

HPLC stanovení obsahu kyseliny sorbové ve vínech

663.18

Ing. BOHUMIL ŠPINAR, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., Ing. JIŘÍ ČULÍK, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 120 44 Praha 2

Klíčová slova: víno, kyselina sorbová, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

1. ÚVOD

Kyselina sorbová [2,4-hexadienová, $\text{CH}_3(\text{CH}=\text{CH})_2\text{COOH}$] je jedním z konzervačních prostředků používaných v nápojovém průmyslu. Její aplikace ve vinarství je povolena hygienickou směrnicí a limit maximálního obsahu ve vínu je stanoven na hodnotu $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [1]. Sledování obsahu kyseliny sorbové ve vínech je nutné nejen z hlediska hygienického, ale i z důvodu možných negativních účinků na senzorické vlastnosti vína. Je dokázán vliv kyseliny sorbové na jablčnomléčné kvašení, kdy za určitých podmínek se mění kyselina sorbová na kyselinu nexanovou nebo na hexanoat, který dodává vínu nežádoucí pacnuť, která je běžnými prostředky neodstranitelná [2].

Při stanovení kyseliny sorbové se uplatňují téměř všechny běžné analytické principy: metody titrační [3], kolorimetrie [2, 3], spektrální metody v oblasti UV i IC [4, 5], izotachoforéza [6], chromatografie na tenké vrstvě [7], plynová chromatografie [8].

Velký úspěch v poslední době v zahraničí slaví metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s využitím normálních i reverzních fází [9, 10, 11].

Naši snahou bylo vyvinout jednoduchou a rychlou metodu HPLC stanovení obsahu kyseliny sorbové ve víně s nenáročnou předúpravou vzorku.

2. MATERIÁL A METODY

- kyselina sorbová p.a. (Lachema)
- acetonitril Lichrosolv (Merck)
- methanol Lichrosolv (Merck)
- KH_2PO_4 p.a. (Merck)
- mikrokolony PRESEP 1, plněné sorbentem SGX C_{18} (Tessek Praha)
- kapalinový chromatograf Hewlett Packard HP 1090 s fotodiodovým detektorem (DAD)
- kolona: kovová, $100 \times 2,1 \text{ mm}$, náplň HYPERSIL ODS, $5 \mu\text{m}$
- mobilní fáze: A — KH_2PO_4 ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
o pH 2,5
B — acetonitril
A/B = 70/30

Optimalizace chromatografických podmínek byla prováděna se standardním roztokem kyseliny sorbové o koncentraci $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Detekce byla prováděna v UV oblasti při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximum kyseliny sorbové. K izolaci kyseliny sorbové bylo použito metody extrakce na pevném sorbentu v kolonce PRESEP 1. Směs 1 ml vzorku vína a 1 ml fosfátového pufru o pH 2,5 byla prosáta kolonkou předem promytou methanolem a destilovanou vodou. Kyselina sorbová, která se zachytila na náplni kolonky, byla eluována 1 ml methanolem. Získaný eluát byl nastříkán na HPLC kolonu.

Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno z ploch píků metodou externího standardu. Výsledky stanovení byly zpracovány běžnými statistickými metodami, při porovnání dvou metod byl použit Studentův test pro párové hodnoty [12].

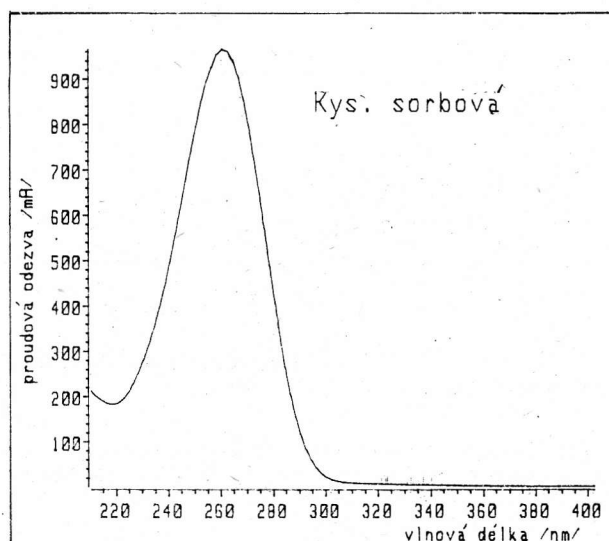
Jako referenční metoda sloužilo v ČSFR běžně používané kolorimetrické stanovení, při kterém se kyselina sorbová izoluje ze vzorku destilací s vodní párou a v destilátu se zjišťuje po oxidaci barevnou reakcí s kyselinou thiobarbiturovou.

Reálné vzorky vín různých odrůd byly získány z produkce podniku Moravské vinařské závody Mikulov, ročník 1987.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Byl pořízen chromatografický záznam analýzy stan-

dardního roztoku kyseliny sorbové. Z průběhu UV spektra (obr. 1) bylo zjištěno absorpční maximum kyseliny



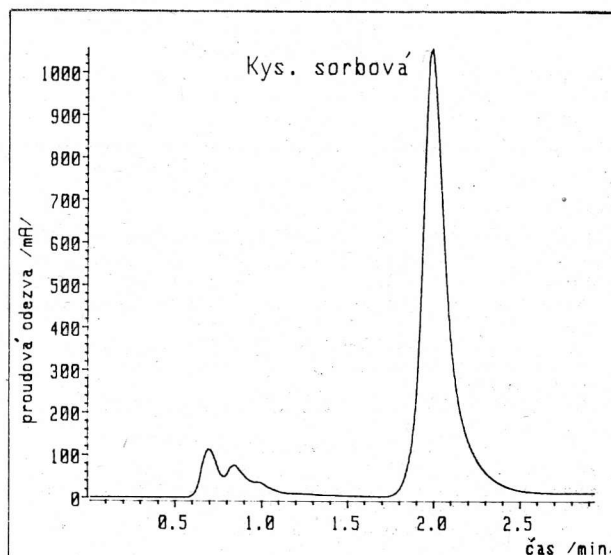
Obr. 1. Průběh absorpčního spektra kyseliny sorbové

sorbové $\lambda = 258 \text{ nm}$. Pro zjištění přesnosti měření bylo provedeno 10 analýz standardního roztoku. Průměr: $200,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, směrodatná odchylka: 0,53, variační koeficient: 0,3 %, 95 % interval spolehlivosti: $200,1 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Detekční limit je nižší než $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

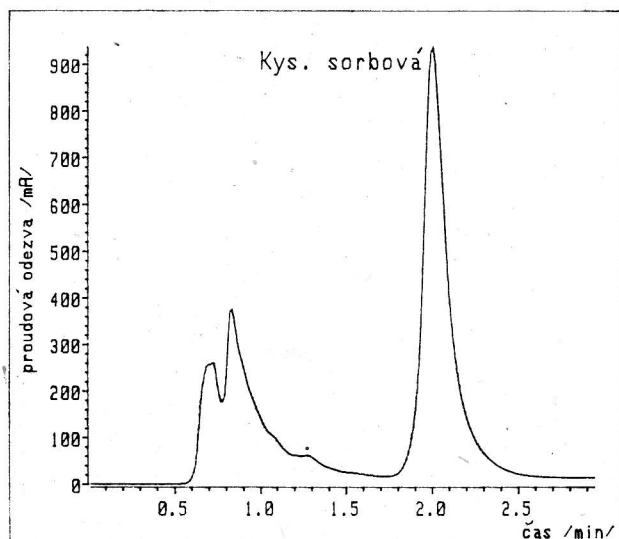
Byl získán chromatografický záznam HPLC analýzy reálných vzorků bílého a červeného vína po předchozí izolaci na kolonce PRESEP 1 (obr. 2, 3). Pro zjištění přesnosti metody bylo provedeno 10 analýz jednoho vzorku vína: Moravské bílé, průměr: $150,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, směrodatná odchylka: 1,1, variační koeficient: 0,7 %, 95 % interval spolehlivosti: $150,8 \pm 0,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Porovnání metod stanovení kyseliny sorbové

Metodou HPLC bylo analyzováno 15 vzorků bílých vín



Obr. 2. Chromatogram vzorku bílého vína: Moravské bílé, obsah kyseliny sorbové — $152 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



Obr. 3. Chromatogram vzorku červeného vína: Melodie, obsah kyseliny sorbové — 125 mg.l⁻¹

různých závodů, u nichž byl stanoven obsah kyseliny sorbové kolorimetrickou metodou v podnikové laboratoři MVZ Mikulov. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Z po-

Tabulka 1. Porovnání metod stanovení kyseliny sorbové
X = metoda HPLC Y = metoda kolorimetrická

Číslo vzorku	X(mg.l ⁻¹)	Y(mg.l ⁻¹)	Číslo vzorku	X(mg.l ⁻¹)	Y(mg.l ⁻¹)
1	185	188	9	151	158
2	96	95	10	198	197
3	108	110	11	164	161
4	142	139	12	200	205
5	145	148	13	124	121
6	133	138	14	93	93
7	112	109	15	140	145
8	172	174			

Tabulka 2. Přehled obsahů kyseliny sorbové v jednotlivých závodech

Závod	Počet vzorků celkem	Počet vzorků s obsahem kys. sorb. nad 200 mg.l ⁻¹	% z celkového počtu	Maximální obsah kys. sorbové mg.l ⁻¹	Minimální obsah kys. sorbové mg.l ⁻¹	Průměrný obsah kys. sorbové mg.l ⁻¹
I	41	2	4,9	280	95	167
II	29	1	3,5	213	129	171
III	36	1	2,8	223	78	151
IV	14	0	0	175	64	124
V	30	8	26,7	380	155	189
Celkem	150	12	8	380	64	160

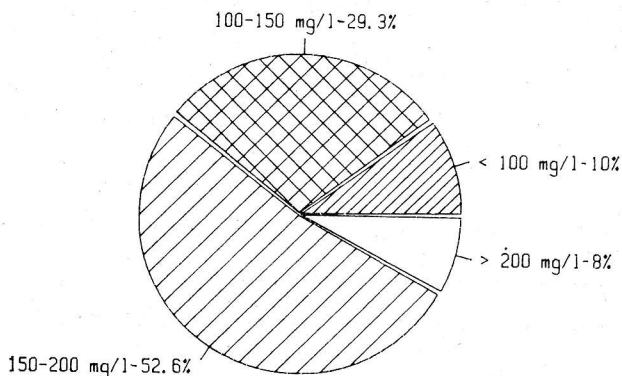
Literatura

- [1] Hygienické předpisy MZ ČSR, Směrnice č. 50, Avicenum 1978
- [2] FARKAŠ, J.: Technologie a biochemie vína, 1. vyd. SNTL, Praha 1980, s. 770
- [3] PRIBELA, A. et al.: Analýza cudzorodých látek v poživatinách, 1. vyd., ALFA, Bratislava 1974, s. 123
- [4] PATAKY, B.: J. Sci. Food Agr., **15**, 1964, s. 326
- [5] CALLOWAY, G. F., SCHWARTZMAN, G.: J. Ass. Off. Anal. Chem., **48**, 1965, s. 794
- [6] DONHAUSER, S., GLAS, K., GRUBER, B.: Mschr. Brauwiss., **37**, 1984, s. 252
- [7] CLEMENT, J.: Z. Anal. Chem., **248**, 1969, s. 182
- [8] PRIBELA, A. et al.: Použitie plynovej chromatografie pri stanovení niektorých konzervačných činidiel. Zborník prác chemickej fakulty, SVTL, Bratislava 1965
- [9] LEUENBERGER, U., GAUCH, R., BAUMGARTNER, E.: J. Chromatogr., **173**, 1979, s. 343
- [10] AITZETMÜLLER, K., ARZBERGER, E.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., **178**, 1984, s. 279
- [11] MILD, J., GERTY, C.: Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., **170**, 1980, s. 110

rovnání výsledků vyplývá, že rozdíl mezi metodami je přibližně 6 rel. %, zatímco tolerovaný mezilaboratorní rozdíl je 10 rel. %. Rozdíl výsledků obou testovaných metod byl vyhodnocen Studentovým testem pro párové hodnoty a není statisticky významný ($t = 0,77$, $t_{krit.} = 2,15$).

Monitorizace souboru vín

Během let 1987 a 1988 bylo změřeno 150 vzorků bílých vín z různých závodů podniku MVZ Mikulov. V tabulce 2 je zpracován přehled obsahů kyseliny sorbové v jednotlivých závodech. Za pozitivní lze označit fakt, že vzorky se zvýšeným obsahem kyseliny sorbové se objevovaly jen ojediněle, pouze u jednoho závodu byl zjištěn vyšší počet. Jedná se pravděpodobně buď o projev technologických nedostatků, nebo popř. o přídavek dovozních vín do výrobků bez předchozí kontroly obsahu kyseliny sorbové. Distribuce obsahu kyseliny podle procentuálního zastoupení z celkového počtu 150 vzorků je znázorněna graficky na obr. 4. Z celého souboru jen 12



Obr. 4. Distribuce obsahu kyseliny sorbové v celém souboru 150 vzorků bílých vín

vzorků (8 %) překročilo povolený limit. Velký rozptyl výsledků ukazuje na důležitost pečlivého dodržování dávkování kyseliny sorbové, resp. sorbanu draselného do vína a na nutnost kontroly dovozních vín přidávaných do našich výrobků.

- [12] ECKSCHLAGER, K., HORSÁK, I., KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vyd. SNTL, Praha 1980

Lektoroval Doc. Ing. Fedor Malík, CSc.

Špinar, B. - Kellner, V. - Čulík, J.: HPLC stanovení obsahu kyseliny sorbové ve vinech. Kvas. prům., 36, 1990, č. 4, s. 99—101.

Byla vyvinuta rychlá a jednoduchá HPLC metoda stanovení obsahu kyseliny sorbové ve vinech. Doba stanovení je 2 až 3 minuty. K izolaci kyseliny sorbové z matrice lze s výhodou použít kolonky tuzemské výroby. Metoda je vhodná pro sledování obsahu kyseliny sorbové v hladinách nad 0,1 mg.l⁻¹ a je použitelná nejen pro víno, ale i pro další výrobky nápojového průmyslu.

Шпинар, Б. - Келльнер, В. - Чулик, Я.: Определение при помощи жидкостной хроматографии под высоким дав-

leniem содержания сорбиновой кислоты в винах. Квас. прум., 36, 1990, № 4, стр. 99—101.

Byl разработан быстродействующий и простой метод HPLC определения содержания сорбиновой кислоты в винах. Время определения 2—3 минуты. Для изолирования сорбиновой кислоты из матрицы можно выгодно применить колонки отечественного производства. Метод подходит для исследования содержания сорбиновой кислоты в уровнях 0,1 мг.л⁻¹ и он применим не только для вина, а также и для других изделий промышленности напитков.

Špinar, B. - Kellner, V. - Čulík, J.: Sorbic Acid Determination in Wines Using HPLC. Kvas. prám., 36, 1990, No. 4, pp 99—101.

A rapid and simple HPLC method for the determination of sorbic acid in wines was developed. The time

of the determination is from 2 to 3 minutes. The isolation of sorbic acid from matrix can be performed in the column of a domestic provenience. The method is suitable for the detection of sorbic acid above 0,1 mg.l⁻¹ and it can be used not only with wines but with other beverages as well.

Špinar, B. - Kellner, V. - Čulík, J.: HPLC-Bestimmung des Sorbins-Säuregehalts in Weinen. Kvas. prám., 36, 1990, Nr. 4, S. 99—101.

Es wurde eine schnelle und einfache HPLC-Methode der Bestimmung des Sorbinsäuregehalts in Wein entwickelt. Die Bestimmungsdauer beträgt 2 bis 3 Minuten. Zur Isolation der Sorbinsäure aus der Matrix können mit Vorteil Kolonnen inländischer Provenienz angewandt werden. Die Methode ist für die Ermittlung des Sorbinsäuregehalts im Niveau über 0,1 mg.l⁻¹ geeignet und kann nicht nur bei Wein, sondern auch bei anderen Erzeugnissen der Getränkeindustrie appliziert werden.

Příprava kyseliny L-jablečné pomocí imobilizovaných bakteriálních buněk

Ing. HANA KUČEROVÁ, Ing. BOHUMIL ŠPAČEK, CSc., Konzervárny a lihovary, státní podnik vědeckotechnických a obchodních služeb,

Ing. JAROSLAV ČERNÝ, CSc., Ústav organické chemie a biochemie ČSAV.

Klíčová slova: Kyselina L-jablečná, kyselina fumarová, imobilizace buněk, alginát, kontinuální příprava kyseliny L-jablečné.

1. ÚVOD

Imobilizace biokatalyzátorů — enzymů, organel, mikrobiálních a rostlinných buněk a jiných biologických systémů — je v současné době předmětem celosvětové pozornosti. Imobilizované biokatalyzátory uskutečňují biochemické reakce za mnohem stabilnějších podmínek než jejich volné formy a celý proces je mnohem výhodnější z hlediska ekonomických ukazatelů. S rozvojem technik imobilizací celých buněk v 70. letech se objevila řada studií o možném využití imobilizovaných buněk pro přípravu organických kyselin [1].

V poslední době stoupá poptávka po kyselině L-jablečné vzhledem k jejímu využití v potravinářství (např. ochucovadlo v nealkoholických nápojích, cukrovinkách, ovocných a zeleninových konzervách), farmaceutickém průmyslu, medicíně, zpracování kovů, výrobě čistících prostředků atd. Organickou syntézou vzniká směs D-formy a L-formy; L-izomer se získává např. izolací z přírodních šťáv nebo rozdělením směsi izomerů. Žádný z uvedených způsobů však není technologicky příliš efektivní. Bylo proto vyvinuto značné úsilí k vypracování ekonomicky výhodné přípravy kyseliny L-jablečné pomocí buněk mikroorganismů. Jako surovina pro fermentační přípravu byl studován ethanol [2], n-parafin [3] a acetat [4]. Tyto práce mají však pouze teoretický význam, protože jejich efektivnost není pro eventuelní průmyslovou aplikaci dostatečně vysoká.

Zatím jedinou ekonomicky výhodnou přípravou je využití enzymové transformace kyseliny fumarové [5]. Na tomto principu je založen doposud jediný průmyslově využitý postup k přípravě kyseliny L-jablečné, který vyvinula japonská firma Tanabe Seiyaku Co., Ltd. V kontinuálním procesu bylo zpočátku používáno buněk *Brevibacterium ammoniagenes*, imobilizovaných v polyakrylamidovém gelu [5], v současné době byla účinnost procesu zvýšena zavedením nového kmene *Brevibacterium flavum* a použitím α -carrageenanu jako nosné matrice [6]. Produktivita imobilizovaných buněk dosahuje za optimálních podmínek 42 kg kyseliny L-jablečné za hodinu v koloně o objemu 1 000 l.

Příprava kyseliny L-jablečné enzymovou transformací kyseliny fumarové byla studována v Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV. Byl ověřen nejen postup japonských autorů, ale i další možnosti, které by mohly přispět k řešení problematiky. Byly nalezeny bakteriální kmeny s vysokou schopností konverze fumarátu na L-

malát a byly určeny optimální podmínky pro jejich využití [1]. Tyto základní poznatky byly předány do Výzkumného ústavu koncernu Konzervárny a lihovary, jehož úkolem bylo vypracovat nový pracovní postup, umožňující ekonomicky přijatelnou přípravu kyseliny L-jablečné imobilizovanými mikrobiálními buňkami, využitými v kontinuálním procesu.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Mikroorganismus a médium

Z řady mikroorganismů byl vybrán pro vysokou transformační aktivitu přeměny fumarátu na L-malát, pro vysokou stabilitu a možnost různých zásahů do procesu imobilizace bez ovlivnění aktivity přírodní izolát, určený v Čs. sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně jako *Corynebacterium species*.

Kultivace se prováděly v kompletním médiu (KM) o složení: živný bujón č. 1 [8 g], kyselý hydrolyzát kaseinu [5 g], kvasničný autolyzát [10 g], pitná voda [k doplnění na 1000 ml], pH 7,0 (úprava NaOH). Dále se používalo médium o složení: kyselý hydrolyzát arašidové mouky [250 ml], kvasničný autolyzát [5 g], pitná voda [k doplnění na 1000 ml], pH 7,0 (úprava NaOH). Obě média byla sterilována při 120 °C 30 minut.

Kmen byl udržován na agarrech KM a pasážován po 30 dnech, dlouhodobě byl uložen v 15% vodném roztoku glycerolu při -20 °C.

2.2 Kultivace

100 ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml média byly očkované kmenem vyrostlým na šikmém agaru. Po 24 hodinách kultivace na rotační třepačce (frekvence otáček 190 min⁻¹) při 37 °C byly zaočkovány 1 ml tohoto inokula 500 ml varné baňky se 100 ml média. Tyto baňky byly opět inkubovány na rotační třepačce při 37 °C po dobu 24 až 30 hodin.

Fermentor o celkovém plnicím obsahu 75 l (Bioengineering, Švýcarsko) byl plněn 35 l média a očkován 0,7 l inokula, narostlého v 500 ml baňkách za 24 hodin. Kultivace probíhala 30 až 52 hodin při 37 °C, vzdušnění 8,5 l/min a frekvenci otáček míchadla 400 za minutu. Počáteční pH 7,0 nebylo během fermentace regulováno.