová	3.10 ⁻⁴	57	72
Kyselina 2-oxoglutárová	5.10 ⁻⁴	44	61
Kyselina glyoxylová	8.10 ⁻⁶	99	99
Kyselina oxáloctová	2.10 ⁻⁴	66	80
Kyselina D-glukuronová	5.10 ⁻²	1	2
Kyselina D-galakturonová	1,7.10 ⁻²	2	4
Kyselina 2,5-dioxoglukónová	4,3.10 ⁻⁴	48	65
D-glukóza	0,9	< 0,1	< 0,1
D-fruktóza	15	< 0,1	< 0,1
Arabinóza	0,04	1	2
5-oxofruktóza	3,3.10 ⁻⁴	54	70
Malvidín-3-glukozid	6.10 ⁻⁵	87	93



Tabuľka 1 poskytuje prehľad o väzbovosti SO₂ na jednotlivé zložky muštov a vín, s vyjadrením sily väzby „SO₂ — látka“ tzv. konštantou rozkladu [3]. Z hodnôt v tabuľke je vidieť, že významnú väzbovosť s SO₂, okrem spomenutých medziproduktov kvasenia, vykazuje kyselina glyoxylová a kyselina oxáloctová. Oxidačné produkty glukózy a fruktózy — kyselina 2,5-dioxoglukónová a 5-oxofruktóza — ako sa dokázalo [4], sú produktami činnosti octových baktérií, ktorá v štandardných podmienkach výroby vína býva potlačená. Malvidín-3-glukozid, ako zložka farebných fenolových zlúčenín, sa nachádza predovšetkým v červených vínach, kde však vytvára s SO₂ len vratné adičné zlúčeniny. Monosacharidy (glukóza, fruktóza, arabinóza atď.) majú iba slabú tendenciu zlučovať sa s SO₂. Ich zlúčeniny s HSO₃⁻ sú len formou prechodu do rovnováhy s cyklickými formami (furanóza, pyranóza).

Stanovenie látok viažúcich oxid siričitý

Existujú metódy stanovenia jednotlivých látok viažúcich SO₂ [5], ktoré sú prevažne enzýmové, a sú práce a zdĺhavé. Iba acetaldehyd, ako prchavú látku, možno stanoviť plynovou chromatografiou, fotometricky, prípadne titračne [6, 7].

Rozvoj a uplatnenie izotachoforézy v analytickej chémii začína po zostrojení vhodných prístrojov [8, 9, 10, 11]. Využitie izotachoforézy vo vinárstve odskúšali už v r. 1978 Farkaš a Polonský [12] pri sledovaní kyselín a kationov vo vínach, ako i v ďalších prácach [13, 14, 15]. Chauvet a Sudraud v r. 1984 [16] uvádzajú skúsenosti so stanovením látok viažúcich SO₂.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Stanovenie látok viažúcich oxid siričitý vo víne pomocou izotachoforézy

V r. 1986—87 autori článku rozpracovali a aplikovali využitie kapilárnej izotachoforézy na stanovenie acetal-

dehydu, kyseliny pyrohroznovej, kyseliny 2-oxoglutárovej a iných látok [17] vo víne.

Princíp stanovenia

Stanovenie je založené na rozdielnej pohyblivosti aniónov adičných zlúčenín acetaldehydu, kyseliny glyoxylovej, kyseliny pyrohroznovej, kyseliny oxáloctovej a kyseliny 2-oxoglutárovej s oxidom siričitým, s použitím roztoku HCl ako vodiaceho elektrolytu a kyseliny vínnej ako zakončujúceho elektrolytu.

Použitie chemikálie a roztoky

- Vodiaci elektrolyt: roztok kyseliny chlorovodíkovej [c = 0,005 mol.l⁻¹]. Ako aditívum sa do vodiaceho roztoku pridá Klucel HF (hydroxypropylcelulóza) v koncentrácii 0,1 %.
- Zakončujúci elektrolyt: roztok kyseliny vínnej [c = 0,005 mol.l⁻¹].
- Štandardné roztoky sa pripravujú v roztoku kyseliny siričitej (H₂SO₃) tak, aby mólový pomer danej látky ku SO₂ bol 1:1,1, pričom mólové koncentrácie jednotlivých látok v roztoku H₂SO₃ sú nasledovné:
 - kyselina pyrohroznová: c = 0,01 mol.l⁻¹
 - kyselina glyoxylová: c = 0,01 mol.l⁻¹
 - kyselina 2-oxoglutárová: c = 0,01 mol.l⁻¹
 - kyselina oxáloctová: c = 0,01 mol.l⁻¹
 - kyselina acetaldehydsiričitá: c = 0,0205 mol.l⁻¹
- Roztok jódu c(1/2 I₂) = 0,2 mol.l⁻¹
- Roztok HCl vo vode (1:3 obj.)
- 0,2 % roztok škrobového indikátora
- Roztok Na₃BO₃ na alkalizáciu (100 g H₃BO₃ a 170 g NaOH sa rozpustí v 1000 ml vody)

Prístroje a pomôcky

Pri práci sa použil izotachoforetický analyzátor, ktorý bol vyrobený vo Výskumnom ústave rádioekológie a využitia jadrovej techniky v Spišskej Novej Vsi.

Tabuľka 2. Chemické zloženie sledovaných vzoriek vín

Vzorka č.	Kultivar	cukor (g.l ⁻¹)	titrovateľné kyseliny (g.l ⁻¹)	alkohol (obj. %)	prchavé kyseliny (g.l ⁻¹)	voľný SO ₂ (mg.l ⁻¹)	celkový SO ₂ (mg.l ⁻¹)
1/1		2,3	7,8	11,8	0,36	28,4	152,2
1/2	Veltlínské	2,3	8,1	12,0	0,36	28,0	156,5
1/3	zelené	2,5	7,8	11,9	0,30	23,5	157,0
2/1		1,0	7,8	13,3	0,40	27,0	131,0
2/2	Veltlínské	1,2	7,6	13,4	0,42	28,0	135,0
2/3	zelené	3,1	8,1	13,6	0,48	28,0	105,0
2/4		1,4	8,0	13,5	0,39	29,0	148,0
2/5		1,6	7,9	13,4	0,37	26,0	135,0
7	Müller-Th.	1,8	7,2	11,8	0,45	18,0	134,0
8	Rižling vl.	1,6	6,9	11,9	0,42	19,0	120,0

Parametre kapiláry: materiál — teflón, dĺžka 25 cm, vnútorný priemer 0,5 mm. Na detekciu sa použil univerzálny vodivostný detektor s elektródami s 90 % Pt a 10 % Ir.

Postup stanovenia

Presná koncentrácia adičnej zlúčeniny acetaldehyd. SO₂ sa stanovuje titráciou roztokom jódu takto: Do 50 ml alikvotnej časti sa pridá roztok HCl (1:3), roztok škrobu a 100 ml vody. Titráciou s roztokom jódu v kyslom prostredí sa odstráni nadbytok SO₂. Potom sa zmes zalkalizuje roztokom Na₂BO₃ na pH približne 9 a SO₂, uvoľnený z väzby s acetaldehydom, sa opäť titruje roztokom jódu. Výpočet: 12,692 mg jódu odpovedá 44 mg acetaldehydu.

Standardné roztoky pri vlastnom izotachoforetickom

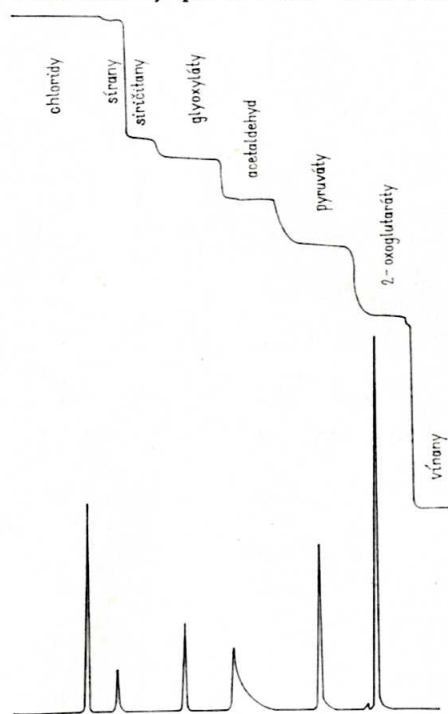
stanovení sa dávkovali mikrodávkačom v množstve 0,1 μl, vzorky vín v množstve 0,5 až 2 μl. Vína sa pred stanovením neupravovali.

Hnací prúd bol 150, resp. 50 μA.

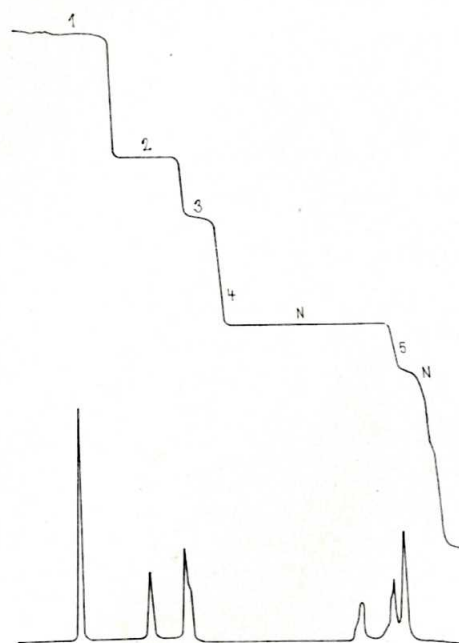
Zhodnotenie metódy a jej využitie

Izotachoforetické stanovenie sa použilo pre hodnotenie vybraných vzoriek vín [pozri tab. 2].

Ako vidieť z izotachoforetického záznamu modelovej zmesi látok viažúcich SO₂ [obr. 2] ako aj zo záznamu skúmanej vzorky vína kultivaru Veltlínskeho zeleného [obr. 3 — vzorka č. 2/3], jednotlivé látky v danom operačnom systéme prechádzali vodivostným detektorom v nasledovnom poradí: sírany, siričitany, glyoxyláty, acetaldehyd, pyruváty, oxalacetáty a 2-oxoglutaráty.



Obr. 2. Izotachoforetický záznam analýzy modelovej zmesi látok viažúcich SO₂



Obr. 3. Izotachoforetický záznam analýzy látok viažúcich SO₂ vo vzorke vína č. 2/3

1 — sírany, 2 — siričitany, 3 — acetaldehyd, 4 — pyruváty, 5 — 2-oxoglutaráty, N — neidentifikované zóny

Obsah oxalacetátov bol vo všetkých vzorkách vín taký nízky, že pri danej citlivosti ležal pod hranicou citlivosti metódy. Identifikácia látok sa robila na základe pomeru $h_i : h_T$, kde h_i je vzdialenosť vlny danej látky od vlny vodiaceho elektrolytu a h_T je vzdialenosť vlny zakončujúceho elektrolytu od vlny vodiaceho elektrolytu. Pre danú látku je tento pomer pri každom meraní (nezávisle od citlivosti zapisovača) konštantný. Kvantifikácia látok sa robila porovnaním dĺžok vln štandardných látok s hodnotami dĺžok vln vzoriek vína.

Ak sa na zázname neobjavila vlna siričitanov, príslušná vzorka nebola dostatočne zasírená. V takom prípade hrozilo nebezpečenstvo vzniku nepresnosti v meraní najmä obsahu acetaldehydu, ktorý nebol dostatočne viazaný (vo voľnej forme sa ako neutrálna látka neprejavuje vlnou) a meranie sa zopakovalo po prísírení vzorky s pevným $K_2S_2O_5$.

Obsah acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutarovej sa kapilárnou izotachoforézou stanovoval v rôznych vzorkách vín. Chemické zloženie sledovaných vzoriek vín je uvedené v tabuľke 2. Obsah acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutarovej v sledovaných vínach je uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3. Obsah acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutarovej v sledovaných vzorkách vín

Vzorka č.	Acetaldehyd ($mg.l^{-1}$)	Kyselina pyrohroznová ($mg.l^{-1}$)	Kyselina 2-oxoglutarová ($mg.l^{-1}$)
1/1	60,8	21,3	53,5
1/2	69,6	28,4	65,0
1/3	74,2	28,4	78,0
2/1	76,6	7,4	6,5
2/2	79,0	21,3	13,0
2/3	60,3	4,3	5,2
2/4	88,2	35,5	19,5
2/5	77,4	28,4	13,0
7	71,0	14,2	69,0
8	51,0	1,4	80,6

Údaje v tabuľkách potvrdzujú skutočnosť, že obsah celkového oxidu siričitého je v priamej súvislosti s obsahom medziproduktov kvasenia. Vzorka Veltlínskeho zeleného s obsahom celkového SO_2 rovným $157,0 mg.l^{-1}$ má vysoký obsah acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej i kyseliny 2-oxoglutarovej. Naproti tomu vzorka Veltlínskeho zeleného s obsahom celkového SO_2 iba $105 mg.l^{-1}$ má veľmi nízky obsah kyseliny pyrohroznovej, kyseliny 2-oxoglutarovej a pomerne nízky obsah acetaldehydu.

Doba analýzy jednej vzorky vína neprekročila 20 minút. Pretože jednou analýzou sa súčasne stanovujú všetky dôležité látky, viažuce SO_2 , je to doba vyhovujúca.

ZÁVER

Izotachoforéza sa ukazuje ako metóda vhodná na posudzovanie väzbovosti oxidu siričitého vo vínach a na stanovenie obsahu jednotlivých látok, viažúcich oxid siričitý. Predmetná metóda stanovenia medziproduktov kvasenia je rýchla, dostatočne presná, a preto je vhodná aj pre prax.

Literatúra

- [1] KOVÁČ, J.: Vinohrad, **24**, 1986, s. 211
- [2] KOVÁČ, J.: Vinohrad, **24**, 1986, s. 231
- [3] SCHOPFER, J. — F., AERNY, J.: Bull. O.I.V., **58**, 1985, č. 652/653, s. 515
- [4] LAFON-LAFOURCADE, S.: Bull. O.I.V., **58**, 1985, č. 652/653, s. 590
- [5] BURROUGHS, L. F., SPARKS, A. H.: J. Sci. Fd. Agric., **24**, 1973, s. 187, 199, 207

- [6] AMERINE, M. A., OUGH, C. S.: Methods for Analyses of Musts and Wines. A Wiley-Intersc. Publ. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1980
- [7] PRIBELA, A.: Analýza prírodných látok v požívatinách. 1. vyd. ALFA, Bratislava 1987
- [8] EVERAERTS, F. M., BECKERS, J. L., VERHEGGEN, Th. P. E. M.: Izotachophoresis. Elsevier Applied Science Publ. Amsterdam, Oxford, New York, 1976
- [9] BOČEK, P., DEML, M., JANÁK, J.: Chromatogr., **106**, 1975/1
- [10] STANKOVIANSKÝ, S. a kol.: (Výskumná správa.) Bratislava, ČCHÚ UK 1980
- [11] Čs. patent 190933
- [12] FARKAŠ, J., POLONSKÝ, J.: Využitie izotachoforézy vo vinárstve. In: Progressívne metódy vo vinárskej technológii. Vysoké Tatry 1978
- [13] FARKAŠ, J., KOVAL, M.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 256
- [14] FARKAŠ, J., KOVAL, M., POLONSKÝ, J.: Bull. potr. výsk., 21(1), 1982, č. 4, s. 25
- [15] FARKAŠ, J., KOVAL, M.: Vinohrad, **20**, 1982, s. 160
- [16] CHAUVET, S., SUDRAUD, P.: Rapport des Activités de Recherches 1982—1983. Institut d'Oenologie — Université de Bordeaux II, Talence 1984, s. 96—98
- [17] KOVÁČ, J.: Štúdium foriem a optimalizácia obsahu oxidu siričitého z hľadiska kvality a stability vinárskych produktov. (Kandidátska dizertačná práca). SVŠT Bratislava 1988

Lektorovala prof. Ing. Gabriela Basařová, DrSc.

Kováč, J. - Farkaš, J. - Svoboda, M.: Využitie izotachoforézy na stanovenie látok viažúcich oxid siričitý vo víne. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 10, s. 296—299.

V príspevku sa uvádza využitie izotachoforézy na stanovenie acetaldehydu, kyseliny pyrohroznovej a kyseliny 2-oxoglutarovej, ktoré sa vo víne viažu s oxidom siričitým, a tým zvyšujú podiel jeho viazanej — neaktívnej časti. Uvedená metóda je rýchla, dostatočne presná a v praxi umožňuje posudzovať väzbovosť oxidu siričitého vo víne.

Ковач, И. - Фаркаш, Я. - Свобода, М.: Использование изотакхофореза для определения веществ, связывающих двуокись серы в вине. Квас. прум., **35**, 1989, № 10, стр. 296—299

В статье приводится использование изотакхофореза для определения ацетальдегида пировиноградной кислоты и 2-оксoglutarовой кислоты, которые в вине связываются с двуокисью серы и тем самым повышают долю ее связанной неактивной части. Приведенный метод является быстродействующим, достаточно точным и на практике позволяет рассмотреть способов связи двуокиси серы в вине.

Kováč, J. - Farkaš, J. - Svoboda, M.: Application of Iso-tachophoresis for the Determination of Compounds Binding Sulphur Dioxide in Wine. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 10, pp. 296—299.

The application of isotachophoresis for the determination of acetaldehyde, pyruvic acid and 2-oxoglutaric acid in wine is described. These compounds react with sulphur dioxide. The fixed SO_2 is no more active. The method is quick, accurate enough and permits the evaluation of the formation of SO_2 -inactive compounds in production plants.

Kováč, J. - Farkaš, J. - Svoboda, M.: Applikation der Iso-tachoforese zur Bestimmung der SO_2 -bindenden Stoffe im Wein. Kvas. prům., **35**, 1989, Nr. 10, S. 296—299.

Der Beitrag behandelt die Applikation der Isotachoforese auf die Bestimmung von Acetaldehyd, Brenztraubensäure und 2-Oxoglutarinsäure, die sich im Wein mit dem Schwefeldioxid binden und dadurch zur Vergrößerung des inaktiven gebundenen Anteils im Wein beitragen. Die beschriebene Methode ist schnell, ausreichend genau und bietet der Praxis die Möglichkeit der Beurteilung der Bindungen des Schwefeldioxids im Wein.