

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA HLAVNÍCH SACHARIDŮ VÍNA

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. HANA HORÁKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## ANALÝZA HLAVNÍCH SACHARIDŮ VÍNA

ANALYSIS OF MAIN WINE SACCHARIDES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

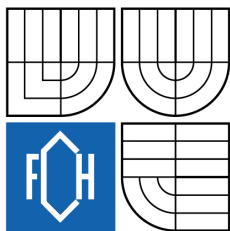
Bc. HANA HORÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0228/2008</b>	Akademický rok: <b>2008/2009</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Hana Horáková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	<b>RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.</b>	
Konzultanti diplomové práce:	Ing. Pavel Kučera	

### Název diplomové práce:

Analýza hlavních sacharidů vína

### Zadání diplomové práce:

Literární část:

- Přehled postupů stanovení sacharidů vína vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
- Další metody a postupy analýzy sacharidů vína
- Poznatky o preparativní chromatografické separaci glukosy, fruktosy a sacharosy

Experimentální část:

- Separace sacharidů na analytické chromatografické koloně
- Ověření analytických chromatografických postupů na reálných vzorcích
- Aplikace další techniky pro analýzu sacharidů ve víně
- Vyhodnocení a diskuse získaných výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Hana Horáková  
Student(ka)

-----  
RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá stanovením hlavních sacharidů vína. Teoretická část se věnuje výrobě vína od samotného hroznu až po ošetřování a školení vína. Zmiňuje se také o sacharidech ve víně, hlavně glukóze a fruktóze.

Práce poskytuje přehled dostupných literárních pramenů o možnostech stanovení hlavních sacharidů ve víně pomocí chromatografických metod a pomocí automatického analyzátoru Skalaru. Studie se krátce zmiňuje o dalších jednoduchých analytických metodách stanovení cukrů ve víně.

Z této literární rešerže vychází experimentální část zabývající analýzou sacharidů vysokouúčinnou kapalinovou chromatografií s refraktometrickou a UV detekcí na koloně s vázanou aminoalkylovou fází a stanovením redukujících sacharidů na automatickém analyzátoru Skalaru. V závěru byly výsledky těchto metod porovnány.

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with determination of carbohydrates in wine. Theoretical part attends to production of wine from grape to treatment and training of wine. It refers saccharides in wine, especially glucose and fructose.

The study provides an overview of the available sources concerning the possibilities of determination of carbohydrates in wine by chromatographic methods and Skalar automated chemistry analyser. The study shortly refers simple analytical methods for determination of wine saccharides.

The experimental part based on this search deals with analysis of saccharides by high performance liquid chromatography with refractive index detector and UV detector on aminoalkyl column and determination of reducing sugars by Skalar automated chemistry analyser. Finally, the results of these methods were compared.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Víno, sacharidy, vysokouúčinná kapalinová chromatografie, refraktometrický detektor, UV detektor, preparativní chromatografie, automatický analyzátor Skalar.

## **KEYWORDS**

Wine, saccharides, high performance liquid chromatography, refractive index detector, UV detector, preparative chromatography, Skalar automated chemistry analyser.



HORÁKOVÁ, H. *Analýza hlavních sacharidů vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 88 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

### **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta



## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
2.1. Víno.....	12
2.1.1. Hrozen jako surovina pro výrobu vína.....	12
2.1.2. Posouzení a sklizeň hroznů .....	13
2.1.3. Výroba vína .....	14
2.1.3.1. Zjišťování cukernatosti.....	14
2.1.3.2. Zpracování hroznů.....	15
2.1.3.3. Získávání moštu .....	15
2.1.3.4. Úprava moštu .....	16
2.1.3.5. Kvašení moštu .....	17
2.1.3.6. Ovlivnění průběhu kvašení.....	18
2.1.3.7. Zachování zbytku cukru ve víně .....	18
2.1.3.8. Ošetřování a školení vína .....	19
2.2. Látkové složení vína.....	21
2.3. Sacharidy.....	24
2.3.1. Glukóza .....	24
2.3.2. Fruktóza.....	25
2.3.3. Sacharóza .....	25
2.4. Stanovení hlavních sacharidů ve víně .....	26
2.4.1. Chromatografické metody.....	26
2.4.1.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC.....	27
2.4.1.2. Kolony využívané pro stanovení sacharidů pomocí HPLC .....	28
2.4.1.3. Mobilní fáze .....	30
2.4.1.4. Detekční systémy .....	30
2.4.1.5. Preparativní chromatografie .....	32
2.4.2. Automatický analyzátor Skalar .....	34
2.4.2.1. Princip kontinuální průtokové analýzy .....	34
2.4.2.2. Aplikace .....	36
2.4.3. Manuální analytické metody .....	37
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
3.1. Chemikálie, pomůcky a laboratorní zařízení.....	38
3.2. Vzorky.....	39
3.3. Automatický analyzátor Skalar .....	40
3.4. HPLC s UV detekcí s diodovým polem .....	42
3.5. HPLC s RI detekcí.....	44
3.6. Výpočty a vzorce.....	46
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>47</b>
4.1. Automatický analyzátor Skalar .....	47
4.1.1. Kalibrační závislosti pro Skalar .....	47
4.1.2. Stanovení obsahu redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích vín .....	49
4.2. HPLC s UV detekcí s diodovým polem .....	51
4.2.1. Úprava podmínek pro HPLC analýzu .....	51
4.2.2. Kalibrační závislosti .....	52
4.2.3. Stanovení sacharidů v jednotlivých vzorcích vín.....	54
4.3. HPLC s RI detekcí.....	58
4.3.1. Kalibrační závislosti .....	58

4.3.2.	Stanovení sacharidů v jednotlivých vzorcích vín.....	59
4.4.	Srovnání metod použitých pro stanovení sacharidů ve víně .....	61
4.4.1.	Srovnání Skalaru a HPLC metod .....	62
4.4.2.	Srovnání HPLC metod .....	63
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>72</b>
7.1.	Seznam použitých zkratk.....	72
7.2.	Seznam použitých symbolů.....	73
<b>8.</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>75</b>
9.1.	Naměřené údaje pro Skalar .....	75
9.1.1.	Příloha 1: Obsah redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích vín.....	75
9.2.	Naměřené údaje pro HPLC s UV detekcí .....	81
9.2.1.	Příloha 2: Naměřené hodnoty kalibračních závislostí fruktózy .....	81
9.2.2.	Příloha 3: Naměřené hodnoty fruktózy pro jednotlivé vzorky vín.....	82
9.2.3.	Příloha 4: Průběh analýzy jednotlivých vzorků vín .....	83
9.3.	Naměřené údaje pro HPLC s RI detekcí .....	86
9.3.1.	Příloha 5: Naměřené hodnoty glu, fru, sach pro jednotlivé vzorky vín .....	86
9.3.2.	Příloha 6: Průběh analýzy jednotlivých vzorků vín .....	87

## 1. ÚVOD

Víno, k jehož výrobě jsou surovinou hrozny vinné révy, je jedním z nejdéle známých alkoholických nápojů. Jeho doložená historie se vyvíjela od dávnověkých obyvatel Mezopotámie a starého Egypta přes antiku Řecka a Říma a středověk Evropy až k dnešním dnům. Pěstování vinné révy na našem území je podle archeologických nálezů známo necelé dva tisíce let. K rozšíření vinařství v široké míře došlo až za vlády Karla IV. V minulosti opředená řadou bájí a pověr se výroba vína vyvinula v moderní potravinářské odvětví.

Pěstování vinné révy je podmíněno vhodnými klimatickými a geologickými podmínkami. Odrůda je matkou vína, půda a poloha jsou otcem vína a ročník je jeho osudem. K nejvýznamnějším vinařským zemím na světě patří Itálie, Francie, Španělsko a Portugalsko v Evropě, Argentina, Austrálie, Chile a USA v zámoří.

V průběhu historického vývoje zpracování hroznů na víno se vyvinula řada technologických postupů v souladu s lokalitou, druhem pěstovaných odrůd, technickými možnostmi a společenskými zvyklostmi a tradicemi. Jednotlivé technologie se často výrazně liší a umožňují výrobu široké palety různých druhů a značek vín. Základní principy zpracování vinné révy na víno jsou dostatečně patrné z technologie dvou základních, tj. bílých a červených vín.

Státy mírného pásu pochopily, že nemohou příliš konkurovat tradičním výrobcům vín a tak se částečně zaměřily na výrobu netradičního ledového či slámového vína. České a moravské vinohrady plodí hrozny určené k výrobě ledového a slámového vína od druhé poloviny 90. let, od roku 2000 jsou zařazena mezi vína přívlastková.

Znalectví vína bylo považováno za velmi odborné téma, v němž si každý, kdo neměl potřebný přehled, vysloužil trapný neúspěch. Požadavkem doby byla důvěrná znalost původu a předpokládané chuti jednotlivých značek vína. V dřívějších dobách bylo totiž víno výlučně záležitostí úzkého kruhu kulturní elity. Dnes se o víno zajímá široká veřejnost, víno prožívá „boom“. Lidem není jedno co v láhvi najdou, stávají se náročnějšími zákazníky.

Proto je nutné sledovat kvalitu vína, která je velmi ovlivněna jeho chemickým složením, např. obsahem alkoholu, aminokyselin, organických kyselin a v neposlední řadě také obsahem sacharidů. Jejich kvalitativní i kvantitativní zastoupení je často závislé na podmínkách při zrání a zpracování vína.

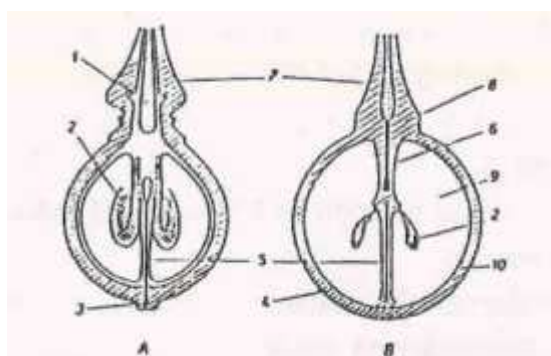
Proto je důležité znát a používat škálu metod a postupů, kterými lze přesný obsah sacharidů ve víně zjistit. Své místo mají metody manuální, automatizované i instrumentální. Manuální metody na stanovení sacharidů ve víně vychází z českých technických norem a mnohé z nich jsou převedeny do automatizované formy jako analyzátor Skalar. Příkladem instrumentálního stanovení sacharidů je kapalinová chromatografie.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Víno

#### 2.1.1. Hrozen jako surovina pro výrobu vína

Hrozny vinné révy (*Vitis vinifera*) se skládají z bobulí a třepin, bobule pak z dužiny, slupky a semena. Průřez bobulí hroznů je na obrázku 1. Všechny součásti hroznů mají značný vliv na chemické složení a kvalitu budoucího vína. Důležité je znát vzájemné závislosti jednotlivých složek hroznů a vlivy, které mají na budoucí víno. Podíl části hroznů je různý, závisí na odrůdě, stupni zralosti a na geologických podmínkách. Hrozny obsahují zejména cukry, kyseliny, vodu, třísloviny, tuky, dusíkaté látky, minerální látky, barviva a aromatické látky. Tyto látky nejsou v jednotlivých částech hroznů zastoupeny stejným dílem [1].



**Obrázek 1: Průřez bobulí hroznů**

A – nezralá bobule; B – zralá bobule; 1 – dřevina, 2 – semena, 3 – blizna, 4 – slupka, 5 – cévní svazek, 6 – štetinka, 7 – stopka, 8 – obal, 9 – dužina, 10 – slupka

**Dužnina** činí průměrně 85 až 90 % hmotnosti hroznů [1]. Velmi velké buňky dužniny mají velmi slabé a málo stabilní stěny. V nich se nachází největší množství šťávy, kterou lze lehce získat. Jejimi hlavními složkami jsou cukry glukóza a fruktóza a kyseliny vinná a jablečná [2]. Tyto kyseliny se vyskytují jednak ve volné formě, jednak ve formě solí. Konzistence dužniny záleží na odrůdě hroznů. Stolní odrůdy mívají dužinu zpravidla masitou a chřoupavou, moštové zase řídkou a šťavnatou, takže výlisnost je u nich větší [1].

**Slupka** bobule činí 9 až 11 % z celkové hmotnosti hroznů [1]. Látky obsažené ve slupkách mají největší vliv na chuť, vůni a odrůdový charakter budoucího vína. Hlavní složka slupek je voda a nejhodnotnější součástí slupek jsou barviva a aromatické látky. Slupky bílých odrůd obsahují žlutozelená barviva (flavanoly a chlorofyl). V slupkách červených a modrých odrůd jsou červená barviva tzv. anthokyany. Intenzita červených vín závisí jednak na obsahu barviva ve slupce a jednak na způsobu zpracování hroznů. Z dalších obsahových látek se ve víně nalézají minerální látky (vápník, draslík), pektiny, proteiny a hroznové enzymy [1]. Důležitá součást slupek jsou **vosky**. Vytvářejí na slupkách voskový povlak chránící bobuli před mechanickým poškozením a nadměrným vypařováním. Tato vrstva ovlivňuje ulpívání prostředků ochrany rostlin a pohlcování pachů z okolí [2].

**Semena** jsou uložena v bobulích hroznů. Původně jsou zelená, při dozrávání hroznů se barví do hněda a jejich hmotnost se snižuje. Hlavní složkou semen jsou třísloviny a oleje. Při nakvašování rmutu se třísloviny dostávají do moštu a mohou vínu dodat nepřijemně hořkou

a škrablavou chuť. Proto je třeba omezit jejich poškození a vyluhování. U červených vín se vyluhování tříslovin podporuje, protože jsou tu nezbytné v harmonickém poměru s kyselinami, barvivem a ethanolem. Olej obsažený v semenech se může využívat jako stolní olej. Obsahuje glyceridy kyseliny stearové, palmitové a linolové [1].

**Třapiny** tvoří 3 až 5 % hmotnosti hroznů. V třapinách je poměrně mnoho tříslovin. Třapiny z 1 kg hroznů obsahují 1 g tříslovin. Kromě toho obsahují i dusíkaté látky a minerální látky. Jsou-li třapiny nevyzrálé a zelené, dodávají moštu, a zvláště budoucímu vínu, nepříjemnou příchut' po třapinách. Proto je nutno hrozny s nevyzrálými třapinami před nakvašováním odstranit [1].

### 2.1.2. Posouzení a sklizeň hroznů

Vyzrálост hroznů ve vinici je značně rozdílná, jenom na jediném hroznu lze pozorovat rozdíly až kolem 2 °NM.<sup>1</sup> Proto je důležitý odběr průměrného vzorku, tj. alespoň 100 bobulí, které jsou pokud možno odebírány stále ze stejných keřů. Po získání moštu z těchto bobulí například na kuchyňském odšťavňovači lze refraktometrem odečíst jeho cukernatost. V každém případě je vhodné doplňující stanovení kyselin. Výsledky těchto informativních měření je však třeba brát opatrně [2].

Velký vliv na kvalitu hroznů a budoucího vína má **stupeň zralosti hroznů**. Ukazatelem stupně zralosti hroznů je obsah cukru a kyselin. Na počátku zrání hroznů je tento ukazatel velmi nízký. Jak přibývá cukru a ubývá kyselin, jeho hodnota se výrazně zvyšuje [1].

Rozhodnutí o termínu sklizně závisí na více faktorech. Jedná se zejména o vyzrálост hroznů, zdravotní stav hroznů a požadovaný typ budoucího vína (aromatické, přívlastkové). V zásadě je třeba se snažit dosáhnout plně vyzrálých hroznů. Slunečné počasí a dostatek srážek urychlí příchod plné zralosti. Suché a chladné počasí způsobuje zpoždění zrání. Nerovnoměrný vývoj zrání nebo rozdílné napadení hnilobou vedou k potřebě několikeré sklizně (předsklizeň, hlavní sklizeň, odstupňovaná sklizeň). Sklizeň je vhodné provádět při suchém počasí [2].

Sklizeň hroznů byla donedávna nejméně mechanizovaná práce na vinici [1]. Hrozny se odšťihovaly pouze **ručně**. Předsklizeň a odstupňovaná sklizeň se provádí pouze ručně. Hrozny se sklízí do kbelíků a z nich se sypou do větších nádob (beden, kontejnerů, přívěsů) U malovýrobců z finančních důvodů převládá ruční sklizeň [2].

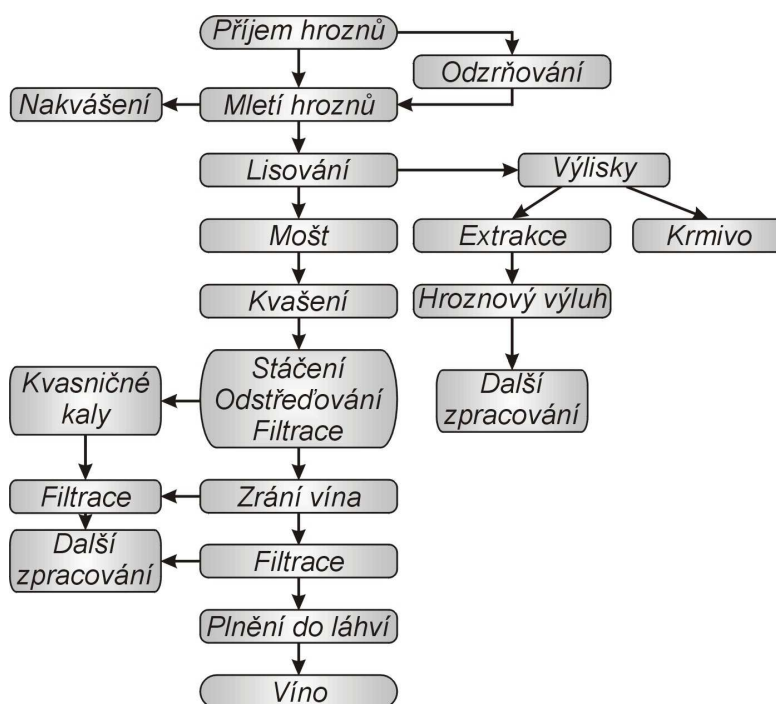
Ve velkých podnicích se v důsledku stoupajících mzdových nákladů, přechází stále více podniků na **mechanizovanou sklizeň**. Používají se návěsné nebo samojízdné sklízeče. Vibrující plastové tyče sklízeče uvedou do pohybu celý keř. V důsledku vibrací dochází pak k oddělení bobulí nebo celých hroznů. Listy a třapiny jsou odstraněny proudem vzduchu z ventilátoru. Pro mechanizovanou sklizeň je třeba mít připravenou vinici, tzn. zejména pevnou opěrnou konstrukci a speciální řez keřů [2].

---

<sup>1</sup> U nás se cukernatost vyjadřuje ve °NM (stupních normovaného moštoměru), které udávají kolik kg cukru je ve 100 litrech moštu při 15 °C.

### 2.1.3. Výroba vína

Hrozny by měly být dopraveny z vinice do místa zpracování nepoškozené. Důvodem je možná nekontrolovaná oxidace a vyluhování stejně jako nežádoucí mikrobiologický vývoj. Na předčasné rozdrčení bobulí má vliv výška vrstvy hroznů, dopravní vzdálenost a otřesy při dopravě [2].



Obrázek 2: Schéma výroby přírodních vín

Ke zpracování se přijímají celé hrozny, rozdrčené hrozny nebo rmut či mošt [2]. Hmotnost se zjišťuje na poloautomatických vahách, automatických vahách, popř. mostových vahách (zjišťuje se rozdíl hmotnosti povozu s hrozny a prázdného povozu) [1]. Pro dopravu hroznů je vhodný také pásový dopravník, na kterém se hrozny mohou třídit. Vhodnější je ale třídění již při sklizni na vinici [2].

#### 2.1.3.1. Zjišťování cukernatosti

Současně s vážením a kvantitativní přejímkou hroznů se určuje i jejich jakost, tj. třída, odrůda a obsah cukru, popřípadě kyselin, které slouží jako ukazatele při stanovení ceny [1].

Běžně se nestanovuje chemicky přímo cukr, ale relativní hustota moštu. K zjišťování cukernatosti (°NM) slouží speciální moštoměry, kterých se používá několik druhů. Principiálně, čím je nižší hustota tekutiny (tzn. čím méně obsahuje mošt cukru), tím hlouběji se potopí moštoměr [2].

V automatizovaných linkách se cukernatost moštu zjišťuje zpravidla refraktometricky. Světlo je tím více lámáno, čím hustší (cukernatější) tekutinou prochází. Na stanovení refrakce stačí velmi malé množství moštu [1].

Zákon o vinohradnictví a vinařství 321/2004 Sb. rozděluje vína do několika kategorií podle cukernatosti hroznů (viz. tabulka 1) [3].

**Tabulka 1: Dělení vín podle cukernatosti hroznů**

<b>Kategorie vín podle cukernatosti hroznů</b>	<b>Cukernatost (°NM)</b>
Rékové víno stolní	11
Rékové víno jakostní (známkové, odrůdové)	15
Predikátní vína (s přívlastkem)	
Kabinet	19
Pozdní sběr	21
Výběr z hroznů	24
Výběr z bobulí	27
Slámové víno	27
Ledové víno	27

### **2.1.3.2. Zpracování hroznů**

Způsob zpracování hroznů a získávání moštu ovlivňuje kvalitu výsledného produktu z 80 % [2].

Mezi první operace patří **odstopkování a mletí hroznů**. Odstopkováním se rozumí oddělení bobulí od třapin. I když třapiny mají drenážní účinek při lisování hroznů, a tím usnadňují odtok moštu, zelené stopky dodávají moštu nepříjemné trávovité chuťové látky. Při mechanizovaném odstopkování na odzrňovačích jsou hrozny dopravovány ostnatým válcem po sítu, bobule propadají sítím a třapiny vypadávají na konci válce. Ke zpracování hroznů se nejčastěji používají mlýnkoodzrňovače, které kombinují odstopkování a mletí hroznů [2].

**Přídavek oxidu siřičitého** způsobuje útlum oxidačních enzymů, divokých kvasinek a bakterií a také způsobuje vyvázání vzdušného kyslíku. Čím dříve se tento přídavek uskuteční, tím lépe bude rmut chráněn před účinky vzduchu, zabrání se hnědnutí a podpoří se vývoj buketu a čistých tónů vína. Síření se nejčastěji provádí pomocí prášku – pyrosulfitu draselného (disiřičitan draselný), nejjednodušeji přímo na hrozny, aby během odstopkování a drcení došlo ke vzájemnému promísení.

Před oxidací lze možné hrozny chránit i pomocí **CO<sub>2</sub>**. Vytlačení kyslíku z rmutu dávkou alespoň 2 g·l<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> může být snížena oxidace, a tím sníženo nebo zcela vypuštěno síření [2].

**Ponechání rmutu v nádobě** před lisováním umožňuje vyluhování látek obsažených ve slupkách, čímž se zvyšuje obsah extraktu a barviv, a též umožňuje odbourávání pektinů pomocí enzymů obsažených v hroznech. Provádí se to hlavně u aromatických bílých odrůd [2].

Do rmutu lze přidat i **pektolytické enzymy**. Pektiny tvoří kostru bobulí a jsou štěpeny příslušnými enzymy, pektinázami. Podporou štěpení pektinů lze zvýšit výlisnost a zkrátit dobu naležení rmutu. Při nakvášení modrých hroznů se zvyšuje uvolňování červeného barviva. Nevýhodou však je, že se hrozny musí rychle vylisovat [2].

### **2.1.3.3. Získávání moštu**

Mošt se získává využitím tlaku v lisech. Podstata lisování spočívá v tom, že se pracuje pomalu, a především s nízkým tlakem, aby měl mošt dostatek času odtéci z rmutu. Je dán maximální tlak, aby se zrníčka nerozdrtila. Tlak se zvyšuje teprve na závěr lisování.

Horizontální lisy jsou všeobecně rozšířeny, s vertikálními lisy se můžeme setkat u menších producentů vína. Otáčející se koš z plastu, nerezů nebo pokovované oceli obsahuje zařízení k automatickému rozdrobení vzniklého koláče.

Větší lisy jsou zpravidla vyráběny s uzavřeným lisovacím košem, což omezuje oxidaci moštu. Lze také provést naležení rmutu přímo v lisu. Během stáčení rmutu se koš nepohybuje, a tím je využíváno filtračního účinku matolinového koláče. Díky nízkému tlaku probíhá velmi šetrné lisování [2].

Kolik moštu se získá ze 100 kg hroznů, závisí na odrůdě, ročníku, vyzrálosti a způsobu lisování. V průměru lze počítat se 75 – 80 litry moštu.

Při běžném lisování rmutu vznikají tři frakce:

**Scezený mošt** (40 – 60 %): Odtéká volně z lisu, takovému moštu se říká samotok a je nejcennější frakcí.

**Lisovaný mošt** (40 – 60 %): Získává se užitím tlaku a mísí se se scezeným moštem.

**Dolisek** (10 %): Vyšším tlakem se poškozují slupka bobulí a případně i pecičky. Při získávání kvalitních druhů vín by měla být tato frakce zpracovávána samostatně [2].

#### 2.1.3.4. Úprava moštu

Během krátkého období mezi sklizní a kvašením se používají postupy, rozhodující o budoucím charakteru a kvalitě vína. Důležitou částí je přitom úprava moštu [2].

Jedním z nich je **provzdušnění** moštu, které podporuje množení kvasinek, a tím kvašení, ale zvyšuje i vliv nežádoucích mikroorganismů, čímž se zvyšuje nebezpečí vad vína. Zdravý mošt se zpravidla neprovzdušňuje. Tato úprava je prováděna v případě přesířeného moštu a při lisování modrých hroznů za účelem získání bílého vína tzv. klaretu. [2].

Další možnou úpravou je **síření moštu**. V zásadě by měl být rmut, případně i hrozny sířeny tak, aby v moštu byl obsah volného SO<sub>2</sub> přibližně 20 – 25 mg·l<sup>-1</sup>. Další síření moštu je nutné pouze v případě dalšího stání moštu a velmi vysokých teplot při sklizni [2].

**Odkalení** patří k nejdůležitějším postupům, jak získat čisté víno bez postranních tónů ve vůni a chuti. Mošt odtékající z lisu obsahuje ještě řadu nežádoucích látek, jako pecičky, slupky, dužinu, půdu, rezidua pesticidů atd. Ty by měly být v každém případě odstraněny ještě před zahájením kvasného procesu. Naprosto nezbytné je odkalení nahnílených a znečištěných hroznů. V současné době se doporučuje snížit obsah kalů na maximálně 0,6 % objemu. Od 1 % jsou patrné nečisté tóny ve víně. Snížením množství kalů a počtu nežádoucích zárodků se vytvářejí předpoklady pro klidné kvašení. Odkalení lze provést jak diskontinuálně tak kontinuálně [2].

V létech s příznivými meteorologickými podmínkami mají hrozny většinou přiměřenou kvalitu a není nutné je upravovat. V létech nepříznivých je nutné **upravit cukernatost moštu**. Kvalita moštu a budoucího vína se posuzuje zejména podle poměru obsahu cukru a kyselin v hroznech. Z moštů s nízkou cukernatostí vznikají po vykvašení slabá a neharmonická vína, která se obtížně udrží delší dobu nepoškozená, neboť podléhají nežádoucím mikrobiologickým změnám [1].

Úprava cukernatosti **sacharózou** musí respektovat odrůdový charakter moštu a vína. Mošt se má přislažovat před začátkem fermentačního procesu. Na zvýšení cukernatosti o 1 °NM je třeba na 100 l moštu přidat 1,1 kg cukru. Mošty modrých odrůd zásadně doslazujeme před jejich kvašením, protože vyloučení červeného barviva ze slupek je do jisté míry závislé na obsahu alkoholu při kvašení rmutů [2].

Zákon o vinohradnictví a vinařství 321/2004 Sb. přímo udává o kolik se mošt může přisladit. Dle ustanovení § 13, odstavce zákona musí výrobce ohlásit SZPI nejméně 48 hodin předem svůj záměr zvyšovat obsah přirozeného alkoholu zvýšením cukernatosti moštů a rmutů. Ve vinařské zóně A (Čechy) se při výrobě vína stolního, tedy i zemského může zvyšovat přirozený obsah alkoholu přislažením moštu pouze o 5,9 °NM a to u bílých vín do maximální

horní hranice 19,3 °NM a u červených vín 20,2 °NM. Ve vinařské zóně B (Morava) se při výrobě vína stolního, tedy i zemského může zvyšovat přirozený obsah alkoholu (přislazovat mošt) pouze o 4,2 °NM a to u bílých vín do maximální horní hranice 20,2 °NM a u červených vín 21 °NM. Při výrobě vín jakostních, odrůdových a známkových lze na Moravě zvyšovat přirozený obsah alkoholu o 4,2 °NM. Příklad: Sklizené hrozny mají cukernatost 19 °NM, pak výrobce může upravit mošt nebo rmut maximálně na 23,2 °NM [3].

Pro úpravu moštů a vín se používá rovněž **zahuštěný mošt** získaný ve vakuových odparkách. Mošt se zde při teplotě 60 – 70 °C zahustí asi na jednu třetinu původního objemu. Vychlazený zahuštěný mošt se přidá do celého množství moštu. Při tomto zlepšování je potřeba znát složení zahuštěného moštu, zejména obsah cukru.

Cukernatost lze upravit i **přímým zahuštěním**. Tato metoda je vhodná pro mošty s nízkou cukernatostí, kdy se částečně zkoncentruje cukr, extrakt a kyseliny.

Kvalita hroznového moštu se může zvýšit i částečným **vymrazením vody**. Zahušťování moštu ochlazováním má na složení moštu stejný vliv jako na zahušťování při vyšších teplotách. Určitý rozdíl je v moštích s vyšším obsahem kyseliny vinné, která se ochlazováním vysráží v podobě kyselého vínanu draselného, takže ve vyrobeném víně není obsah kyselin zvýšen úměrně se zahuštěním.

Neposlední technikou je i **zahušťování moštu reverzní osmózou**. K zahušťování moštu se použije polopropustná blána, vyrobená z acetátu celulosy. Blána vodu z roztoku propouští, ale látky v roztoku rozpuštěné zadržuje [1].

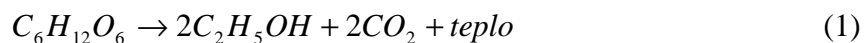
#### 2.1.3.5. Kvašení moštu

Ve vinařství se používají kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (*S. vini*, *S. ellipsoideus*) s různými názvy podle místa původu. Stále více se používají i ve formě ASVK – aktivovaných sušených vinařských kvasinek. Dříve se využívalo především **spontánní** kvašení způsobené kvasinkami ulpělými na povrchu hroznů. Dnes se používá i **čisté nebo-li řízené** kvašení. Zákvas se připravuje v množství 1 % veškerého moštu namnožením vhodné rasy vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu [4].

Podle kvasného výkonu a vzhledu se rozlišují kvasinky:

**Velmi dobře kvasící:** Vytvářejí hodně alkoholu a hodně pozitivních vedlejších produktů. Označují se jako ušlechtilé vinné kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*.

**Slabě kvasící:** Nacházejí se v moštu od přírody, jsou označovány jako divoké kvasinky. Od 3 až 4 % obj. alkoholu jejich činnost ustává [2].



#### Rovnice kvašení

Kvašení probíhající ve vertikálních či horizontálních tancích má tři fáze:

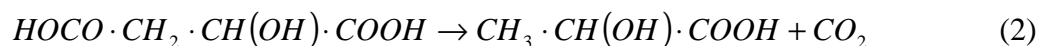
**Začátek kvašení** je charakteristický pozvolným rozmnožováním kvasinek a pomalým nástupem prokvašování cukrů moštu a trvá 2 – 3 dny.

**Bouřlivé kvašení** nastává 3 – 4 den a projevuje se vývinem tepla, zvýšením teploty až nad 25 °C a uvolňováním oxidu uhličitého, který strhává i aromatické a těkavé buketní látky. V této fázi kvašení se musí regulovat teplota v rozmezí 15 – 18 °C a u chladnomilných ras

kvasinek v rozmezí 10 – 12 °C . Bouřlivé kvašení trvá několik dnů až týdnů. Kvasí-li se při nižších teplotách trvá kvašení déle, ale vyrobená vína jsou kvalitnější.

**Dokvašování** je poslední fáze kvašení, která nastává po poklesu obsahu cukru na 2 – 5 g·l<sup>-1</sup> a trvá 1 – 2 měsíce, někdy i půl roku. Činnost kvasinek se postupně omezuje, až zcela ustane. Po ukončení kvašení a zastavení vývinu CO<sub>2</sub> počnou kvasinky sedimentovat na dno tanku a usazují se i kaly [4].

V období od ukončení alkoholového kvašení do stáčení vína z kvasničných kalů probíhá tvorba révového vína (formování vína). Probíhají při ní různé biologické a fyzikálně chemické procesy, tzv. **biologické odbourání kyselin BOK** (jablečno – mléčné kvašení a ostatní biochemické přeměny kyselin). Tyto biochemické procesy jsou doprovázeny vylučováním vinného kamene ve formě vinanu vápenatého a hydrogenvinanu draselného a procesy **samočištění vína** při nichž se srážejí a sedimentují shluky molekul opačného náboje organického a anorganického charakteru. Víno se pozvolna samovolně čistí. Čištění vína lze urychlit čeráním. BOK je proces, při němž se působením bakterií, především mléčného kvašení, mění kvalitativní i kvantitativní poměry kyselin ve víně. Chuťově méně příznivé kyseliny jablečná, citrónová a další se přeměňují na kyselinu mléčnou a další produkty, které poskytují vínu jemnější chuť a zlepšují jeho stabilitu. Jsou to procesy nezbytné zejména pro bílá vína, v menším rozsahu i pro aromatická bílá vína. Většina našich vín vyžaduje BOK [4].



kyselina jablečná

kyselina mléčná

#### ***Biologické odbourávání kyselin***

Dokvašené víno se odděluje od sedimentu kalů a kvasinek stáčením do čistých zasířených tanků. Při prvním stáčení se víno obvykle provzdušní a nastane další vysrážení kalů, především tříslobílkovinných. Proto se po 6 – 8 týdnech víno stáčí znovu. Po ukončení kvašení vzniká **mladé víno** [4].

#### ***2.1.3.6. Ovlivnění průběhu kvašení***

Intenzita kvašení je ovlivněna řadou fyzikálních, chemických a biologických činitelů. Mezi fyzikální činitele patří kromě jiného i koncentrace cukrů. Mošty s obsahem cukru 15 – 18 hm. % kvasí lépe než mošty s vysokou cukernatostí. Při koncentraci cukru 28 – 30 % kvašení probíhá, ale výrazně se zpomalí až zastaví již při dosažení 5 – 8 % obj. alkoholu. Proto je nutné při kvašení moštů s vysokou koncentrací cukru, jako např. pozdní sběry, výběry z bobulí, tokajská vína, používat osmotolerantní kmeny kvasinek (vlastnost, která umožňuje dobrou prokvašovací schopnost a odolnost proti vyšší koncentraci cukru) [5,6]. Francouzští vinaři doporučují zkvašování moštů s vysokou koncentrací cukrů pomocí sdružené tzv. dvojité kultury kvasně málo virulentních *Saccharomyces rosei* s osmotolerantním kmenem *Saccharomyces cerevisiae* a dalšími [7].

#### ***2.1.3.7. Zachování zbytku cukru ve víně***

I když se v poslední době zvýšil zájem o suchá vína, je ještě stále snahou vyrábět vína se zbytkem nezkašeného cukru, který víno zjemní a zakulatí. Cukerný zbytek ve víně lze získat přerušáním kvašení moštu. K tomu je zapotřebí, aby mošt obsahoval alespoň 24 kg

cukru na 1 hl. Kvašení moštu by mělo probíhat pomalu a jakmile mošt prokvasí na potřebné objemové procento alkoholu, kvašení se přeruší, víno se stočí z kalů a silně zasílí. Tím se kvašení zastaví a víno se začne čistit. Po částečném zrání, čiření a filtraci je nutno víno stabilizovat, aby se zabránilo druhotnému kvašení v láhvi. Zbytkový cukr lze ve víně udržet teplem a chladem, ale je potřeba zabránit činnosti kvasinek a mikroorganismů. Nejúčinnějším způsobem je pasterizace. Zahřátím na 70 °C a následným ochlazením na teplotu pod 0 °C se zabrání mikrobiální činnosti [8].

### 2.1.3.8. Ošetřování a školení vína

Ošetřování vína vytváří konečné a sensorické vlastnosti a celkový charakter vína. Mladá vína ze severních oblastí, tedy i od nás, jsou po ukončení hlavního kvašení stále kyselá (zvláště v nepříznivých letech), i když se jejich kyselost zmírnila vysrážením solí kyseliny vinné. Podstatné snížení kyselosti, především kyseliny jablečné, se však dosáhne až po BOK. Po kvašení se víno ukládá do zasířených ležáckých tanků, cisteren nebo do dřevěných sudů. Ležácké nádoby se dolévají vínem, aby byly stále plné, a tím se zamezilo přístupu vzduchu a následné oxidaci vína. Dolévá se vínem stejné odrůdy. Víno ležením v tancích zraje. Při stálé a nízké teplotě v ležáckém sklepě dochází k vytváření buketu a k harmonickému vyrovnání sensorických vlastností – vůně a chuť se zaokrouhlují. Doba zrání závisí na mnoha faktorech, jako je odrůda a ročník vína, teplota, přístup kyslíku, materiál a velikost tanků aj. Bílá vína zrají optimálně půl až dva roky [4].

Školení vína se provádí před plněním do láhví a zahrnuje čiření, stabilizaci, pasteraci a filtraci. K **čiření vína**, pokud neproběhne v dostatečné formě samovolně, se používá srážecích prostředků, např. želatina a kasein, které se ve víně srážejí přítomnými nebo přidanými tříslovinami. Ke **stabilizaci** vína se používají adsorpční prostředky, např. bentonit, polyamidy a agar, na něž se koloidní složky vína adsorbují. Víno lze stabilizovat též chladem, neboť silné podchlazení vína pod 0 °C snižuje rozpustnost hydrogenvinanu draselného, který vypadá z vína ve formě krystalků. **Pasterace** vína se provádí krátkodobým ohřevem na 60 – 70 °C v deskových průtokových výměnících tepla a následným rychlým ochlazením. K **filtraci** vína se používají nejčastěji deskové nebo naplavovací křemelinové filtry, a v moderních vinařských provozech se zavádí „cross – flow“ filtrace<sup>2</sup> a membránové filtrace. Místo filtrů lze použít též vysokoobrátkové kalové odstředivky [4].

Po skončení školení, kdy je víno optimálně vyzrálé a je ukončen proces tvorby aroma a chuti vína, což většinou trvá nejdéle jeden rok, se provádí závěrečné úpravy hotového vína a poté se víno plní do láhví či jiných expedičních obalů. Závěrečné úpravy hotového vína zahrnují scelování vína, úpravu koncentrace zbytkového cukru, ethanolu a kyselin, odkyselování či okyselování vína, alkoholizování vína a osvěžování vína. **Scelováním vína** se dosahuje sjednocení a standardizování kvality jednotlivých partií podle požadavků na sensorické vlastnosti a obsah nejdůležitějších složek, zejména zbytkového cukru, koncentrace ethanolu a kyselin. Dodatečné **odkyselování** se provádí vysrážením vína přídatkem uhličitanu vápenatého nebo speciálních směsí různých anorganických solí.

---

<sup>2</sup> Cross flow filtrace je membránový proces, při němž zpravidla silně znečištěné kapaliny, např. mošt po lisování se separují od kalicích částic. Při ní současně s odfiltrováním číreho moštu se tangenciálně pohybující filtrovaný mošt odplavuje pevné částice, které by jinak velmi rychle ucply póry membrány. Vedle moštu se takto filtrují také silně zakalená vína ihned po dokvašení.

Dodatečné **okyselování** vína lze provést přidavkem povolených potravinářských kyselin (vinné, citrónové, mléčné), sádrováním či fosfátováním vína. Barvení a odbarvování vína lze u přírodních vín provádět pouze v rámci technologických zákroků. **Alkoholizování vína** je povoleno pouze u dezertních vín. **Osvěžování vína** se provádí sycením vína CO<sub>2</sub> [4].

Hlavním požadavkem při **plnění vína do obalů** je, aby víno bylo dostatečně vyzrálé a vyškolené, aby nemělo sklon k tvorbě zákalů a nedocházelo u něho k dodatečným změnám sensorických vlastností. K plnění vína se využívají lahvárenské linky. U nás se plní víno nejčastěji do skleněných láhví o objemu 0,5; 0,7; a 1,0 litr. Stolní vína se plní i do papírových krabic a PET lahví [4].

## 2.2. Látkové složení vína

Víno obsahuje látky, jež jsou původní součástí moštů nebo rmutů, látky vznikající při kvašení a látky cizorodé, které se dostávají do vína v průběhu technologického procesu. K původním součástem moštů se řadí především voda, cukry, kyseliny, třísloviny, dusíkaté látky, minerální látky, barviva, enzymy, vitamíny a látky tvořící chuťové a aromatické složky vína [9].

### Voda

Obsah vody v moštu se pohybuje od 70 až 80 %. Vysoký obsah vody v moštu je však nežádoucí a je nutné ho zredukovat přirozenou cestou, důkladným dozráním hroznů. V klimaticky nepříznivých letech je možné část vody z moštu odpařit ve vakuových odparkách nebo odstranit vymrazováním [1].

### Kyseliny

Z organických kyselin je ve víně obsažena hlavně kyselina vinná a jablečná. Kyselost vína se vyjadřuje jako obsah titrovatelných kyselin, přepočítaných na kyselinu vinnou. Průměrné ročníky mají 6 až 12 g kyselin na litr moštu, u špatných ročníků může obsah titrovatelných kyselin stoupnout až na 20 g·l<sup>-1</sup>. Při různé kyselosti moštů kolísá obsah kyseliny jablečné od 13 do 1 g·l<sup>-1</sup>, zatímco obsah kyseliny vinné se pohybuje konstantně kolem 6 g·l<sup>-1</sup>. Při kvašení se mění obsah kyseliny vinné v důsledku vypadávání vinného kamene jen nepatrně. Obsah kyseliny jablečné, která se rychle oxiduje, klesá během kvašení i po něm. Kyselina citrónová obsažená v moštech jen v nepatrném množství se rychle při kvašení rozkládá vlivem mikroorganismů. Množství kyseliny citrónové v moštech dosahuje hranice 0,15 – 0,70 g·l<sup>-1</sup>. Ve velmi malých množstvích se našly v moštu tyto kyseliny: kyselina jantarová, glykolová, fumarová, šťavelová a z těkavých kyselin kyselina mravenčí a octová [9,10].

### Sacharidy

Po zastavení kvašení zůstává část cukrů neprokvašena [1]. Podle obsahu tohoto zbytkového cukru dělíme vína do 4 skupin [3].

**Tabulka 2: Kategorie vín dle obsahu cukru**

Označení vína	Obsah zbytkového cukru na litr vína
suché	nejvýše 4 g
polosuché	4,1 – 12 g
polosladké	12,1 – 45 g
sladké	min. obsah 45 g

Glukóza a fruktóza se během kvašení přeměňují rozdílnou rychlostí. Poměr mezi glukózou a fruktózou, který je u většiny hroznových moštů (1:1), se během kvašení mění ve prospěch fruktózy, která ve víně působí sladší dojem. Glukóza je kvasinkami zpracovávána dříve a více (glukofilní projev kvasinek) a upřednostňuje ji také řada mikroorganismů (např. *Bortrytis cinerea*). V malém množství obsahuje víno i pentózy (arabinózu, xylózu, rhamnózu), které jsou ale nezkrasitelné, jejich obsah ovlivňuje hodnoty při analytickém stanovení cukrů o 0,5 – 1 g·l<sup>-1</sup> [2]. Jestliže byl mošt přislazen sacharózou, zůstává velmi malý podíl sacharózy i v hotovém víně [13].

Cukry ve víně se podílejí na celé řadě reakcí. Jednou z nich je např. tvorba furalových derivátů jako výsledků interakcí arabinózy a xylózy s organickými kyselinami při vyšších teplotách během kvašení moštů. Nevylučuje se ani jejich vznik pomocí katalytických účinků enzymů [14]. Obsah sacharidů ve víně je uveden v tabulce 3 [12].

**Tabulka 3: Množství sacharidů ve víně**

	Sacharid	Množství (mg.l <sup>-1</sup> )
monosacharidy	glukóza	56-25000
	fruktóza	93-26500
	arabinóza	1-262
	xylóza	0,6-146
	rhamnóza	2,2-121
	mannóza	2-37
	galaktóza	6,3-249
	ribóza	6,3-62
	fukóza	2-9
oligosacharidy	trehalóza	0-61
	cellobióza	2-7
	maltóza	1-5
	sacharóza	0
	laktóza	1-5
	melibióza	stopy-1
	rafinóza	0-1

### Alkoholické cukry

Obsah alditolů ve vínech bývá často vyšší nebo stejný jako v mošttech, závisí např. na druhu kvasinek. Vyšší množství mannitolu ve vínech (1 – 30 g.l<sup>-1</sup>) může způsobit napadení hroznů plísní *Bortrytis cinerea* nebo baktériemi *Bakterium manniptoenum*, způsobující mannitolové kvašení. Ve vínech jsou přítomny především tyto alkoholové cukry: erythritol, D – arabitol, xylitol, D – mannitol, D – glucitol [12].

### Pektiny

Jsou obsaženy v malém množství v mošttech, kde mohou ztěžovat jejich čiření, jež je nutné při zpracování ne zcela zdravých hroznů. Jsou to deriváty kyseliny polygalakturonové, jejíž karboxylové skupiny jsou esterifikovány methanolem. Kvašením se hydrolyzují, takže ve vínech jsou obsaženy jen ve velmi malém množství. Při odbourávání pektinů vzniká kromě jiných látek i malé množství methanolu. Z ostatních glycidů jsou obsaženy ve víně i pentózy a pentózany [9].

### Dusíkaté látky

Jde v podstatě o sloučeniny bílkovin, aminokyseliny a amonné sloučeniny. Představují látky důležité pro výživu kvasinek [2]. Obsah těchto látek vznikajících při autolýze kvasinek má velký význam pro tvorbu chuťových a aromatických látek [9].

### Vitamíny

Víno obsahuje vitamíny skupiny B, bioflavonoidy a v malém množství také vitamín K a C. Obsah vitamínů, zejména vitamínů skupiny B, je obvykle značně vyšší v mladém víně a během skladování vína klesá. Vitamin C (L – askorbová kyselina) – jeho obsah je velmi nízký, protože během zpracování moštu je kyselina askorbová oxidována na nestálou dehydroaskorbovou kyselinu. V moštu a víně má podobný účinek jako oxid siřičitý, který zabraňuje oxidaci vína. Po ukončení kvašení víno obsahuje 5 – 10 mg.l<sup>-1</sup> vitamínu C [1].

### Třísloviny

Třísloviny ve víně, zvané také oenotannin, jsou směsí chemicky příbuzných látek, skládajících se z fenolů a katechinů a vysokomolekulárních taninů. Jsou obsaženy hlavně

v třapínách a ve slupkách bobulí. Ovlivňují hořkost, stahující pocit v chuti, jímavost kyslíku i průběh stárnutí moštu a vína. Obsah tříslovin v bílém víně se pohybuje pod hranicí 200 mg·l<sup>-1</sup>. U červeného vína je jejich obsah třikrát až desetkrát vyšší. Nalezení rmutu a silnější lisování podporuje zvyšování obsahu těchto látek [2]. Oenotanin tvoří s bíkovinami ve víně sraženiny a přispívá tak k samočištění vína. Pro vinaře mají tyto látky význam zejména kvůli barvě a nahořklé a svíravé chuti, kterou vínu dodávají. Mohou dodat hroznům žádoucí červenou nebo modrou barvu, ale také mohou přispět k enzymatickému hnědnutí, které je nežádoucí [1].

### **Barviva**

Z barviv obsahuje víno zbytky zeleného barviva chlorofylu, příbuzné červené barvivo karotin a žluté xantofyl, obsažená původně ve slupkách bobulí. Tato barviva dodávají bílým vínům různé odstíny zelenkavé až žluté barvy. Vyšší obsah chlorofylu může vínům udělit nečistou trávni chuť a rovněž barvu mění na žlutou až hnědou. U červených vín jsou tato barviva zakryta červenými anthokyanovými barvivy. Červené barvivo oenin patří z chemického hlediska také mezi anthokyany. Červené nebo modré barvivo se nachází ve slupkách bobulí uvnitř tříslovinných plastidů. Barva antokyanů závisí na kyselosti prostředí. Červená vína s vyšším obsahem kyselin mají světlejší barvu a vína s nižším obsahem kyselin mají barvu tmavě červenou. Červená vína s vyšším obsahem tříslovin mají tmavší rubínově červenou barvu. Při jejich stárnutí se antokyany rychleji rozkládají a barva vín se mění na cihlově červenou [9,12].

### **Alkohol**

Hlavním alkoholem ve víně je ethanol, tvoří se při kvašení moštů rozkladem cukru kvasinkami. Maximální koncentrace ethanolu, kterou můžeme dosáhnout kvašením, je 16 – 18 %. Vyšší obsah alkoholu zajišťuje vyšší stabilitu vína proti kvasničným zákalům i různým bakteriálním onemocněním. Ethanol podstatně ovlivňuje charakter a chuť vína. Jeho obsah je jedním z hlavních ukazatelů při posuzování jakosti a při kontrole vína [1]. Víno obsahuje v malých množstvích také methanol, vyšší alkoholy a polyalkoholy nebo cukerné alkoholy. Při kvašení vzniká i malé množství glycerolu, který zjemňuje chuť vína a ovlivňuje příznivě i jeho plnost [9].

### **Aromatické a buketní látky**

Tyto látky jsou důležité při sensorickém hodnocení vína. Tvorba aromatických látek je podmíněna určitými činiteli, jako je teplota, zrání hroznů a jejich zdravotní stav. Jednotlivé odrůdy révy vinné se vyznačují charakteristickým buketem a aromatem. Na vývoj aromatických látek v hroznech má vliv i přítomnost ušlechtilé plísně *Botrytis cinerea*, která někdy zcela eliminuje odrůdový buket [1]. Rozlišuje se primární buket (aromatické látky z hroznů), sekundární buket (aromatické látky vzniklé kvašením) a terciární buket (změny během dlouhodobého zrání) [2].

### **Cizorodé látky**

Prakticky stálou součástí vína je volná i vázaná kyselina siřičitá, která se jako výborný antioxidant a částečně i konzervační prostředek používá při školení vín. Maximální obsah kyseliny je dán zákonnými předpisy. Pokud nejsou tyto povolené hodnoty překročeny, není možné kyselinu siřičitou ve vínech obvykle sensoricky rozpoznat. V opačném případě se jedná buď o víno čerstvě sířené nebo přesířené [9].

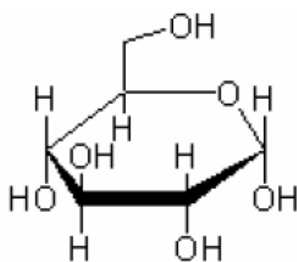
## 2.3. Sacharidy

Sacharidy jsou polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, které v molekule obsahují minimálně tři alifaticky vázané uhlíkové atomy. Označujeme tak i sloučeniny, které se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za vzniku acetalových vazeb a dále sloučeniny vzniklé ze sacharidů redukčními nebo jinými reakcemi. Sacharidy dělíme podle počtu cukerných jednotek na monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy a složené sacharidy [12].

Mono- a disacharidy jsou bezbarvé, pevné nebo sirupovité látky, které se dobře rozpuštějí ve vodě, ale jsou nerozpustné ve většině organických rozpouštědel. Analyticky se sledují celkové sacharidy, redukující sacharidy a jednotlivé druhy sacharidů. Pro stanovení se využívá reaktivita  $-OH$ ,  $-CHO$  a  $-CO$  skupin s chemickými činidly za vzniku různě zbarvených oxidačních nebo redukčních produktů. Ke stanovení se také využívá některých fyzikálních vlastností (optická otáčivost, index lomu), případně některých biologických vlastností (zkvasitelnost, enzymatické změny) [15].

Významné jsou jejich organoleptické vlastnosti (vůně, vzhled, chuť), stejně jako nutriční hodnota sacharidů v potravinářských výrobcích [7].

### 2.3.1. Glukóza

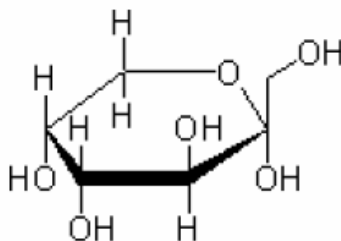


*$\alpha$ -D-glukopyranosa*

Nejrozšířenějším přírodním monosacharidem je D – glukóza (hroznový cukr). Nachází se ve volné formě v četných sladkých plodech, vinných hroznech a včelím medu. [16]. Patří mezi aldohexózy, ve vodném roztoku po ustavení rovnováhy je 36 %  $\alpha$  – pyranózy a 64 %  $\beta$  – pyranózy, oba anomery jsou v židličkové konformaci. Je stavební jednotkou maltózy, laktózy, sacharózy a nejdůležitějších polysacharidů (škrobu, glykogenu a celulózy). Rozpouští se ve vodě, zředěném i koncentrovaném ethanolu, methanolu, pyridinu, acetonu a kyselině octové. Bod tání se pohybuje v rozmezí od 141 °C do 150 °C. Hustota, refrakce a viskozita roztoků glukózy je blízká hodnotám roztoků sacharózy. Technicky se vyrábí kyselou a enzymovou hydrolýzou bramborového a kukuřičného škrobu, nebo dvoustupňovým procesem ze dřeva [1].

Glukóza otáčí rovinu polarizovaného světla doprava. Glukóza má redukční vlastnosti, čehož se využívá při analytickém stanovení. Kvasinky zkvašují glukózu přímo na ethanol a  $CO_2$  [1]. Glukóza je nejvýznamnější surovinou pro výrobu ethanolu kvašením. Enzymem glukosaisomerázou může být glukóza přeměněna na mnohem sladší fruktózu. Toho se využívá při výrobě tzv. fruktózového sirupu, který se používá v potravinářství. Chemický a farmaceutický průmysl využívá D – glukózu především na výrobu D – glukonové kyseliny, D – glucitolu (sorbitolu) a na něj navazující výrobu L – askorbátu. L – glukóza nebyla dosud nalezena v přírodě, získává se synteticky [17].

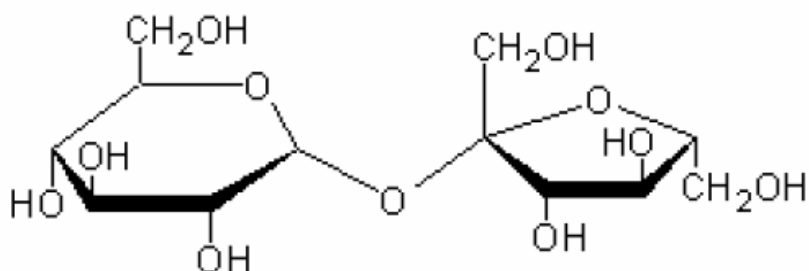
### 2.3.2. Fruktóza



*$\alpha$ -D-fruktopyranosa*

Fruktóza je nejrozšířenější ketohexóza a nejsladší přírodní cukr. Jako všechny významné monosacharidy existuje v přírodě téměř výhradně v konfiguraci D; otáčí však rovinu lineárně polarizovaného světla vlevo, proto se pro ni používá tradiční synonymum levulóza. Vyskytuje se v různých rostlinných šťávách a v medu. Je stejně jako glukóza složkou sacharózy. Fruktóza obtížně krystalizuje, a získává se proto většinou ve formě sirupovité kapaliny. Je dobře rozpustná ve vodě. Kvasinky zkvašují fruktózu přímo na ethanol a CO<sub>2</sub>, je však hůře zkvasitelná než glukóza [1]. Používá se ke slazení nápojů a ovocných sirupů. V omezené míře je přijatelná pro diabetiky. [17].

### 2.3.3. Sacharóza



*$\beta$ -D-fruktofuranosyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid*

Sacharóza je nejvýznamnějším zástupcem neredukujících disacharidů, složený z monosacharidů glukózy a fruktózy. Je velmi dobře rozpustná ve vodě, krystalizuje jako bezvodá a její bod tání kolísá od 160 °C do 180 °C v závislosti na její čistotě. Je relativně nestálá proti záhřevu a kyselinám, jejich vlivem dochází k inverzi. Při 190 °C až 200 °C karamelizuje na hnědou amorfnní látku, která je v alkoholu snadno rozpustná. Vodný roztok sacharózy otáčí rovinu polarizovaného světla doprava [1].

Kvasinky nezakvašují sacharózu bezprostředně, ale až po její inverzi enzymem invertázou. Vyskytuje se ve vegetativních částech rostlin, např. v listech a stoncích. V hroznech byla nalezena sacharóza v množství od 0,2 do 1,5 %. Při kvašení redukujících cukrů vzniká totiž přechodně prokazatelné množství sacharózy, kterou kvasinky syntetizují. Enzymem invertázou se však sacharóza znovu mění na invertní cukr.

Sacharóza má zcela jedinečný význam jako surovina a složka mnoha potravin, užívá se jako univerzální sladidlo. Ve vinařství se používá ke zlepšení kvality moštů slabších ročníků zvýšením cukernatosti moštů [17].

## 2.4. Stanovení hlavních sacharidů ve víně

Stanovení sacharidů je komplikováno jejich izomerií. Tak například jenom monosacharidů existuje více než 100, mohou zaujímat různé konformace a mohou být vázány třemi až čtyřmi různými způsoby k jiným monosacharidům. Dále i typ glykosidické vazby může být buď v  $\alpha$  nebo  $\beta$  konfiguraci. Navíc struktura oligo- a polysacharidů může být lineární, cyklická nebo větvená. Možnost existence velkého počtu různých typů sacharidů, které se od sebe jen velmi málo liší, znesnadňuje identifikaci jednotlivých sacharidů ve směsích. Dalším problémem je jejich značná polárnost, netěkavost a také to, že postrádají snadno ionizovatelné skupiny [7].

Ke kvalitativnímu stanovení sacharidů se využívá často oxidace v alkalickém prostředí. Většinou však neprobíhá kvantitativně podle stechiometrických vztahů, neboť při oxidaci dochází mnohdy ke štěpení řady reakčních produktů v různém a nestálém poměru. Na 1 mol sacharidu se při oxidaci spotřebují podle podmínek 2 až 3 atomy kyslíku, proto je třeba pro každou metodu vypracovat speciální přepočítávací tabulky, které respektují podmínky metody [17].

Ke kvantitativnímu stanovení sacharidů bylo vyvinuto několik metod. Mezi ně patří chromatografické metody, spektroskopie, hmotnostní spektrometrie, elektroforetické metody a NMR (nukleární magnetická rezonance) [7].

### 2.4.1. Chromatografické metody

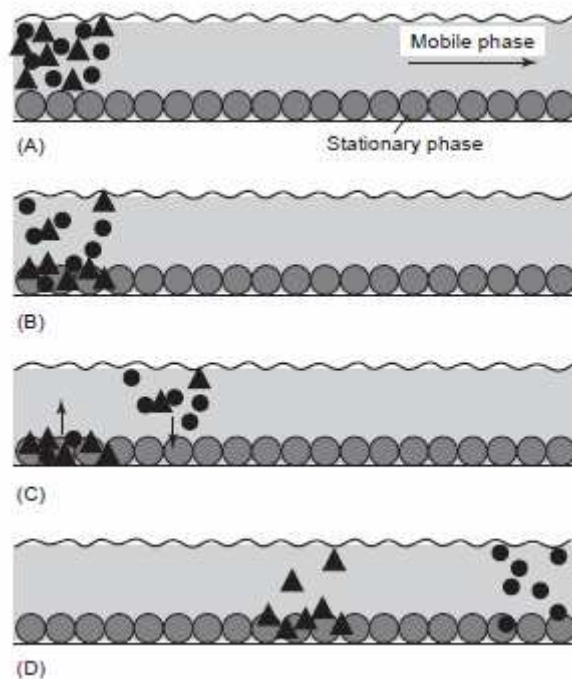
Rozhodující význam pro celou analytiku sacharidů má chromatografie, která umožnila zcela nový přístup k četným důležitým dříve neřešitelným problémům, ať jde o změny v sacharidech vlivem prostředí, enzymatickými a mikrobiálními ději, při výrobě, při fotosyntéze, při metabolismu sacharidů, atd. [17].

Chromatografické metody jsou separační metody, které využívají k dělení složek směsi mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěma fyzikálně odlišnými fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární), druhá fáze je pohyblivá (mobilní). Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně – chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází a také mobilní a stacionární fází. Z makroskopického hlediska může jít o adsorpci, rozpouštění, chemisorpci, srážení, tvorbu komplexů a síťový efekt. Pro chromatografické separace je charakteristické, že výsledné interakce jsou kombinací uvedených procesů, často na jejich rozhraní. Při těchto interakcích se uplatňují různé intermolekulární síly, např. hydrofobní, hydrofilní, elektrostatické, dipól – dipól, atd.

Chromatografické separace umožňují vedle separace komponent také jejich současnou identifikaci a stanovení s použitím standardů. U kolonových technik jsou jednotlivé zóny separovaných komponent vzorku unášeny do detekčního systému. Signály vznikající jako důsledek fyzikální či fyzikálně – chemické vlastnosti komponent jsou registrovány a vyhodnoceny z chromatogramu, který vzniká jako výsledek analýzy. U plošných technik se provádí identifikace často současně s detekcí v ploše separačního systému. K základnímu rozlišení látek se využívá retenčních časů nebo retenčních objemů. Množství chromatografovaných látek (kvantita) se většinou stanovuje podle velikosti ploch pod eluční křivkou, méně často i podle výšky píků [19].

### 2.4.1.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC

Koncem 70. a začátkem 80. let 20. století došlo k velkému rozvoji kapalinové chromatografie a s tím také samozřejmě k rozvoji vysokoúčinné kapalinové chromatografie sacharidů. Tím, že není nutné připravovat těkavé deriváty sacharidů, začala kapalinová chromatografie sacharidů postupně vytěšňovat plynovou chromatografii [18].



**Obrázek 3: Schématické znázornění chromatografické separace**

**A) nástřik vzorku, B) rozdělení mezi dvě fáze, C) molekuly rozpuštěné v mobilní fázi jsou transportovány s malým odstupem, vzniká nová rovnobáha mezi fázemi, D) složky ● a ▲ jsou rozděleny [20]**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie používá kolony s vhodnou stacionární fází, jejíž vlastnosti umožňují dosáhnout rychlé separace složitých směsí látek s vysokým rozlišením zón. Vysoké účinnosti a rychlosti se u této metody dosahuje použitím velkých průtoků mobilní fáze a krátkých kolon plněných náplněmi z velmi jemných částic. K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu 3 – 15  $\mu\text{m}$ , která kladou prostupující kapalině značný odpor, a poměrně vysokých průtoků mobilní fáze. Proto je nutné pracovat při vysokém tlaku 10 – 30 MPa. S využitím průtokových detektorů s citlivou kontinuální detekcí a dávkovacích systémů (nástřikový kohout, autosampler) je HPLC metoda účinná, rychlá a vhodná pro biologické materiály [19].

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, separaci látek a jejich detekci. V tomto uzavřeném chromatografickém systému zajišťuje pohyb eluentu vysokotlaké čerpadlo. Protože je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, je kapalinová chromatografie vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Pracuje se obvykle eluční metodou [22].

#### 2.4.1.2. Kolony využívané pro stanovení sacharidů pomocí HPLC

V kapalinové chromatografii se používají náplňové kolony, které jsou zhotoveny z nerezové oceli. Při chromatografickém stanovení cukrů s nižší molární hmotností, tj. monosacharidů a oligosacharidů, se nejčastěji uplatňuje dělení na katexech, kde jako protiionty jsou vázány kationty kovů, např. vápenaté, stříbrné nebo olovnaté ionty. Další velice častá chromatografická náplň je silikagel modifikovaný aminopropyllovou skupinou. V posledních letech se stala velice populární, avšak finančně náročná chromatografie na anexech, která používá k detekci elektrochemický detektor. Na principu adsorbční chromatografie je cukry také možno separovat na nemodifikovaném silikagelu nebo silikagelu s oktadecylovou vázanou fází, v tom případě je lépe separovat deriváty cukrů [18, 24, 25, 26].

Jako ochrana hlavní kolony jsou hojně používány krátké předkolony umístěné těsně před analytickou kolonu. Chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály [22].

**Tabulka 4: Typy kolon pro HPLC**

Typy kolon pro HPLC	Vnitřní průměr
kapilární	10-100 $\mu\text{m}$
narrow-bore	2 mm
analytické	2 – 10 mm
semipreparativní	10 – 25 mm
preparativní	nad 25 mm
<b>Materiály plášťů kolon</b>	
nerezová ocel	
tvrzené sklo	
Ti-Zr	
PEEK – poly(ether-ether-keton), poly(arylether-ether-keton)	

#### *Chromatografie na katexech*

Katexy, na kterých probíhá separace cukrů, jsou obvykle polystyren-divinylbenzenové kopolymery v  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Na}^+$  a případně v  $\text{H}^+$  cyklu, jako mobilní fáze se používá obvykle destilovaná voda a dělení probíhá při 80 – 90 °C. Vyšší teplota je výhodná především proto, že klesá viskozita roztoků, takže je možno zvýšit průtok mobilní fáze. Stoupá rychlost přenosu hmoty a zvyšuje se rychlost mutarotace, takže nedochází k separaci anomerů.

Vzhledem k tomu, že ionexová pryskyřice vykazuje vylučovací efekt, cukry jsou eluovány v pořadí klesající molární hmotnosti, tj. s nejkratším elučním časem opouštějí kolonu oligosacharidy, potom disacharidy, dále monosacharidy a nakonec alditoly. Při separaci cukrů na katexech není velká možnost ovlivňovat složením mobilní fáze chromatografickou selektivitu a tím výsledek dělení. Avšak tento výsledek je možno ovlivnit a to protiiontem vázaným na katexu. Specifika každé kolony je dána vázaným kationem, který vytváří charakteristické komplexy se sacharidy a tím jejich retenční vlastnosti závisejí na stabilitě tohoto komplexu. Eluční pořadí cukrů v příslušné skupině, např. monosacharidů, závisí proto na konformaci molekuly a konfiguraci –OH skupin v molekule. Tento typ separace je možno označovat jako iontově řízená rozdělovací chromatografie (IMP), někdy také jako ligandová chromatografie [18, 35].

### *Chromatografie na anexech*

Dalším typem chromatografie, který se uplatňuje při dělení cukrů, je chromatografie na anexech. Cukry jsou velmi slabé kyseliny s hodnotou disociační konstanty v rozmezí 12 – 14.

V silně alkalickém prostředí, např. 10 – 200 mM NaOH, jsou cukry částečně nebo zcela ionizovány díky disociaci hydroxylových skupin. Tyto anionty mohou být zadrženy a separovány na silném anexu v hydroxylové formě a jako mobilní fáze se pak používá vodný roztok hydroxidu sodného. Cukry jsou eluovány v pořadí alditoly, mono-, di- a vyšší oligosacharidy. Zvyšování koncentrace NaOH má dvojí protichůdný vliv na retenci. Hydroxylové ionty vytěsňují anionty cukrů z ionexu, což vede ke zkracování retenčních časů, avšak současně stoupá stupeň disociace, což vede ke zvyšování retenčních časů. Tyto dva protichůdné vlivy se vyrovnají v bodě, kdy dojde k úplné disociaci a k eluci cukru. Do mobilní fáze je možné přidávat octan sodný, který zvyšuje iontovou sílu bez vlivu na pH. Při chromatografii cukrů na anexech se používá gradientové eluce, pH gradient ovlivňuje dělení mono- a disacharidů a gradient iontové síly ovlivňuje dělení oligosacharidů. [18, 35].

### *Chromatografie na silikagelu s vázanou aminopropylovou fází*

Při chromatografii cukrů na silikagelu s vázanou aminopropylovou fází se používá jako mobilní fáze směs acetonitril-voda a cukry opouštějí chromatografickou kolonu v pořadí monosacharidy, alditoly, disacharidy a nakonec vyšší oligosacharidy. Dělicí mechanismus je možno vysvětlit jednak na základě různého rozdělovacího koeficientu cukrů mezi mobilní fází a vrstvou vody ulpělé na stacionární fází a jednak adsorpcí, která je způsobena vodíkovými můstky mezi –OH skupinami a –NH<sub>2</sub> skupinou vázané fáze. Je však podstatné, že se zvýšením obsahu vody v mobilní fází se zkracují eluční časy cukrů, což je důkazem, že se eluce řídí polaritou cukrů. Výhodou této chromatografie je její vysoká separační schopnost, avšak nevýhodou je poměrně krátká životnost kolon. Podobnými principy dělení se řídí chromatografie cukrů na silikagelu s vázanými diolovými a polyolovými skupinami, na silikagelu s vázanými cyklodextriny a na nemodifikovaném silikagelu. Probíhá-li chromatografie na nemodifikovaném silikagelu, je možno do mobilní fáze přidávat vhodnou sloučeninu s aminoskupinou, čímž dojde k vytváření podmínek podobných chromatografií na silikagelu, který je modifikován aminopropylovými skupinami, např. piperazinem nebo tetraethylenpentinem [18, 35].

### *Chromatografie s obrácenou fází*

Chromatografie s obrácenou fází má při dělení cukrů omezené možnosti, protože cukry jsou na hydrofobním povrchu náplně jen málo zadržovány. Existují však aplikace, při kterých byly na silikagelu s vázanou oktadecylovou skupinou děleny oligosacharidy nebo deriváty cukrů. V tom případě je možno výhodně použít k detekci UV detektor. Při této chromatografii s obrácenou fází se uplatňuje hlavně adsorpce [18, 35].

**Tabulka 5: Reálné příklady kolon pro chromatografické stanovení sacharidů [27-32]**

Kolona	Firma	Mobilní fáze	Detektor	Stanovované cukry
SUPELCO SIL LC-NH <sub>2</sub> *	Supelco	acetonitril:voda (75:25)	RI	fruktóza, glukóza, sacharóza, maltóza, laktóza
YMP-Pack™ NH <sub>2</sub> (Amino)	Waters	acetonitril:voda (75:25)	RI	fruktóza, glukóza, sacharóza, xylóza, ribóza, arabinóza, maltóza, laktóza
ZORBAX Carbohydrates Analysis *	Agilent	acetonitril:voda (75:25)	RI	fruktóza, glukóza, sacharóza, galaktóza, rafinóza, xylóza, ribóza, rhamnóza, maltóza, laktóza
REZEX™, RCM-Monosaccharide RKP-Monosaccharide	Phenomenex	deionizovaná voda	RI	glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza, mannóza, maltóza, glukóza, xylóza, galaktóza, fruktóza
LUNA L8 NH <sub>2</sub>	Phenomenex	voda		jednoduché cukry
PINNACLE™ II Amino	Restek	acetonitril:voda (75:25)	RI	glukóza, fruktóza, sacharóza, maltóza, laktóza

\* označené kolony byly použity v experimentální části této diplomové práce

#### 2.4.1.3. Mobilní fáze

Jako mobilních fází se nejčastěji používá vodných roztoků jednoho či více organických rozpouštědel, nejčastěji methanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu [32].

Pro stanovení sacharidů se jako mobilní fáze používá deionizovaná voda, směs acetonitril – voda v různém poměru, nejčastěji s 60 – 80 % acetonitrilu a s průtokem od 1,0 do 1,5 ml/min, aby nedošlo k překročení povoleného pracovního tlaku [30, 33, 35]. Dále se používá směs acetonitril-voda v poměru 1 : 2,6 s přidávkem 0,03% ethylendiaminu [24]. Lze použít i vodný roztok NaOH, který může obsahovat octan sodný [26, 35] nebo se používá zředěná H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [34].

Mobilní fáze je ze zásobní láhve transportována přes kolonu pomocí vhodného **čerpádlá**. Čerpádlá jsou v dnešní době praktický jen pístová a musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze a regulovatelnost průtoku až do tlaku min. 10 MPa. Čerpádlá jsou řízena mikroprocesorem, čímž se zajistí vyhlazení tlakových pulsů.

**Dávkování vzorku** se nejčastěji provádí obtokovým dávkovacím kohoutem. Dávkovací smyčka je připojena na kohout a plněna pomocí injekční stříkačky. Dávkovací smyčka má nejčastěji obsah 5 až 20 µl [22].

#### 2.4.1.4. Detekční systémy

Prakticky všechny typy detektorů používané v kapalinové chromatografii jsou koncentračního typu, tj. poskytující signál úměrný koncentraci detegovaných látek v eluátu. Lze je rozdělit do dvou skupin: selektivní detektory, jejichž signál je úměrný koncentraci samotné detekované látky (fotometrické, fluorimetrické a elektrochemické detektory). Druhou skupinu tvoří univerzální nesespecifické detektory, jejichž odezva je úměrná určité celkové vlastnosti eluátu (refraktometrický detektor) [32]. Nejběžnějšími detektory pro stanovení sacharidů jsou refraktometrický a fotometrický [35].

**Refraktometrický** detektor (refractive index detector, RID) měří rozdíl indexu lomu mobilní fáze uzavřené v referenční cele a eluentem vycházejícím z kolony. Mobilní fáze a vzorky

musí být pečlivě zbaveny rozpuštěných plynů, protože plyny zcela ruší detekci. Detektor nelze použít při gradientové eluci. Nevýhodou tohoto detektoru je to, že není selektivní a je poměrně málo citlivý. Pro stanovení sacharidů je však vhodný. Index lomu je veličina závislá na teplotě, takže při použití refraktometrického detektoru je podmínkou přísné temperování [36]. Kromě konstattní teploty je nutné v průběhu měření pracovat při specifické vlnové délce. Detekční limit se pro mono-, di- a oligosacharidy pohybuje kolem 5 µg [21].

**Fotometrické** (UV-VIS) detektory měří absorbanci eluátu, který vychází z kolony. Monosacharidy byly měřeny při vlnových délkách 210, 228, 254 a 260 nm. Fotometrické detektory se současným záznamem UV spektra látky jsou tzv. detektory diodového pole (DAD). Tento typ detektoru je velmi citlivý, ale méně selektivní [38].

V posledních letech byl zkonstruován ELSD (evaporative light scattering detector), který odpaří mobilní fázi před detekcí netěkavého zbytku. Netěkavý zbytek je změřen v cele detektoru na základě rozptylu světla. [14]

Po derivatizaci sacharidů lze použít také fluorescenční (FL)[33] a pulsní amperometrický detektor. Pulsní amperometrický detektor patří mezi elektrochemické detektory (EC). Tento detektor využívá redukujících vlastností cukrů v alkalickém prostředí. Oxidace cukrů se děje na povrchu zlaté elektrody v silně alkalickém prostředí. Tento detektor je velmi citlivý [37].

**Tabulka 6: Srovnání HPLC detektorů [38]**

	<b>RI</b>	<b>UV-VIS</b>	<b>EC</b>	<b>FL</b>	<b>ELS</b>
<b>typ detektoru</b>	nedestruktivní	nedestruktivní	destruktivní	nedestruktivní	destruktivní
<b>odezva</b>	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální
<b>měřená veličina</b>	index lomu	absorbance	elektrický proud	intenzita fluorescence	rozptyl světla
<b>citlivost (hmotnost/ml)</b>	µg	ng	pg	pg	µg
<b>lineární rozsah</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
<b>teplotní závislost</b>	vysoká	nízká	vysoká	nízká	vysoká
<b>gradientová eluce</b>	ne	ano	ne	ano	ano (částečně)

### 2.4.1.5. Preparativní chromatografie

Preparativní chromatografie byla po dlouhou dobu vnímána jako velmi nákladná a nepříliš efektivní purifikační metoda, prakticky nepoužitelná pro průmyslové účely. Rychlý vývoj, zejména v oblasti organické syntézy a ve farmaceutickém průmyslu nastartoval změny, díky nimž se preparativní vysokoúčinná kapalinová chromatografie dostala do popředí zájmu.

Z ekonomického hlediska je jedním z nejdůležitějších faktorů výtěžnost a efektivita celého procesu. Účelem preparativní chromatografie je tedy izolovat maximální množství určitého produktu v požadované kvalitě v co nejkratším čase. Preparativní chromatografie zahrnuje široký rozsah purifikačních procesů od izolace minimálního množství čisté látky, určené pro další analytický výzkum [39].

Úvodem bude jistě vhodné blíže definovat, co si pod pojmem preparativní chromatografie představujeme. V zásadě lze kapalinovou chromatografii rozdělit na nano a mikro HPLC, analytickou, semipreparativní a preparativní. Do preparativní chromatografie obvykle zahrnujeme separace, kde se používá průtok mobilní fáze větší než 50 ml/min, přičemž horní hranice se může pohybovat ve stovkách litrů za minutu. Jedná se o šaržový, tedy diskontinuální způsob separace.

Analytická a preparativní HPLC vypadají v zásadě velmi podobně, ale tyto dvě separační techniky mají zcela odlišné požadavky na konfiguraci systému, založené na rozdílných separačních prioritách. V preparativní chromatografii se obvykle pracuje se vzorky s maximální koncentrací, daleko nad lineárními adsorbčními izotermami požadovanými pro analytické účely. Citlivost a selektivita detektoru se v preparativní chromatografii stává jedním z méně důležitých parametrů a často je záměrně potlačována. V každém případě platí vždy nutnost mít dobře odladěnou analytickou metodu, kterou pomocí tzv. „scale-up“ převedeme na preparativní rozměr. Analytická metoda by měla být dostatečně robustní, ale co nejjednodušší, pokud možno v izokratickém modu, s optimální selektivitou a co nejkratší dobou analýzy [39].

Preparativní kolony mají vyšší kapacitu, čímž je umožněno aplikovat větší objemy vzorku než na kolony analytické. Jestliže známe kapacitu pro analytickou kolonu, lze odhadnout kapacitu kolony preparativní [40].

$$LC_{prep.} = LC_{anal.} \cdot \left( \frac{ID_{prep.}}{ID_{anal.}} \right)^2 \cdot \left( \frac{L_{prep.}}{L_{anal.}} \right) \quad (3)$$

LC = kapacita kolony

ID = vnitřní průměr

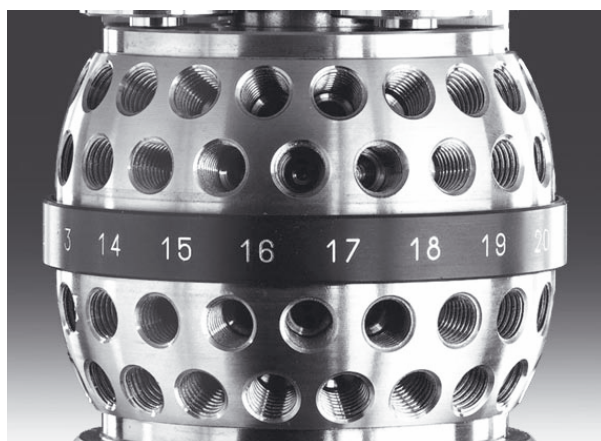
L = délka kolony

Při převádění chromatografických postupů z laboratorního měřítka do preparativní provozní formy je třeba brát v úvahu řadu faktorů, které úspěšnost a aplikovatelnost daného postupu ve výrobním procesu mohou ovlivnit. Zatímco v případě laboratorních postupů jsou rozhodujícími kritérii výtěžek postupu a stupeň čistoty produktu, při rozšiřování pro výrobní účely nelze opomenout i další hlediska jako např. ekonomiku procesu, hygienu postupů, kontrolu prostředí apod.

Převádění purifikačních postupů, vypracovaných v laboratoři do provozních podmínek však neznamená, že úměrně rozšíření dojde ke zvýšení výtěžku procesu. Při práci ve velkém měřítku se začnou objevovat i další faktory, jejichž vliv je možno v laboratorních podmínkách zanedbat. Charakteristickým příkladem je snižování průtoku mobilní fáze v důsledku

stlačování chromatografické náplně. Proto jsou kladeny speciální nároky zejména na výběr matrice resp. náplně kolony. Tradičně využívané náplně v laboratořích (agaróza, dextransy, celulóza) nemají dostatečnou rigiditu a proto při velkých průtocích mobilní fáze může docházet k porušení jejich struktury. Proto byly připraveny makroporézní prokřížené nosiče určené pro práci ve větším měřítku, které jsou vzhledem k lepším hydrodynamickým vlastnostem vhodné pro vyšší průtoky a tím i pro práci v provozním měřítku. Náplň kolony musí být rovněž odolná vůči čistícím a sanitárním postupům, které jsou nezbytné pro zajištění bezpečnosti a hygieny provozu [40].

U preparativní chromatografie je jednou z nejdůležitějších částí systému robustní čerpadlo, které zaručuje vysokou přesnost dávkování i při velkých průtocích, při zachování nízkého zpětného tlaku. Pro vlastní separaci je vhodné volit izokratické podmínky separace, aby se mobilní fáze dala recyklovat. Je však možná i gradientová eluce. Jednotlivé frakce lze izolovat buď prostřednictvím frakčního kolektoru nebo pomocí multipozicových přepínacích ventilů. Přepínací ventily umožní dále recyklaci mobilní fáze, případně vícestupňovou separaci určitých frakcí. Optimalizaci a řízení separačního procesu zajišťuje softwarový modul pro preparativní chromatografii, který lze přidat k základnímu chromatografickému softwaru [39].



**Obrázek 4: Multipozicový přepínací ventil [39]**

**Tabulka 7: Reálné příklady preparativní chromatografie cukrů [41, 42, 43, 44, 45, 46]**

Sacharidy	Typ chromatografie, kolony a mobilní fáze
Deriváty fruktózy	semipreparativní chromatografie CarboPac PA – 100 (Dionex)
Glukóza, fruktóza	SMB systém (kontinuální protiproudá chromatografická technika – „simulovaný pohyb lože“) s 8 kolonami
Deriváty glukózy	Protiproudá chromatografie s pomalu se otáčející kolonou Makroporézní pryskyřice AB – 8 CHCl <sub>3</sub> – MeOH – 2 – propanol – H <sub>2</sub> O (5:6:1:4 v/v)
	Protiproudá chromatografie s rychle se otáčející kolonou n – hexan – ethylacetát – methanol – voda (0,25:5:1:5 v/v)
Oligo- a polysacharidy	exkluzní chromatografie

## 2.4.2. Automatický analyzátor Skalar

Skalar je kontinuální (sekvenční) průtokový analyzátor, který byl už před mnoha lety vyroben firmou Skalar [48].

Skalar vyvinul celou řadu analyzátorů pro chemickou analýzu; SA9000 online analyzátor, SP100 automatický analyzátor a SAN<sup>PLUS</sup> sekvenční průtokový analyzátor. V této práci byl použit právě poslední zmíněný analyzátor, SAN<sup>PLUS</sup> sekvenční průtokový analyzátor. Dnes už se nevyrábí. Firma Skalar vyrábí novou verzi, SAN<sup>++</sup> sekvenční průtokový analyzátor.

Automatizací analýzy ve většině případů zvýšíme efektivitu laboratorních procesů, kapacitu vzorků a přesnost analýzy, zároveň eliminujeme lidskou chybu. Všeobecně dojde ke zkrácení doby analýzy, zvýšení její rychlosti a snížení spotřeby použitých činidel [47].



*Obrázek 5: Skalar SAN<sup>++</sup> [48]*

### 2.4.2.1. Princip kontinuální průtokové analýzy

Automatická sekvenční průtoková analýza je kontinuální metoda chemické analýzy. Dochází při ní k rozdělení toku činidel a vzorků v hadičkách různého průměru pravidelnými vzduchovými bublinami. Kontinuální tok zajišťuje peristaltická dávkovací pumpa, ta vede činidla i vzorky do hadiček, směšovacích spirál, dializační a zahřívací části Skalaru. Tok jde dále do průtočné cely, kde je detekován. Rozdělení toku vzduchovými bublinami je důležitý pro celou analýzu, protože zabráňuje kontaminaci a poskytuje poměrné smíchání činidel se vzorkem.

Základní operace chemické analýzy se skládají ze vzorkování, úpravy vzorku, měření vzorku, kontroly parametrů přístroje a vyhodnocení výsledků. Z toho vyplývá instrumentace těchto operací, které jsou: Dávkovač vzorku, chemická jednotka s pumpou, promývacím ventilem a chemickými oddíly, detektor a systém sbírající a vyhodnocující data [47].

#### *Dávkovač vzorku, autosampler*

Dávkovač vzorku se skládá z otočného dávkovacího zařízení (standardní roztoky a vzorky jsou zde uloženy v plastových či skleněných vialkách) a jedné nebo dvou vzorkovacích jehel dávkujících standardy a vzorky do chemické jednotky. Čas nasávání vzorků, vzduchu

a promývání je nastavitelný. Na kolotoči je posazen kryt, chránící vzorky před prachem a rozbitím [47].

### ***Chemická jednotka***

Chemická jednotka se skládá z promývacího ventilu, peristaltické dávkovací pumpy se vzduchovým vstřikováním, kompresoru a až čtyř chemických oddílů (směšovací spirály, dialyzační jednotky, reaktoru a regulátoru teploty) [47].

### ***Promývací ventil***

Promývací ventil uložený mezi činidla a pumpu umožňuje rychlý přesun z dávkování činidel k nasávání promývacího roztoku během spuštění a zastavení analyzátoru. SAN<sup>PLUS</sup> systém má dva typy promývacího ventilu. V této práci využíváme promývací ventil s 10 vstupy pro činidla a 1 vstupem pro promývací roztok [47].

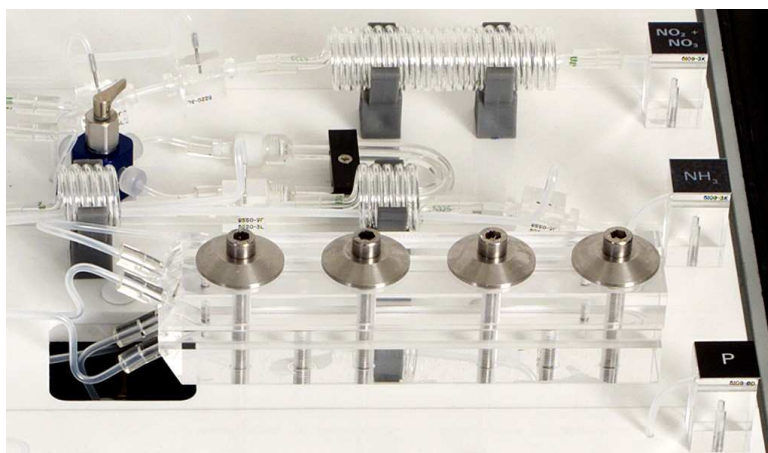
### ***Peristaltická dávkovací pumpa***

Dávkovací pumpa dávkuje vzorky, činidla a standardní roztoky a po oddělení vzduchovými bublinami jimi pohybuje systémem hadiček k jednotlivým chemickým oddílům, kde dochází k zahřívání, dialýze a směšování činidel a vzorku. Vzduchové bubliny jsou v pravidelných intervalech vstřikovány zabudovanou vzduchovou tryskou. Rychlost pumpy je konstantní [47].

### ***Chemické oddíly***

Každý oddíl se skládá z různé jednotky, zajišťující různé funkce, např. směšovací spirála, dialyzační jednotka, regulátor teploty, reaktor, skleněné spojky a hadičky. Skalar používá hadičky o vnitřním průměru 0,10; 0,16; 0,60; 0,80; 1,20 a 1,40 mm.

Chemický oddíl automatizuje ředění, míchání, zahřívání, dialýzu, extrakci, destilaci, digesci, hydrolýzu a iontovou výměnu v kontinuální proces [47].



***Obrázek 6: Dialyzační jednotka a směšovací spirály [48]***

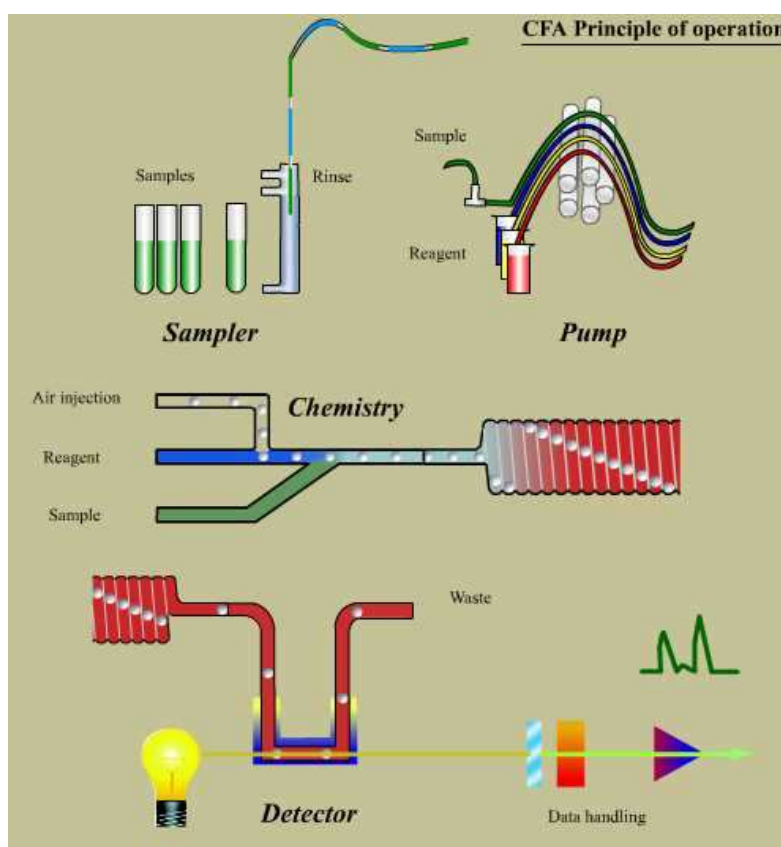
### ***Detektor***

Pro stanovení různých látek je užívána celá řada detektorů (fotometr, IR detektor, fluorimetr, plamenový fotometr, iontově-selektivní metody, atomová absorbní spektrofotometrie, refraktometr). Nejvíce využívané jsou fotometrické detektory. Skalar vyrábí několik modelů fotometrických detektorů.

Fotometrický detektor obsahuje měřící část s oddělenými elektronkami. Součástí měřící části jsou maximálně 2 průtočné cely. Průtočné cely mohou být s „debublerem“ nebo bez něj, závisí to na typu analýzy. Fotodetektor pracuje v oblasti od 340 do 1100 nm. Po průchodu světelného svazku paprsků průtočnou celou je svazek rozdělen a každý paprsek prochází s odlišnou vlnovou délkou do detektoru [47].

### ***Vyhodnocování dat***

Výstup z analyzátoru je série píků. Ty mohou být zakreslovány přímo zapisovačem na milimetrový papír, který slouží k manuálnímu vyhodnocení, nebo automaticky vyhodnocovány počítačovým softwarem [47].



**Obrázek 7: Princip kontinuální průtokové analýzy [48]**

### **2.4.2.2. Aplikace**

Skalar SAN<sup>PLUS</sup> je vhodný pro stovky různých aplikací. Je využíván řadou laboratoří pro analýzu vody, půdy, detergentů, potravin a nápojů jako jsou pivo a víno. Metody pro Skalar jsou dobře zdokumentovány a řídí se mezinárodními standardy (ISO, Standard Methods aj.) [47].

### ***Princip stanovení redukujících sacharidů Skalarem***

Automatizovaná metoda pro stanovení redukujících cukrů ve víně je založena na následující reakci; vzorek je smíchán s roztokem uhličitanu sodného a dialyzován. Poté se přidá roztok neocuproinu měďnatého a tok je zahříván na 97 °C. Vzniká chélat neocuproinu, který je redukován cukry přítomnými ve vzorku. Vznikající žlutý měďnatý komplex neocuproinu je detekován fotometrem při vlnové délce 460 nm [47].

### 2.4.3. Manuální analytické metody

#### ***Stanovení redukujících cukrů zkrácenou metodou dle Rebeleina***

Metoda je založena na jodometrickém stanovení, kdy koncentraci redukujících cukrů stanovíme z rozdílu spotřeb roztoku thiosíranu sodného na titraci  $\text{Cu}^{2+}$  o definované koncentraci a jeho zůstatku po reakci s redukujícími cukry vína, bez předchozího odstranění interferujících látek [49].

#### ***Stanovení redukujících cukrů dle Henniga***

Je založena na vizuálním posouzení reakce přítomných redukujících cukrů s Fehlingovým roztokem ve zkumavkách. Žlutá barva znamená nedostatečné množství Fehlingova roztoku na přítomnou koncentraci redukujících cukrů, modré zbarvení signalizuje přebytek Fehlingových roztoků. Vytvoří se řada zkumavek s 1 až 10 ml Fehlingových roztoků vždy s 5 ml filtrovaného vína. Metoda je spíše orientační, počet žlutých zkumavek se rovná koncentraci cukrů v  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [49].

#### ***Gravimetrické stanovení redukujících cukrů***

Jedná se o metodu založenou na redukci Fehlingova roztoku, z kterého se vylučuje redukujícími cukry oxid měďný. Po filtraci sraženiny přes skleněnou fritu o známé hmotnosti a vysušení při  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se fritu zvažuje s přesností na 4 desetinná místa a z rozdílu hmotností a tabulek, se stanoví koncentrace cukrů [49, 50].

#### ***Stanovení redukujících cukrů dle Bertranda***

Metoda je založena na redukci Fehlingova roztoku, z něhož se vylučuje redukujícími cukry oxid měďný. Tuto červenou sraženinu převedeme pomocí síranu železitého na oxid měďnatý a množství vyloučeného oxidu železnatého stanovíme manganometricky [49, 50].

#### ***Stanovení sacharózy a veškerých cukrů***

Sacharóza neredukuje alkalicko – měďnatý roztok. Její koncentrace se stanoví z rozdílu stanovené koncentrace redukujících cukrů po inverzi a před inverzí sacharózy vynásobením faktorem 0,95. Veškeré cukry jsou součtem stanovené koncentrace redukujících cukrů a sacharózy [49].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Chemikálie, pomůcky a laboratorní zařízení

##### *Chemikálie:*

Brij 30% – Breda, The Netherlands

NaCl – Brno, ČR

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Rožnov pod Radhoštěm, ČR

Neocuproin hydrochloride – Praha, ČR

CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – Brno, ČR

Acetonitril – Praha, ČR

Deionizovaná voda

##### *Pomůcky:*

Laboratorní sklo, váženka, lžička, pipety, vialky plastové a skleněné, injekční stříkačky (V = 2 ml), mikrofiltry (Nylon 0,45μm), filtrační papír, alobal.

##### *Zařízení:*

Elektronické váhy – Ohaus, USA

Analyzátor **SKALAR SAN<sup>PLUS</sup>** obsahuje:

Autosampler 1000

Pumpa

Hadičky různého průměru – 0,8; 0,16; 1,2; 0,1; 1,4; 0,6 ml/min

Dialyzační jednotka SA 5272

Kontrola teploty SA 5520

Reaktor SA 5523

Průtoková cela 10 mm SA 6441

Fotometrický detektor SA 6200

Zapisovač 7021

Systém pro **HPLC – SHIMADZU LC 10** obsahuje:

Čerpadlo mobilní fáze Shimadzu liquid chromatograph LC – 10AD

Odplyňovač Shimadzu GT – 104

Vysokotlaký dávkovací ventil ( $V_{\text{smyčky}} = 5 \mu\text{l}$ ) – Rheodine 7725i

Nízkotlaký ventil FCV – 10AL

Termostat kolon Shimadzu Column oven CTO – 10A

Kolona Zorbax Carbohydrate Analysis ; 4,6 mm ID × 150 mm (5 μm), Agilent Technologies, USA

Spektrofotometrický detektor Shimadzu Diode array detector SPD – M10AVP

Řídící jednotka Shimadzu Communications bus module CMB – 10A

Vyhodnocení – PC s programem CLASS LC10

Systém pro **HPLC – WATERS ALLIANCE** obsahuje:

Separáční modul Waters Separations Module W 2695

Refraktometrický detektor Waters Differential Refractometer W 410

Kolona Supelcosil™ LC-NH<sub>2</sub>; 4,6 mm ID × 250 mm (5 μm), Supelco, USA  
Vyhodnocení – PC s programem

*Standardy pro Skalar a HPLC:*

D-glukóza monohydrát – Chrudim, ČR

D-fruktóza – Roth, Karlsruhe

Sacharóza – Chrudim, ČR

### 3.2. Vzorky

Byla analyzována vína bílá, červená i růžová-rosé. Vína byla mladá i archivní, získaná od malovýrobců i od velkovýrobců. Vzorky vín jsou uvedeny v tabulce 8.

**Tabulka 8: Seznam vzorků vín**

	Název vína	Ročník	Zkratka
1	Směs vín – cuvée, kabinet	2008	cuvé 08
2	Rulandské bílé, kabinet	2008	RB 08
3	Rulandské šedé, kabinet	2008	RŠ 08
4	Ryzlink rýnský, kabinet	2008	RR 08
5	Ryzlink rýnský, kabinet	2007	RR 07
6	Ryzlink vlašský, kabinet	2007	RV 07
7	Veltlínské zelené, kabinet	2007	VZ 07
8	Muškat moravský, kabinet	2007	MM 07
9	Tramín červený, slámové	2005	TČ 05
10	Zweigelttriebe, kabinet	2008	ZW 08
11	Zweigelttriebe, kabinet	2007	ZW 07
12	Pinot noir, kabinet	2007	PN 07
13	Blauburger, kabinet	2007	BL 07
14	Frankovka Král, pozdní sběr	2007	FRK 07
15	Frankovka, kabinet	2007	FR 07
16	Rosé cuvée, kabinet	2007	ROSE 07
17	Veltlínské červené, kabinet	2008	VČ 08
18	Veltlínské zelené, pozdní sběr	2008	VZ 08
19	Zweigelttriebe rosé, výběr z hroznů	2008	ZWR 08
20	Tramín červený, slámové	2006	TČ 06

### 3.3. Automatický analyzátor Skalar

Automatický analyzátor Skalar San<sup>PLUS</sup> byl sestaven dle dostupných materiálů a na malé sadě vzorků byla prověřena jeho schopnost správného měření. Zařízení obsahuje dávkovač vzorku, chemickou část, detektor a zařízení pro záznam analytického signálu.

Analyzátor tohoto typu je určen pro stanovení jak redukujících sacharidů, tak pro měření kyseliny citrónové ve víně, volného oxidu siřičitého a oxidu fosforečného ve víně. Popsaná metoda stanovení redukujících sacharidů slouží ke kontrole obsahu těchto látek ve víně.



*Obrázek 8: Skalar SAN<sup>PLUS</sup>*

#### **Příprava vzorků pro Skalar**

Láhve s vínem byly po celou dobu skladovány v lednici. Před analýzou nebylo potřeba vzorky upravovat, rovnou byly podrobeny analýze při laboratorní teplotě.

#### **Příprava standardních roztoků pro kalibraci**

D–glukóza byla použita pro přípravu standardních roztoků o koncentraci 4, 8, 12, 16, 20 g·l<sup>-1</sup>. Do odměrné baňky na 100 ml bylo naváženo 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 g glukózy a doplněno deionizovanou vodou po značku.

#### **Příprava činidel**

##### *Destilovaná voda + Brij*

Odměrná baňka na 1000 ml byla naplněna deionizovanou vodou po značku. Teprve poté bylo přidáno 3 ml 30% Brije a roztok byl promíchán.

##### *Roztok NaCl + Brij*

Do odměrné baňky na 500 ml bylo naváženo 18 g NaCl, doplněno destilovanou vodou po značku a bylo přidáno 1,5 ml 30% Brije, vše bylo promícháno.

### *Roztok Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + Brij*

Do odměrné baňky na 500 ml bylo naváženo 13,25 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, doplněno destilovanou vodou po značku a bylo přidáno 1,5 ml 30% Brije, vše bylo promícháno.

### *Barevné činidlo*

Do odměrné baňky bylo naváženo 100 mg neocuproinu a poté 50 mg CuSO<sub>4</sub>, doplněno destilovanou vodou po značku a promícháno.

### **Příprava přístroje a analýza**

Nejprve se zasunou hadičky do jednotlivých pracovních roztoků, napnou hadičky na dávkovací pumpě, nastaví se rovnoměrná tvorba bublin v hadičkách. Teprve poté se zapne celý přístroj, regulátor teploty, detektor a nechá se cca 20 min. ustálit. Blikající kontrolka ukazuje dosažení správné teploty. V celém systému hadiček a směšovacích spirál je nutné dosáhnout rovnoměrného rozložení bublin. Fotometr se kalibruje zhruba na 50 mV, za použití aretačního šroubu. Při počátečním napětí nižším než 50 mV budou nižší i výsledné píky. Nakonec se zapne zapisovač.

Plastové vialky se standardy a vzorky se vloží do otočného dávkovacího zařízení. Po standardech následuje vialka s deionizovanou vodou jako blank, po každých deseti vzorcích je též zařazena vialka s deionizovanou vodou.

Navolí se počet vzorků v dávkovači, čas nasávání vzorků, vzduchu a promývání. Nakonec se zapne start. Stanovení 8 vzorků trvá asi 90 min. Celá analýza je plně automatická a kontinuální. Výsledkem je výstup ze zapisovače.

Po analýze se systém promývá (20 min) deionizovanou vodou. Jednou za týden, aby se zabránilo kontaminaci systému, se systém promývá 1 M HCl (15 min) a znova deionizovanou vodou (20 min).

### **Parametry přístroje**

Čas nasávání vzorku: 60 s, promývání: 60 s, vzduch: 0 s

Stabilizace systému: přibližně 20 min

Teplota: 97 °C

Vlnová délka měření: 460 nm

Nastavení počtu vzorků: 56, 33

### 3.4. HPLC s UV detekcí s diodovým polem

Byl použit kapalinový chromatograf Shimadzu LC10 s UV detekcí. Pro separaci sacharidů byla použita kolona s reverzní fází Zorbax Carbohydrates Analysis obsahující křemičitan s 3 – aminopropylsilanem. Popsaná metoda stanovení sacharidů slouží též ke kontrole obsahu těchto látek ve víně. Fotografie chromatografické sestvy je uvedena na obrázku 9.



*Obrázek 9: Kapalinový chromatograf Shimadzu LC 10*

#### **Příprava vzorků**

Láhve s vínem byly po celou dobu skladovány v lednici. Vzorky byly před analýzou zfiltrány přes mikrofiltr (Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ ) a nastříknuty injekční stříkačkou do dávkovacího ventilu.

#### **Příprava standardních roztoků pro kalibraci**

D – glukóza a D – fruktóza byly použity pro přípravu standardních roztoků o koncentraci 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Do odměrné baňky na 50 ml bylo naváženo 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 g glukózy a doplněno směsí ACN/deionizovaná voda (50/50) po značku. Stejná sada byla připravena i s fruktózou.

#### **Úprava podmínek pro HPLC analýzu**

Podmínky pro HPLC analýzu byly stanoveny dle testu kolony Zorbax Carbohydrate Analysis, která byla provedena výrobcem.

Sacharidy byly eluovány z kolony v pořadí fruktóza, glukóza, popřípadě sacharóza. Mobilní fází byla směs ACN/deionizovaná voda v poměru 75/25 s průtokem 1,4 ml/min, objem dávkovaného vzorku byl dán dávkovací smyčkou, tj. 5  $\mu\text{l}$ . Separace sacharidů probíhaly při 30  $^{\circ}\text{C}$  a byly detekovány UV detektorem s diodovým polem. Detektor zaznamenával

v rozmezí vlnových délek 200 – 300 nm. Bylo nutné stanovit vhodnou vlnovou délku, při které budou jednotlivé sacharidy sledovány.

Proměřením prvního standardu glukózy a fruktózy ( $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byly přesně stanoveny podmínky vhodné pro analýzu hlavních sacharidů ve víně.

### **Identifikace sacharidů**

Připravené vzorky vín byly za upravených podmínek postupně třikrát změřeny a v každém vzorku bylo stanoveno množství fruktózy a glukózy.

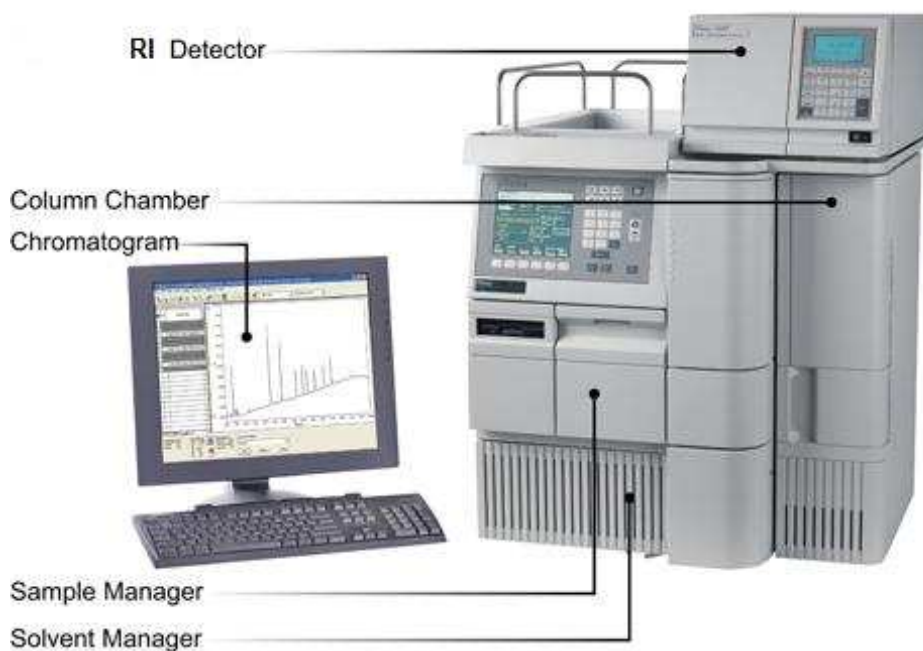
K identifikaci jednotlivých monosacharidů bylo použito srovnání retenčních časů vzorků s retenčními časy standardních látek.

Pro kvantitativní vyhodnocení glukózy a fruktózy byl použit chromatografický systém a separační podmínky, které jsou uvedeny výše.

### 3.5. HPLC s RI detekcí

Byl použit kapalinový chromatograf Waters Alliance s refraktometrickou detekcí. Pro separaci sacharidů byla použita kolona s reverzní aminopropylou fází Supelcosil™ LC-NH<sub>2</sub>. Fotografie chromatografické sestvy je uvedena na obrázku 10.

Měření bylo provedeno Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí v Brně a to metodou povolenou OIV (mezinárodní organizace pro révu a víno). Použitá metoda slouží nejen ke kontrole obsahu sacharidů, ale též glycerolu ve víně.



*Obrázek 10: Kapalinový chromatograf Waters Alliance*

#### **Příprava vzorků**

Láhve s vínem byly po celou dobu skladovány v lednici. Vzorky byly před analýzou zfiltrvány přes mikrofiltr (Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ ) a nastříknuty injekční stříkačkou do dávkovacího ventilu.

#### **Příprava standartních roztoků pro kalibraci**

Byly připraveny směsné standartní roztoky glycerol + glukóza + fruktóza + sacharóza o koncentraci 2, 5, 10  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Do odměrné baňky na 50 ml bylo naváženo 0,1; 0,25; 0,5; glycerolu, glukózy, fruktózy, sacharózy a doplněno deionizovanou vodou po značku.

#### **Podmínky pro HPLC analýzu s RI detekcí**

Podle použité kolony byly sacharidy eluovány v pořadí fruktóza, glukóza a sacharóza. Mobilní fází byla směs ACN/deionizovaná voda v poměru 80/20 s průtokem 1,0 ml/min, objem dávkovaného vzorku byl dán dávkovací smyčkou, tj. 20  $\mu\text{l}$ . Separace sacharidů probíhaly při 40 °C a byly detekovány RI detektorem při 30 °C.

### **Identifikace sacharidů**

Připravené vzorky vín byly dvakrát změřeny a v každém vzorku bylo stanoveno množství fruktózy a glukózy, popřípadě sacharózy.

K identifikaci jednotlivých sacharidů bylo použito srovnání retenčních časů vzorků s retenčními časy standardních látek.

Pro kvantitativní vyhodnocení glukózy, fruktózy a sacharózy byl použit chromatografický systém a separační podmínky, které jsou uvedeny výše.

### 3.6. Výpočty a vzorce

#### Výpočet obsahu sacharidů ve víně

Výpočet vychází z rovnice regresních přímek kalibračních závislostí jednotlivých standardů cukru, které jsou ve tvaru:

$$\begin{aligned}y &= Bx + A \\x &= \frac{y - A}{B}\end{aligned}\tag{4}$$

y = výška píku [mm] nebo plocha píku [mAbs·min, nRIU·min]

x = množství sacharidu [g·l<sup>-1</sup>]

B = směrnice kalibrační křivky

A = posunutí kalibrační křivky

#### Směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}\tag{5}$$

#### Chyba metody (relativní směrodatná odchylka)

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100(\%)\tag{6}$$

n – počet měření

n-1 – počet stupňů volnosti

x – výška píku [mm] nebo plocha píku [mAbs·min, nRIU·min]

$\bar{x}$  - průměrná výška píku [mm] nebo průměrná plocha píku [mAbs·min, nRIU·min]

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo porovnání metod používaných ke stanovení jednoduchých cukrů ve víně, a to hlavně vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a RI detekcí a automatického analyzátoru Skalaru. Byla analyzována různě sladká bílá, červená a růžová vína. Dle obsahu celkového cukru byla vína rozdělena do 4 kategorií: suchá, polosuchá, sladká a polosladká.

### 4.1. Automatický analyzátor Skalar

Už z názvu automatického analyzátoru Skalaru je patrné, že jde o automatizovanou metodu. Stanovení sacharidů ve víně zde vychází z manuálních analytických metod. Bylo analyzováno 20 vzorků vín s různým obsahem cukru.

#### 4.1.1. Kalibrační závislosti pro Skalar

Každá sada standardních roztoků glukózy byla připravena znovu čerstvá (příprava viz. 3.3.) pro každé měření. Analýza cukrů byla provedena čtyřikrát. Třikrát byly měřeny výšky píků na záznamu z fotodetektoru (viz. tabulka 9), počtvrté byly odečítány maximální hodnoty přímo z detektoru (viz. tabulka 10). Pro každé měření byla sestavena kalibrační závislost výšky píku či odezvy detektoru na koncentraci glukózy (viz. obrázek 11, 12).

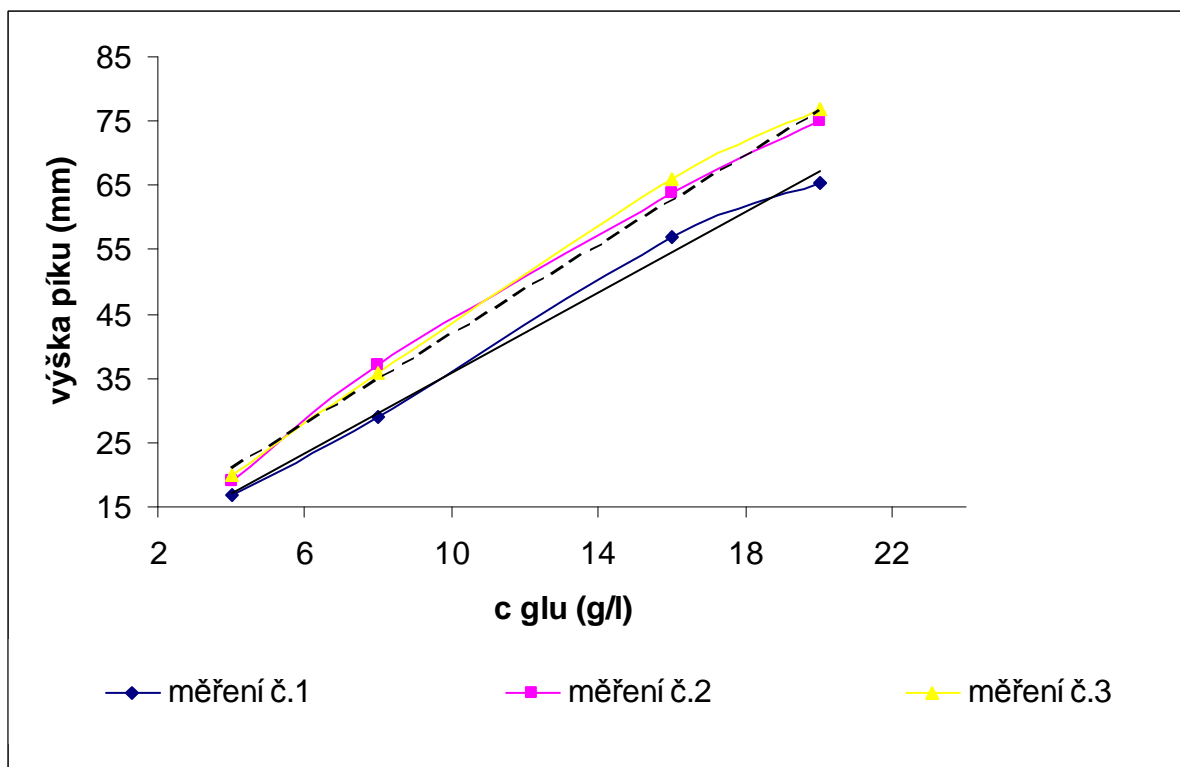
**Tabulka 9: Výšky píku jednotlivých standardů glukózy**

c (g·l <sup>-1</sup> )	výška píku (mm)		
	měření č. 1	měření č. 2	měření č. 3
4,0	17,0	19,0	20,0
8,0	29,0	37,0	36,0
12,0	43,0	52,0	53,0
16,0	57,0	64,0	66,0
20,0	65,5	75,0	77,0

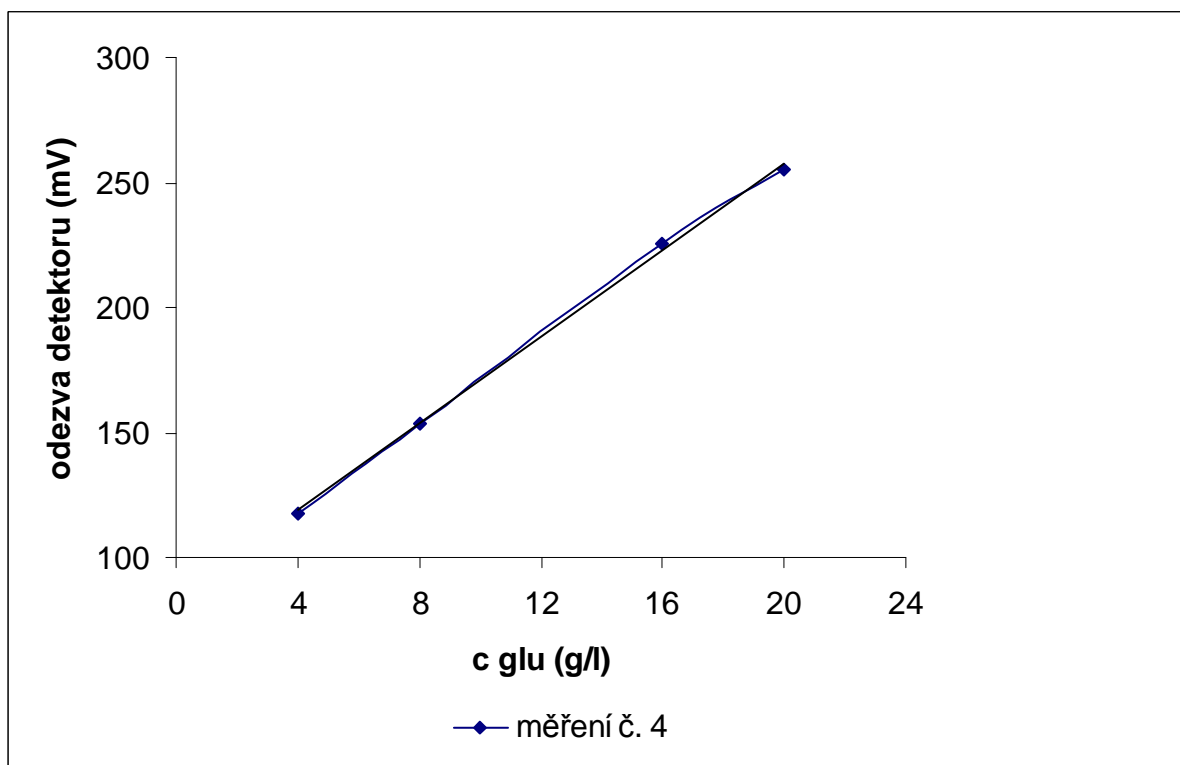
Standard glukózy 12 g·l<sup>-1</sup> nebyl použit při sestavování kalibrační závislosti, protože snižoval hodnotu spolehlivosti R<sup>2</sup>.

**Tabulka 10: Odezva detektoru jednotlivých standardů glukózy**

c (g·l <sup>-1</sup> )	odezva detektoru (mV)
	měření č.4
4,0	118,0
8,0	154,0
16,0	226,0
20,0	255,0



Obrázek 11: Kalibrační závislosti glukózy odečítané ze záznamu



Obrázek 12: Kalibrační závislosti glukózy odečítané z displeje

Rovnice regresních přímek kalibračních závislostí:

$$\text{Měření č.1: } y = 3,125x + 4,625 ; R^2 = 0,9945 \quad (7)$$

$$\text{Měření č.2: } y = 3,475x + 7,050 ; R^2 = 0,9935 \quad (8)$$

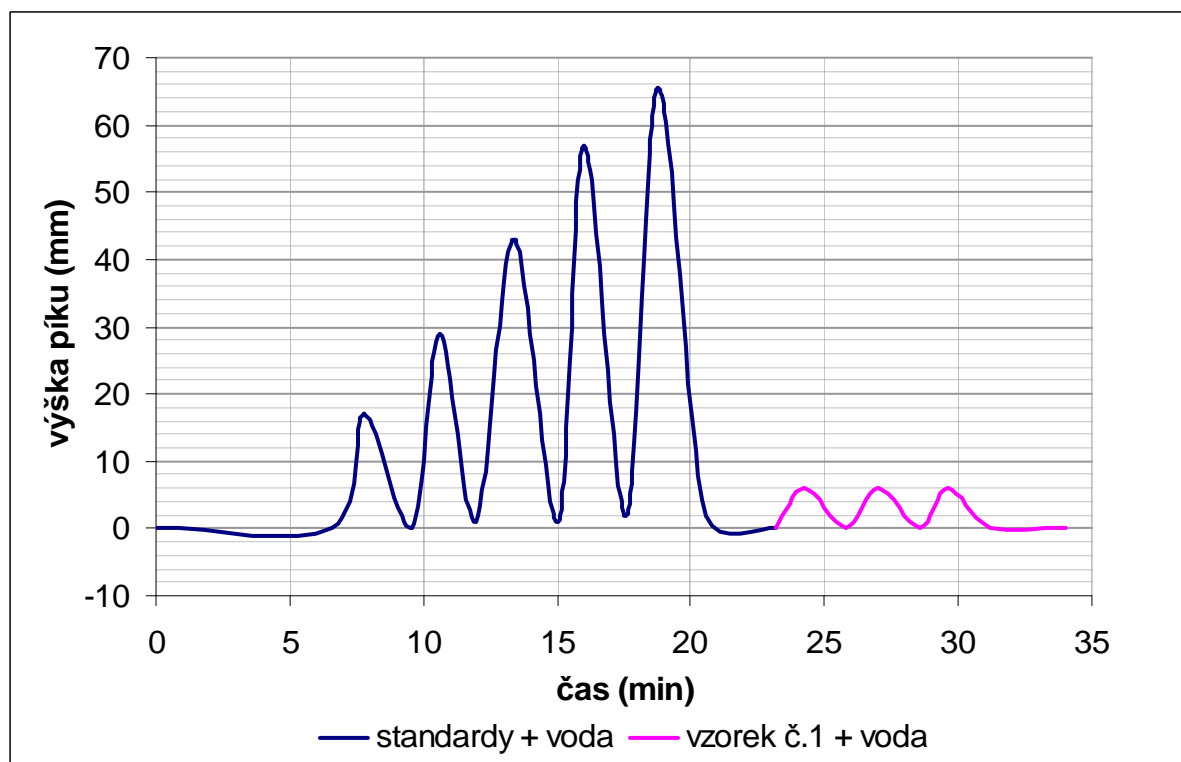
$$\text{Měření č.3: } y = 3,600x + 6,550 ; R^2 = 0,9966 \quad (9)$$

$$\text{Měření č.4: } y = 8,650x + 84,450 ; R^2 = 0,9986 \quad (10)$$

Kalibrační závislosti jsou ve sledovaném rozmezí koncentrací lineární. Regresní koeficient  $R^2$  je ve všech případech vyhovující.

#### 4.1.2. Stanovení obsahu redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích vín

Vzorky vín byly analyzovány čtyřikrát na Skalaru SAN<sup>PLUS</sup>. Z naměřených výšek píků či hodnot detektoru byla spočten průměr a obsah redukujících sacharidů byl získán dosazením do rovnic kalibračních závislostí (vždy jednotlivě pro každé měření). Hodnoty obsahu redukujících sacharidů z 1., 2., 3., a 4. měření byly nakonec zprůměrovány (viz. tabulka 12).



Obrázek 13: Ukázka výstupu ze Skalaru, tmavé píky jsou standardy (od nejnižší po nejvyšší koncentraci), světlé píky jsou první 3 vzorky vín

**Tabulka 11: Příklad získaných hodnot pro stanovení obsahu sacharidů u vína Rulandské bílé 08 při 1. měření**

číslo měření	výška píku (mm)
1	6,5
2	6,5
3	7,0
průměrná plocha píku (uAbs/min)	6,7
odchylka s	0,3
RSD (%)	4,4
<b>c (g·l<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,64</b>

**Tabulka 12: Průměrný obsah redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích vín**

vzorek	průměrná koncentrace (g·l <sup>-1</sup> )	kategorie vín dle obsahu cukru
Rosé cuvé 2007	0,12	suché (nejvýše 4,0 g·l <sup>-1</sup> )
Cuvé 2008	0,28	
Zweigeltreibe 2008	0,40	
Rulandské šedé 2008	0,42	
Rulandské bílé 2008	0,47	
Muškat moravský 2007	0,48	
Ryzlink rýnský 2008	0,53	
Zweigeltreibe 2007	0,84	
Pinot noir 2007	0,85	
Veltlínské červené 2008	1,19	
Fankovka 2007	1,26	
Frankovka Král 2007	1,90	
Blauburger 2007	3,52	
Ryzlink vlašský 2007	3,67	
Veltlínské zelené 2007	3,94	polosuché (4,1 – 12,0 g·l <sup>-1</sup> )
Ryzlink rýnský 2007	4,60	
Veltlínské zelené 2008	7,31	polosladké (12,1 – 45,0 g·l <sup>-1</sup> )
Zweigeltreibe rosé 2008	42,21	
Tramín červený 2005	81,21	sladké (min. obsah 45,0 g·l <sup>-1</sup> )
Tramín červený 2006	93,12	

K výpočtu obsahu redukujících sacharidů pro jednotlivá měření bylo užito rovnic: 7, 8, 9, 10. Stanovené hodnoty obsahu redukujících sacharidů pro jednotlivé vzorky vín při 1., 2., 3. a 4. měření jsou v příloze 1, spolu se směrodatnou odchylkou a chybou metody.

Práce na Skalaru je náročná na přípravu, nastavení a kalibraci. Celá analýza je pak sice automatizovaná, ale je nutné neustále kontrolovat rovnoměrné rozložení bublin v celém systému. Analýza 20 vzorků vína trvala 3 hodiny. Měření na Skalaru je částečně nespecifické, protože Cu<sup>2+</sup> ionty mohou být redukovány nejen sacharidy, ale i jinými sloučeninami, které jsou schopny redukce nebo obsahují ve své struktuře poloacetalovou skupinu –OH. Skalarem nelze stanovit obsah jednotlivých sacharidů ve víně, ale celkové množství invertního cukru. Proto je tato metoda je vhodná a zcela dostačující pro orientační rozdělení vín do kategorií dle obsahu cukru.

Rozdělení do kategorií vín dle obsahu cukru, zjištěného Skalarem, odpovídá předpokládané kategorizaci od vinařů.

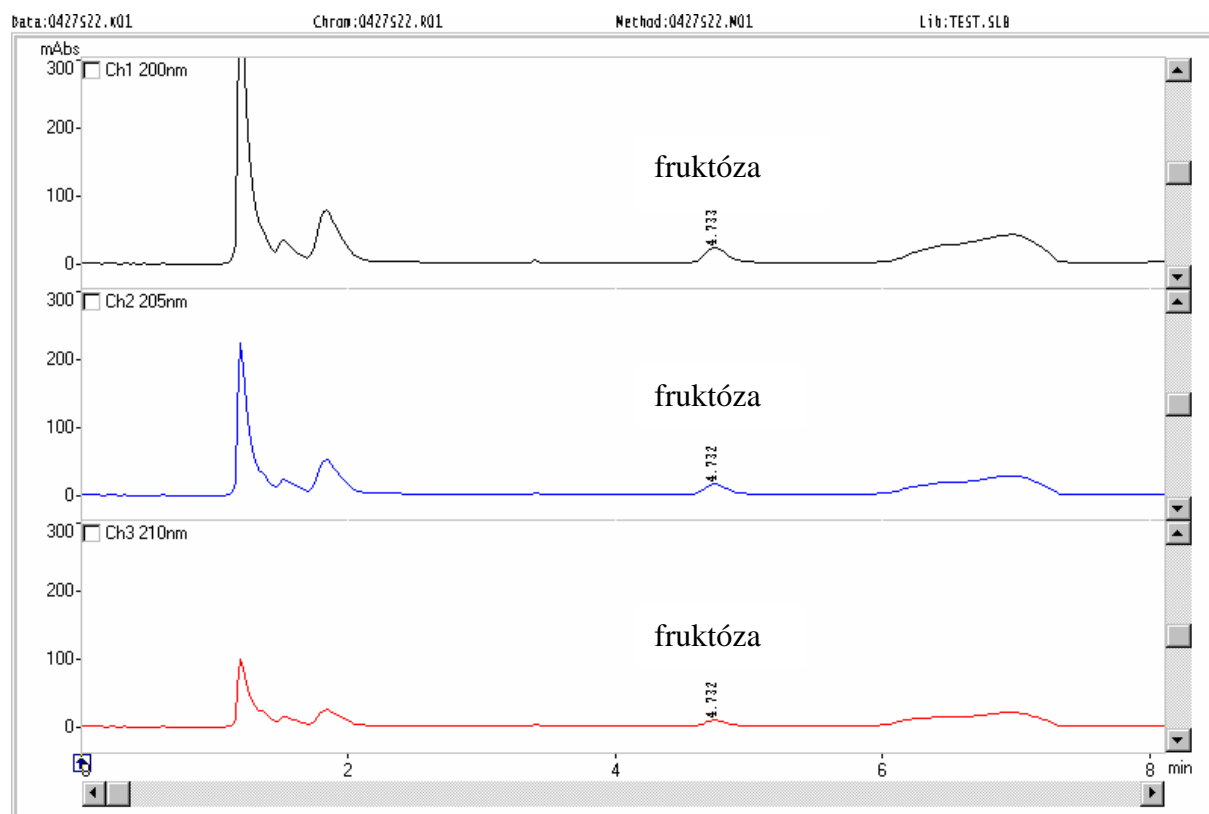
## 4.2. HPLC s UV detekcí s diodovým polem

Z instrumentálních technik byla ke stanovení cukrů ve víně použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na koloně s reverzní fází. Kolona byla speciálně výrobcem určena ke stanovení sacharidů, které zde byly detekovány UV detektorem s diodovým polem. Bylo analyzováno 8 vzorků vín s různým obsahem cukru.

### 4.2.1. Úprava podmínek pro HPLC analýzu

Cílem bylo zjistit jestli podmínky zadané výrobcem (mobilní fáze: 75/25 ACN/voda, průtok: 1,4 ml/min, teplota: 30 °C) byly zvoleny správně. Důležité bylo dosáhnout dobrého chromatografického rozlišení látek ve směsi v minimálním čase. Průtok mobilní fáze byl snížen z 1,4 ml/min na 1,2 ml/min, a to z důvodu lepšího rozlišení jednotlivých píků. Došlo však k prodloužení doby analýzy.

Použitý UV detektor s diodovým polem uchovával části UV spekter v rozmezí vlnových délek 200 – 300 nm. Byly zvoleny 3 vlnové délky: 200, 205 a 210 nm, při kterých byly sledovány průběhy měření prvního standardu glukózy a fruktózy. UV detektor velice špatně rozlišoval glukózu, při nejnižší zvolené koncentraci ji nezaznamenal vůbec. Proto byla proměřena pouze sada standardů fruktózy a dále byla ve vzorcích sledována jenom fruktóza. Záznam průběhu měření prvního standardu fruktózy je na obrázku 14.



**Obrázek 14: Chromatogramy standardu fruktózy při složení mobilní fáze: 75/25 ACN/voda, při průtoku: 1,2 ml/min, teplotě: 30 °C, tlaku: 47 bar**

Podle chromatografického záznamu výrobce se pohybuje retenční čas fruktózy kolem 4 min. Z důvodu snížení průtoku mobilní fáze na 1,2 ml/min došlo k nárustu retence fruktózy až na téměř 5 min. Největší odezvu má detektor při vlnové délce 200 nm, je to však hraniční vlnová délka, při které lze identifikovat sacharidy. Obecně se sacharidy detekují při vlnové

délce 210 nm, ale na nejnižší použité koncentraci fruktózy byla odezva detektoru příliš malá, téměř nepatrná. Vlnová délka 205 nm byla zvolena jako nejlepší pro další analýzu.

#### 4.2.2. Kalibrační závislosti

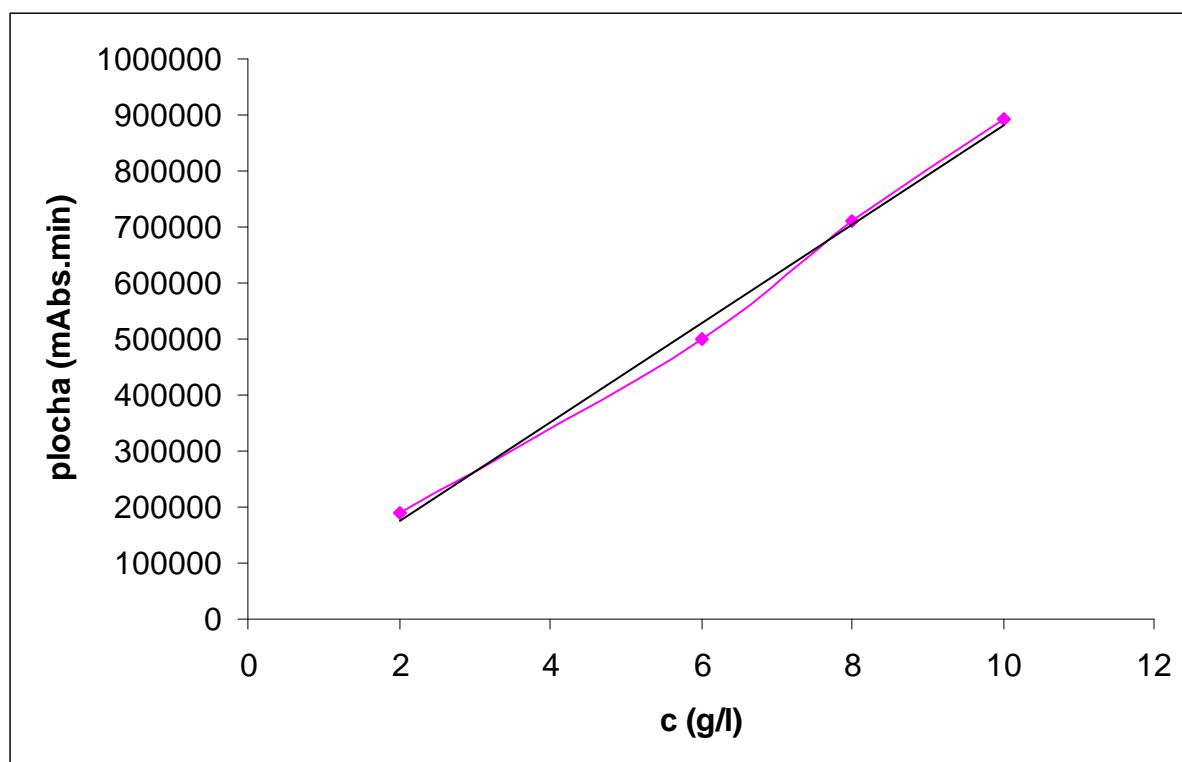
Každá koncentrace (příprava viz. 3.4.) standardních kalibračních roztoků fruktózy byla za upravených podmínek (viz. 4.2.1.) třikrát analyzována na kapalinovém chromatografu s UV detekcí s diodovým polem. Ze zjištěných ploch píků byla spočtena průměrná hodnota (viz. tabulka 13). Chyba metody stanovení fruktózy je společně se směrodatnou odchylkou uvedena v příloze 2.

**Tabulka 13: Průměrné plochy píků fruktózy**

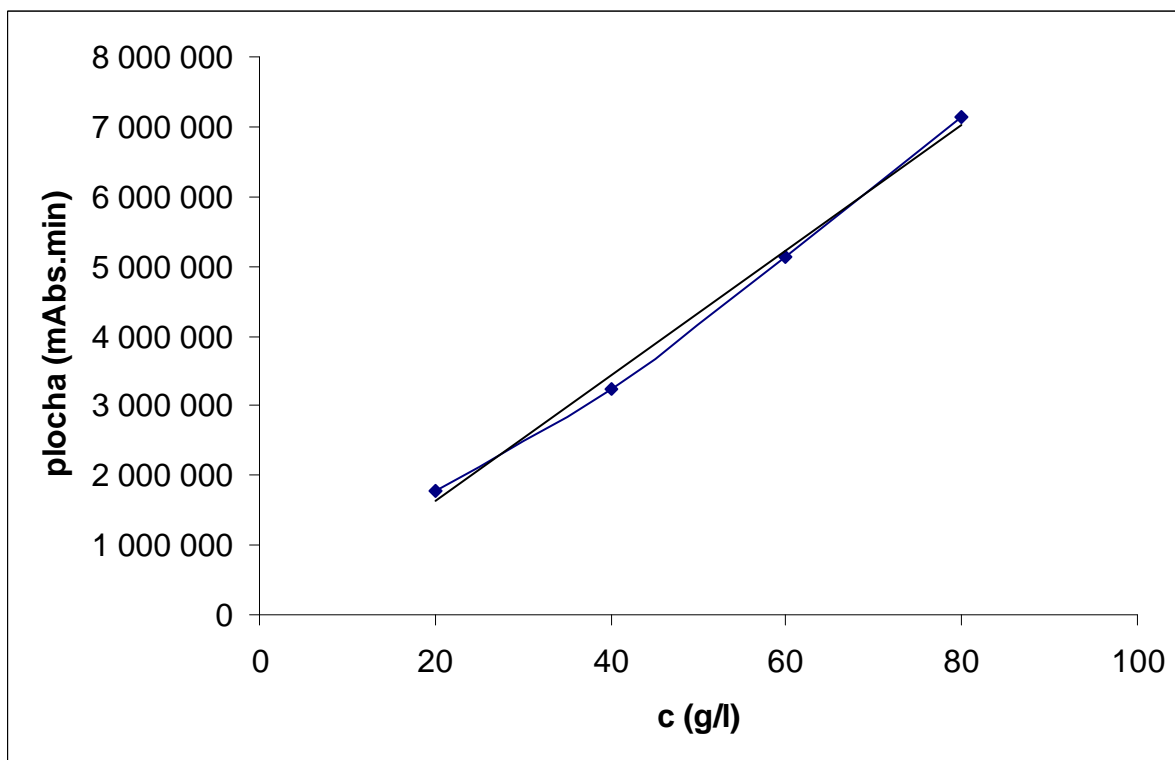
c (g·l <sup>-1</sup> )	plocha píku (mAbs·min)
2	188 000
4	411 000
6	498 000
8	710 000
10	893 000
20	1 777 000
40	3 250 000
60	5 143 000
80	7 143 000

Standard fruktózy 4 g·l<sup>-1</sup> nebyl použit při sestavování kalibrační závislosti, protože snižoval hodnotu spolehlivosti R<sup>2</sup>.

Byly sestaveny dvě kalibrační závislosti fruktózy. Jedna pro nižší koncentrace fruktózy (2 – 10 g·l<sup>-1</sup>), druhá pro vyšší koncentrace fruktózy (20 – 80 g·l<sup>-1</sup>).



**Obrázek 15: Kalibrační závislost fruktózy pro koncentrační rozmezí 2-10 g·l<sup>-1</sup>**



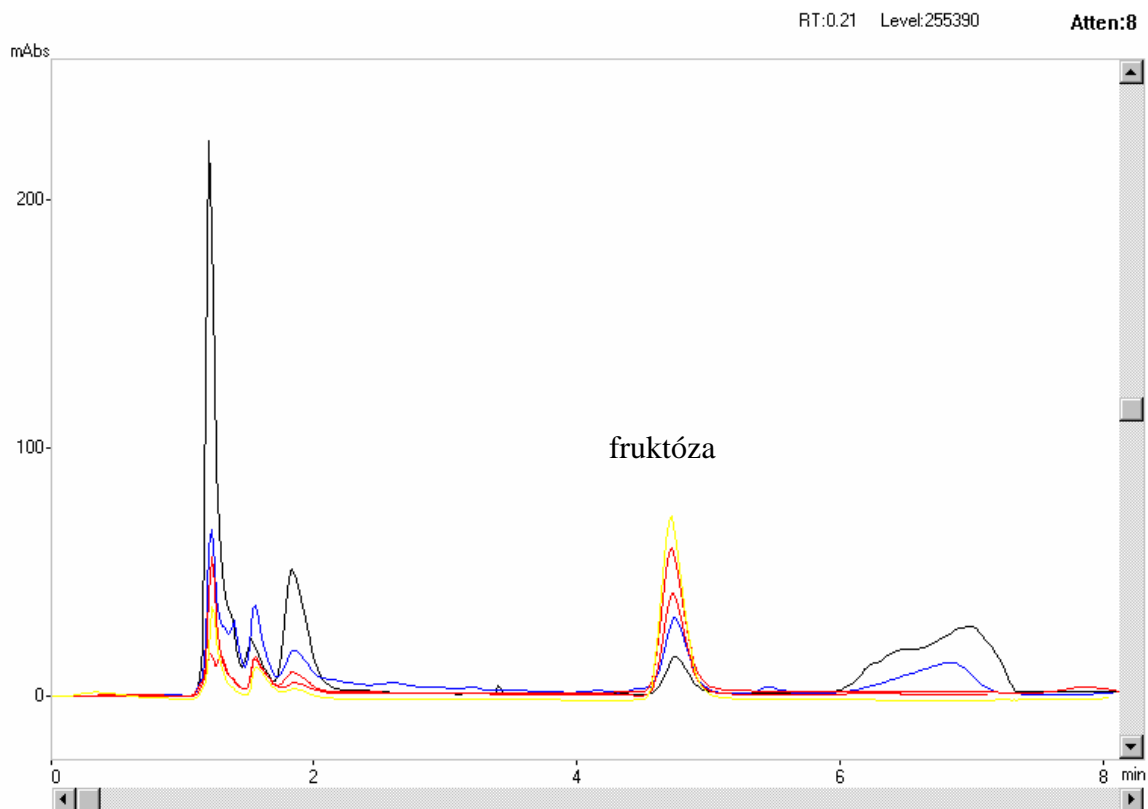
**Obrázek 16: Kalibrační závislost fruktózy pro koncentrační rozmezí 20-80 g·l<sup>-1</sup>**

Rovnice regresních přímek kalibračních závislostí:

$$1. \quad y = 88500x - 2805,4; R^2 = 0,9956 \quad (11)$$

$$2. \quad y = 89962x - 170005; R^2 = 0,9954 \quad (12)$$

Kalibrační závislosti jsou ve sledovaném rozmezí koncentrací lineární. Regresní koeficient  $R^2$  je v obou případech vyhovující.



**Obrázek 17:** Chromatogram standardů fruktózy o koncentracích 2 – 10 g·l<sup>-1</sup> při složení mobilní fáze: 75/25 ACN/voda, při průtoku: 1,2 ml/min, teplotě: 30 °C, tlaku: 47 bar

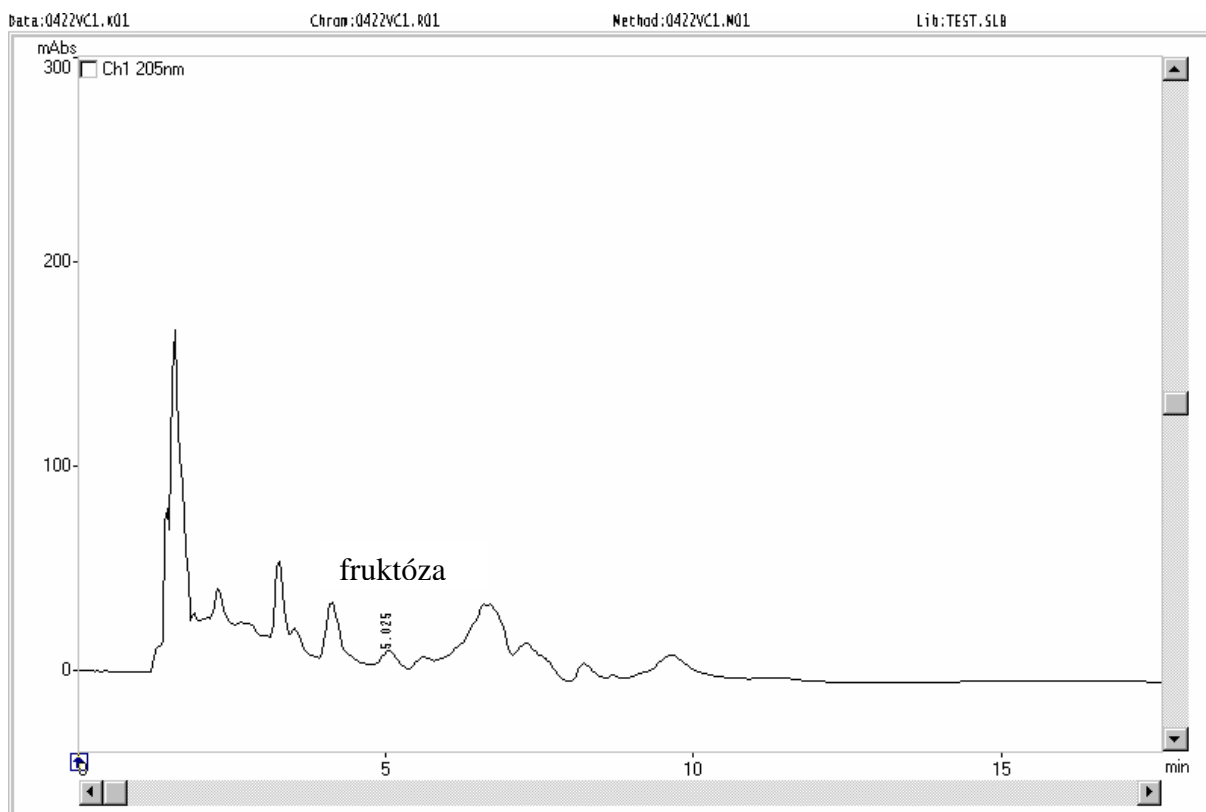
#### 4.2.3. Stanovení sacharidů v jednotlivých vzorcích vín

Vzorky vín byly za upravených podmínek (viz. 4.2.1.) analyzovány třikrát na HPLC s UV detekcí s diodovým polem. Z naměřených ploch píků byla spočtena průměrná hodnota a obsah fruktózy byl získán dosazením do rovnic kalibračních závislostí (rovnice 11 nebo 12 byla vybrána podle hodnoty plochy píku fru).

**Tabulka 14:** Hodnoty fruktózy nalezené pro víno Veltlínské červené 08

číslo měření	plocha píku (uAbs/min)
1	300 000
2	361 000
3	358 000
průměrná plocha píku (uAbs/min)	340 000
odchylka s	35 000
RSD (%)	10,2
<b>c (g·l<sup>-1</sup>)</b>	<b>3,87</b>

Průběh analýzy číslo 2 je zobrazen na obrázku 18. Pro výpočet obsahu fruktózy byla použita rovnice 11.



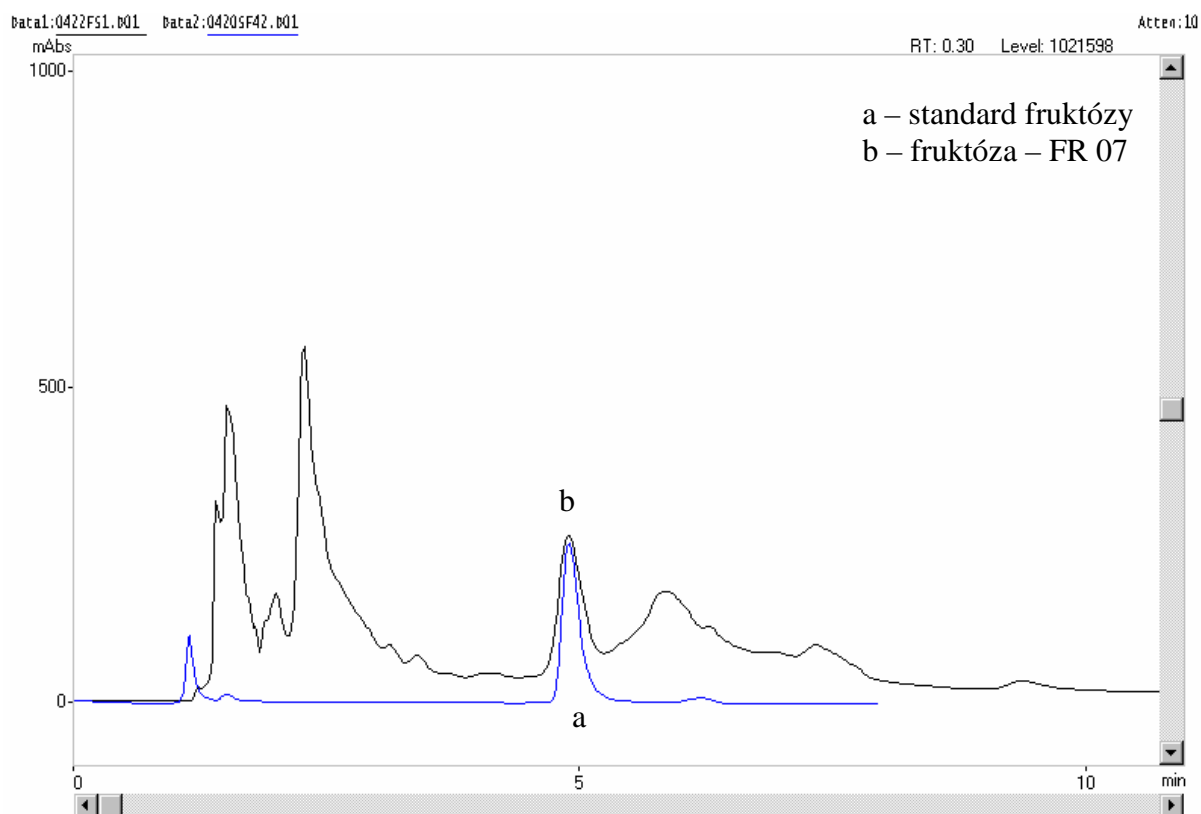
**Obrázek 18:** Analýza vzorku Veltlínské červené 08 při složení mobilní fáze: ACN/voda 75/25, při průtoku 1,2ml/min; teplotě = 30 °C, tlaku = 47 bar a vlnové délce = 205 nm

Červená vína byla kvantifikována metodou standartního přidavku fruktózy ( $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

**Tabulka 15:** Příklad získaných ploch píků fruktózy u vína Frankovka 2007

číslo měření	plocha píku s přídavkem $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ fruktózy (mAbs·min)	průměrná plocha píku (mAbs·min)	průměrná plocha píku standardu fruktózy $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (mAbs·min)	rozdíl (mAbs·min)
1	5 588 000			
2	5 718 000	5 730 000	3 250 000	2 481 000
3	5 885 000			
odchylka s	149 000			
RSD (%)	0,3			
<b>c (<math>\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>29,46</b>			

Průběh analýzy číslo 1 je zobrazen na obrázku 19. Pro výpočet obsahu fruktózy byla použita rovnice 12.



**Obrázek 19: Analýza vzorku Frankovka 2007 s vnitřním standardem fruktózy při složení mobilní fáze: ACN/voda 75/25, při průtoku 1,2ml/min; teplotě = 30 °C, tlaku = 47 bar, vlnové délce = 205 nm)**

**Tabulka 16: Koncentrace fruktózy v jednotlivých vzorcích vín**

vzorek	průměrná koncentrace ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	kategorie vín dle obsahu cukru
Veltlínské červené 2008	3,87	suché (nejvýše $4,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
Veltlínské zelené 2008	10,24	polosuché ( $4,1 - 12,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
Fankovka 2007	29,46	polosladké ( $12,1 - 45,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
Blauburger 2007	35,69	
Frankovka Král 2007	39,22	
Zweigelttriebe rosé 2008	41,68	
Tramín červený 2005	59,17	sladké (min. obsah $45,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
Tramín červený 2006	64,15	

Plocha píku fruktózy nalezená pro jednotlivé vzorky vín, spolu se směrodatnou odchylkou a chybou metody jsou uvedeny v příloze 3. Průběh analýzy jednotlivých vzorků je uveden v příloze 4.

Kapalinová chromatografie je obecně jednoduchá a rychlá metoda. Záleží však na zvoleném detektoru jak bude výsledky prezentovat. Průběh analýzy vzorků vína sledovaný UV detektorem s diodovým polem byl špatný, zvláště pak u červených vín. Fruktóza se ztrácela mezi dalšími interferujícími látkami ve víně. Řešením by bylo zjednodušení vzorku vína např. extrakcí. Nevýhodou také bylo, že detektor identifikoval pouze fruktózu, což je nedostačující. Analýza jednoho vzorku vína trvala 15 min.

Vína byla rozdělena orientačně do kategorií vín pouze dle obsahu fruktózy. Červená vína FR 07, FRK 07 a BL 07 se se svým vysokým obsahem fruktózy zařadila do úplně jiné kategorie než byla původně u vinařů, do polosuchých vín. Ostatní vína se shodovala s původním rozdělením.

### 4.3. HPLC s RI detekcí

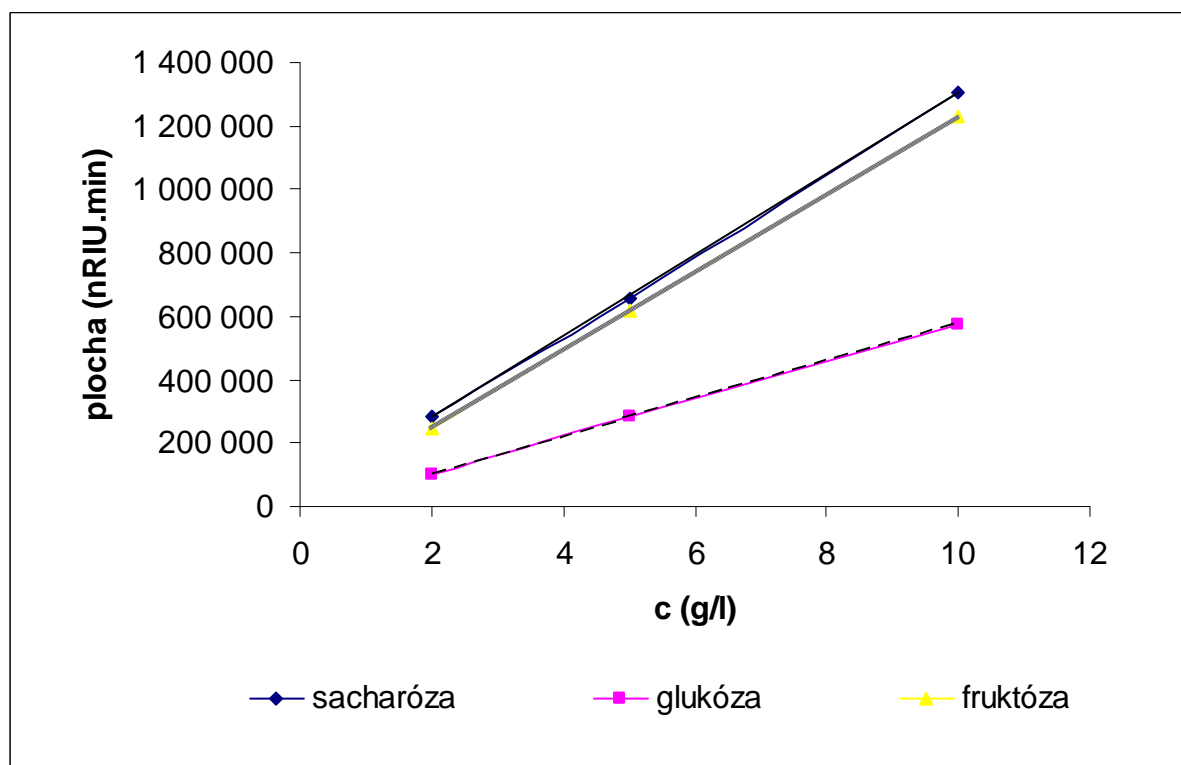
Z instrumentálních technik byla ke stanovení cukrů ve víně použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na koloně s reverzní fází. Sacharidy zde byly detekovány RI detektorem. Bylo analyzováno 8 vzorků vín s různým obsahem cukru.

#### 4.3.1. Kalibrační závislosti

Každá koncentrace (příprava viz. 3.5.) směsných standardních kalibračních roztoků glycerol + glukóza + fruktóza + sacharóza byla analyzována na kapalinovém chromatografu s RI detekcí. Plochy píku fruktózy, glukózy a sacharózy jsou v tabulce 17.

**Tabulka 17: Plochy píků glukózy, fruktózy a sacharózy.**

c (g·l <sup>-1</sup> )	plocha píku (nRIU.min)		
	glukóza	fruktóza	sacharóza
2	98 000	243 000	286 000
5	284 000	616 000	657 000
10	575 000	1 227 000	1 306 000



**Obrázek 20: Kalibrační závislosti glukózy, fruktózy a sacharózy**

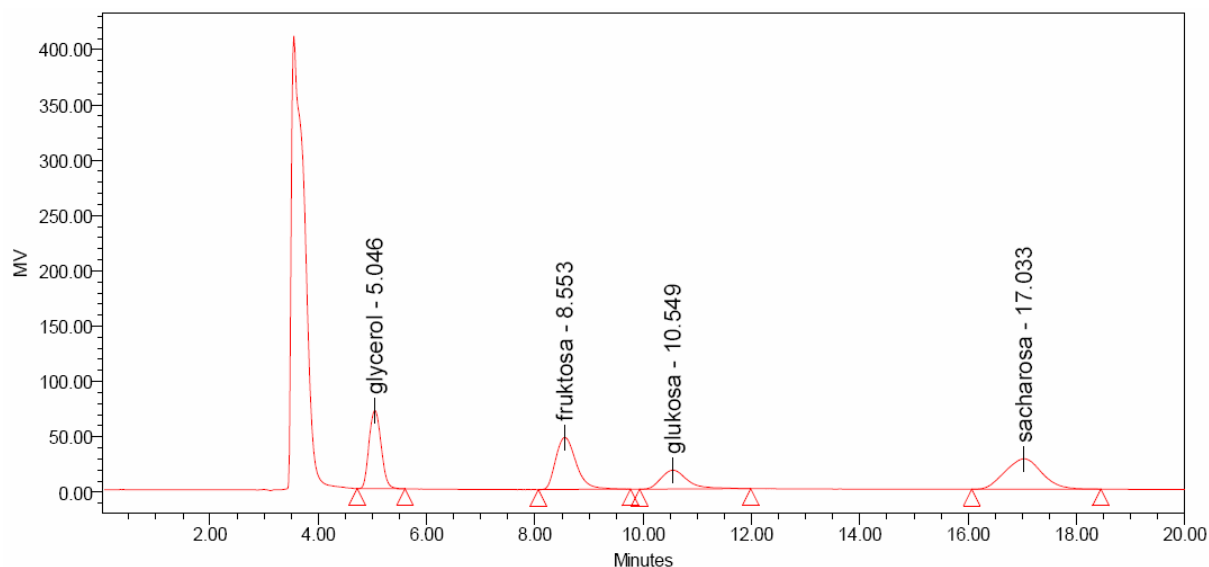
Rovnice regresních přímek kalibračních závislostí:

$$\text{glukóza: } y = 59562x + 18519; R^2 = 0,9997 \quad (13)$$

$$\text{fruktóza: } y = 122972x + 1225; R^2 = 0,9999 \quad (14)$$

$$\text{sacharóza: } y = 127713x + 26074; R^2 = 0,9999 \quad (15)$$

Kalibrační závislosti jsou ve sledovaném rozmezí koncentrací lineární. Regresní koeficient  $R^2$  je výborný, blíží se téměř k jedné.



**Obrázek 21:** Analýza směsného standardu s koncentrací  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  glycerolu + fruktózy + glukózy + sacharózy při složení mobilní fáze: ACN/voda 80/20, při průtoku  $1,0 \text{ ml/min}$ ; teplotě  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a tlaku  $580 \text{ psi}$

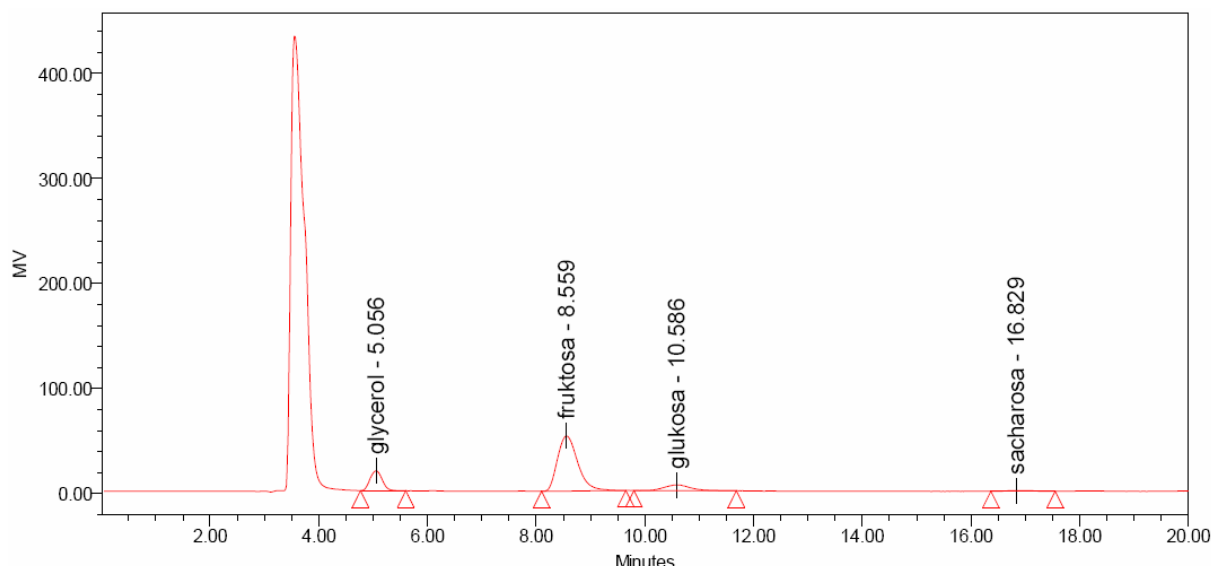
#### 4.3.2. Stanovení sacharidů v jednotlivých vzorcích vín

Vzorčky vín byly dvakrát analyzovány na HPLC s RI detekcí. Z naměřených ploch píků byla spočtena průměrná hodnota a obsah glukózy, fruktózy, popřípadě sacharózy byl získán dosazením do rovnic kalibračních závislostí jednotlivých sacharidů (viz. tabulka 19).

**Tabulka 18:** Hodnoty glukózy, fruktózy a sacharózy nalezené pro víno Tramín červený 05

číslo měření	plocha píku (nRIU.min)		
	glukóza	fruktóza	sacharóza
1	187 000	1 354 000	-
2	179 000	1 356 000	-
průměrná plocha píku (uAbs/min)	183 000	1 355 000	-
odchylka s	0,37		
RSD (%)	0,5		
c ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	16,92	55,15	-
<b>celkem c (<math>\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>72,06</b>		

Průběh analýzy číslo 1 je zobrazen na obrázku 22. Pro výpočet obsahu glukózy byla použita rovnice 13, obsahu fruktózy rovnice 14 a obsahu sacharózy rovnice 15.



**Obrázek 22: Analýza vzorku Tramín červený 05 při složení mobilní fáze: ACN/voda 80/20, při průtoku 1,0 ml/min; teplotě = 40 °C, tlaku = 580 psi**

**Tabulka 19: Hodnoty sacharidů v jednotlivých vzorcích vín**

vzorek	průměrná c (g·l <sup>-1</sup> )			celkem c (g·l <sup>-1</sup> )	kategorie vín dle obsahu cukru
	glukóza	fruktóza	sacharóza		
Veltlínské červené 2008	-	1,67	-	1,67	suché (nejvýše 4,0 g·l <sup>-1</sup> )
Blauburger 2007	-	0,32	-	0,32	
Fankovka 2007	-	1,43	-	1,43	
Frankovka Král 2007	-	1,01	-	1,01	
Veltlínské zelené 2008	-	5,73	-	5,73	polosuché (4,1 – 12,0 g·l <sup>-1</sup> )
Zweigelttriebe rosé 2008	6,81	31,47	0,66	38,94	polosladké (12,1 – 45,0 g·l <sup>-1</sup> )
Tramín červený 2006	19,29	62,05	-	81,34	sladké (min. obsah 45,0 g·l <sup>-1</sup> )
Tramín červený 2005	16,92	55,15	-	72,06	

Plochy píků glukózy, fruktózy a sacharózy nalezené pro jednotlivé vzorky vín, spolu se směrodatnou odchylkou a chybou metody jsou uvedeny v příloze 5. Průběh analýzy jednotlivých vzorků je uveden v příloze 6.

Opět byla pro stanovení sacharidů použita jednoduchá a rychlá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Zde byl pro identifikaci sacharidů zvolen RI detektor. Ukázalo se, že RI detektor je schopen zaznamenat cukry a glycerol ve víně bez dalších interferujících látek, které by rušily detekci. Z chromatogramu tak lze přesně identifikovat a kvantifikovat fruktózu, glukózu a sacharózu ve víně. Analýza jednoho vzorku trvala 20 min. Glukóza a sacharóza u některých vzorků, nebyly ve víně vůbec obsaženy nebo bylo jejich množství pod mezí detekce. Nepřítomnost glukózy se dá vysvětlit glukofilními kvasinkami účastnicích se kvašení vína.

Rozdělení do kategorií vín dle obsahu cukru odpovídá předpokládané kategorizaci od vinařů.

#### 4.4. Srovnání metod použitých pro stanovení sacharidů ve víně

Z naměřených hodnot byly sestrojeny grafy pro jednotlivé kategorie cukrů, z nichž je patrné, že hodnoty získané Skalarem i HPLC s UV detekcí mají tendenci být vyšší, než hodnoty naměřené na HPLC s RI detekcí (viz. obrázek 23 – 27 ). Stanovené hodnoty celkového cukru ze všech metod jsou uvedeny v tabulce 20. Hodnoty fruktózy z chromatografických metod jsou uvedeny v tabulce 21.

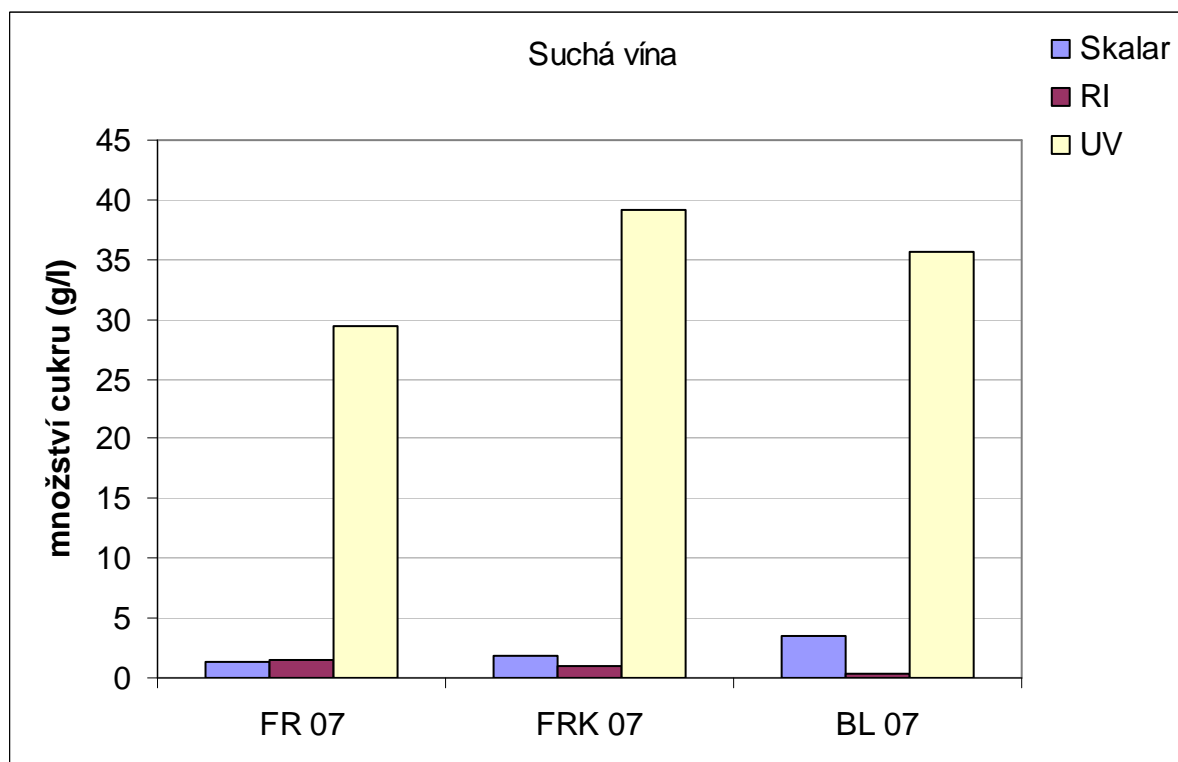
**Tabulka 20: Srovnání hodnot naměřených Skalarem a HPLC s RI a UV detekcí**

vzorek	c sacharidy ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )					
	SKALAR	RDS (%)	HPLC RI	RDS (%)	HPLC UV	RDS (%)
FR 07	1,26	20,0	1,43	0,7	29,46	0,3
FRK 07	1,90	12,3	1,01	2,8	39,22	1,3
BL 07	3,52	8,8	0,32	3,1	35,69	1,6

**Tabulka 21: Srovnání obsahu fruktózy naměřené HPLC**

vzorek	c fruktóza ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )			
	HPLC RI	RDS (%)	HPLC UV	RDS (%)
FR 07	1,43	0,7	29,46	0,3
FRK 07	1,01	2,8	39,22	1,3
BL 07	0,32	3,1	35,69	1,6
VČ 08	1,67	1,7	3,87	10,2
VZ 08	5,73	1,4	10,24	1,2
ZWR 08	31,47	0,4	41,68	4,1
TČ 05	55,15	0,0	59,17	8,4
TČ 06	62,05	0,0	64,15	7,0

#### 4.4.1. Srovnání Skalaru a HPLC metod



*Obrázek 23: Obsah celkového cukru ve vzorcích suchých vín*

Pro srovnání celkových cukrů ve vínech byla vybrána jen suchá červená vína (FR 07, FRK 07, BL 07), která byla na Skaláru analyzována nejvíce, čtyřikrát. Ostatní vína, se podařilo zanalyzovat na Skaláru jenom jednou. Chyba metody by zde nebyla směrodatná.

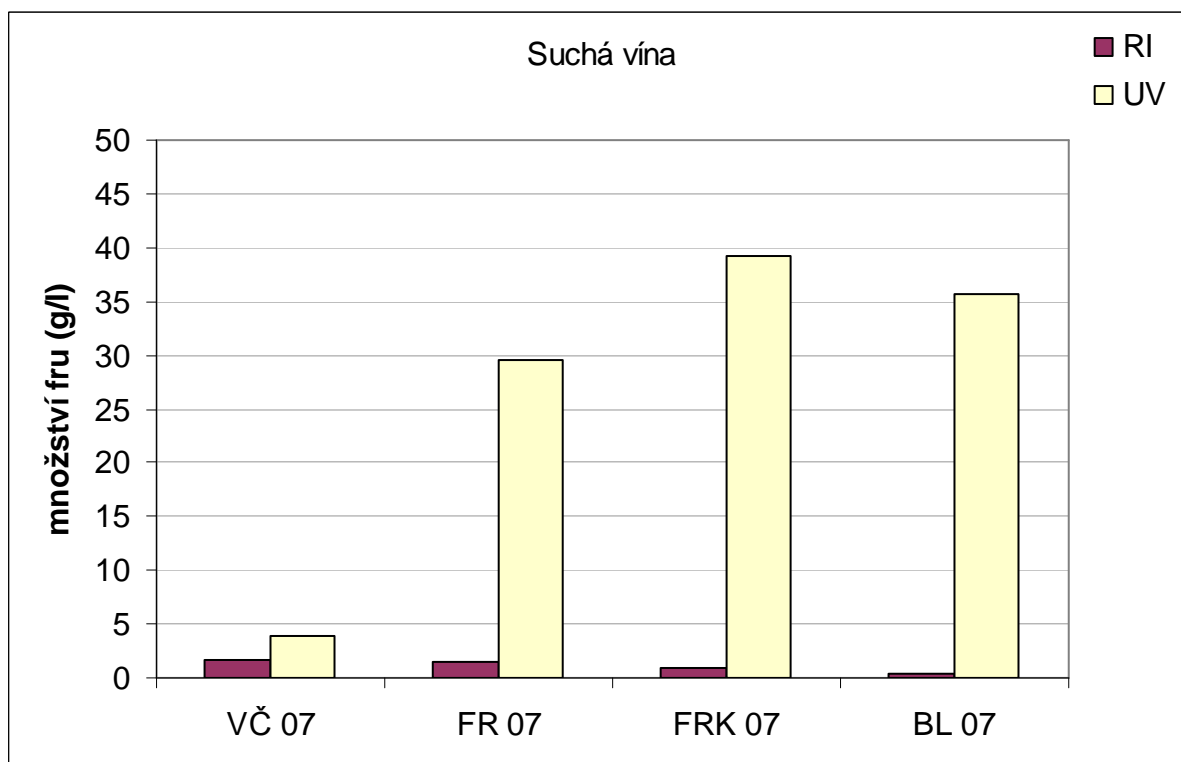
Do srovnání metod použitých pro stanovení celkového cukru byly zahrnuty i hodnoty naměřené na HPLC s UV detekcí, i když zde byla sledována jenom fru. Další měření na HPLC s RI detekcí totiž ukázalo, že ve srovnávaných červených vínech zastupuje cukry pouze fruktóza. Glukóza, popřípadě sacharóza byly obsaženy až u vín ne zcela prokvašených, tj. polosladkých a sladkých (ZWR 08, TČ 05, TČ 06).

Hodnoty naměřené kapalinovým chromatografem s RI detekcí byly nižší než hodnoty získané Skalarem a HPLC s UV detekcí. Pouze u vzorku FR 07 byly naměřeny vyšší hodnoty naměřené na HPLC s RI detekcí než hodnoty naměřené na Skaláru. Analýza na Skaláru je částečně nespecifická. Vyhodnocují vychází pouze z výšek píků. Skalarem lze stanovit pouze množství invertního cukru. Koncentrace glukózy, fruktózy a sacharózy stanovené pomocí metody HPLC mohly být ovlivněny přítomností jiných minoritních cukrů, které se vyskytují ve víně jen v nízkých koncentracích, ale podílí se na celkovém obsahu cukrů a na sladké chuti vína.

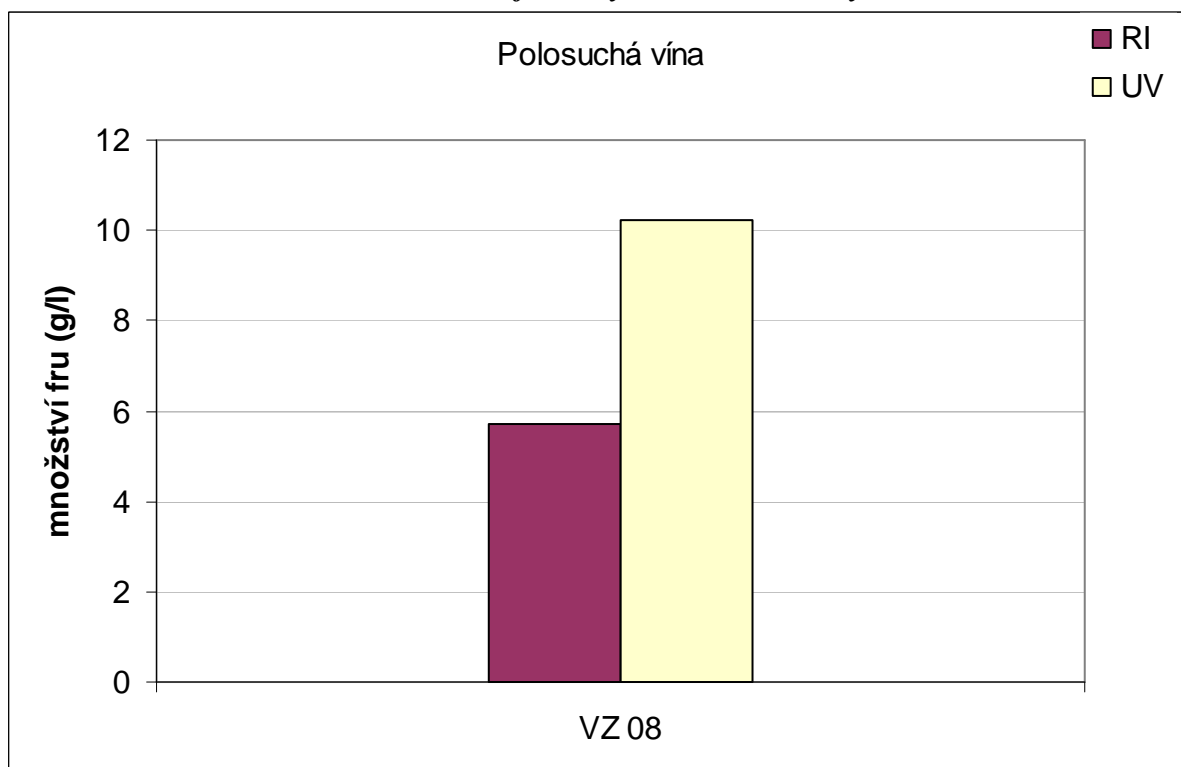
Skalar stejně jako obě HPLC metody jsou náročné na kalibraci a následné promývání. U Skaláru je při každém novém měření nutné zařadit standardní roztoky, podle kterých se vyhodnocuje obsah redukujících cukrů. Přípravná fáze tak prodlužuje celkovou analýzu. U HPLC není doba analýzy tak dlouhá, ale je použita alkylaminová stacionární fáze, která má krátkou životnost, proto jsou HPLC metody nákladnější.

Na stanovení sacharidů na HPLC je potřeba pouze 5 – 20 µl vzorku na jednu analýzu, na Skaláru se však spotřebuje až 10 ml.

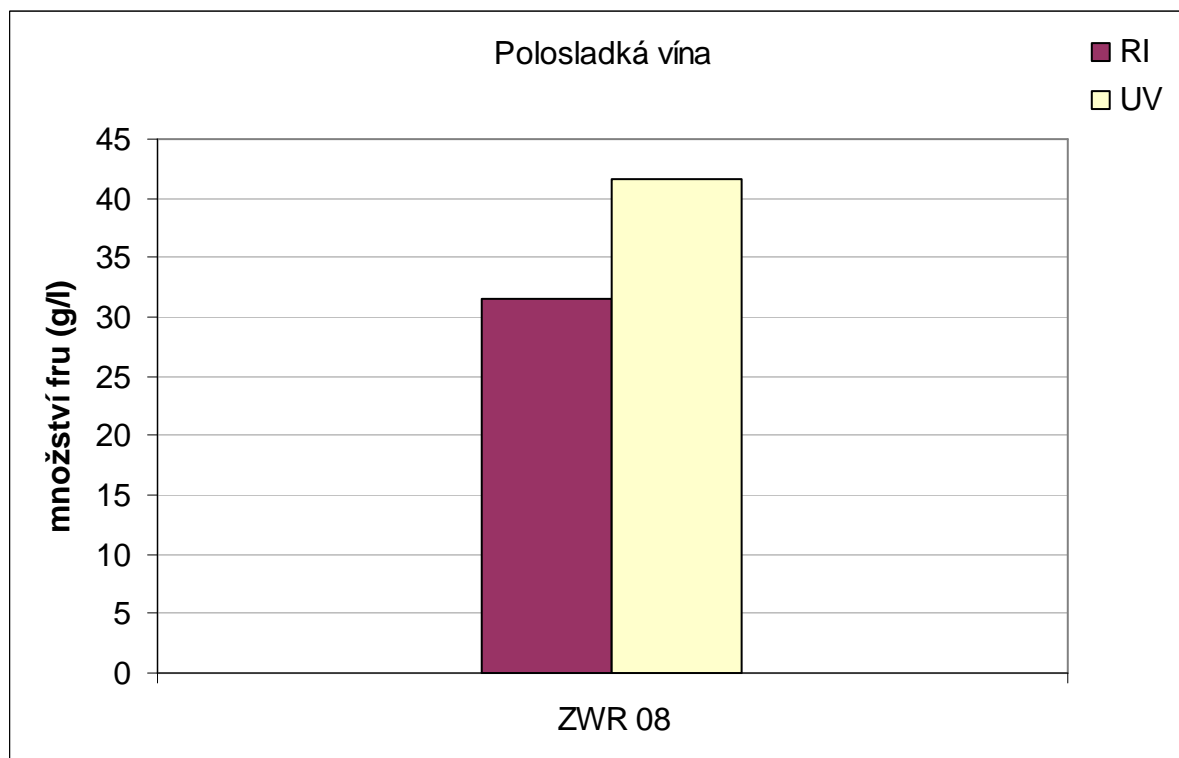
#### 4.4.2. Srovnání HPLC metod



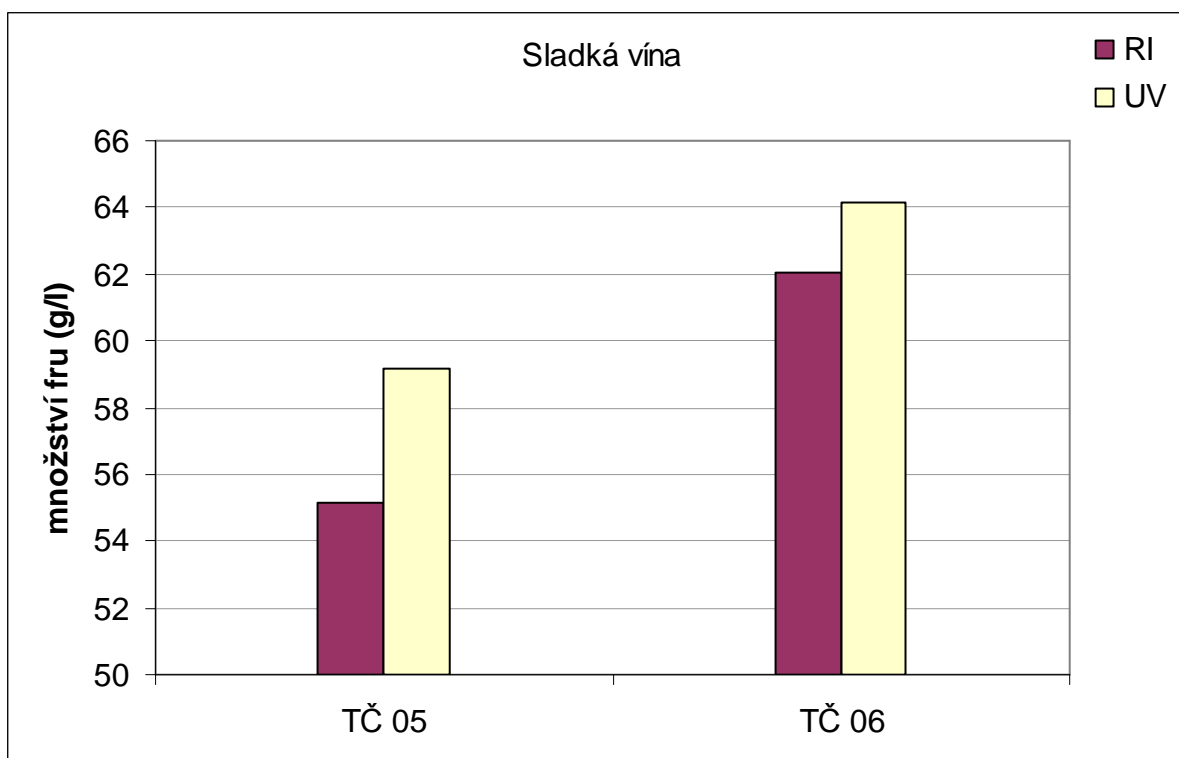
Obrázek 24: Obsah fruktózy ve vzorcích suchých vín



Obrázek 25: Obsah fruktózy ve vzorku polosuchých vín



**Obrázek 26: Obsah fruktózy ve vzorku polosladkých vín**



**Obrázek 27: Obsah fruktózy ve vzorcích sladkých vín**

Pro srovnání obou HPLC metod byly použity hodnoty obsahu fruktózy v jednotlivých vzorcích vín, které byly analyzovány na HPLC s RI a UV detekcí, protože UV detektor zaznamenával jenom fruktózu.

Hodnoty naměřené kapalinovým chromatografem s UV detekcí byly vyšší, někdy mnohem vyšší než hodnoty získané HPLC s RI detekcí, i když byl použitý stejný systém stacionární a mobilní fáze. Nevýhodou HPLC s UV detekcí je, že při vlnové délce kolem 200 nm detektor zaznamenával nejenom cukry, ale i další interferující látky v použité matrici vína. Tento problém se vyskytl hlavně u červených vín. Hodnoty fruktózy naměřené na UV detektoru byly téměř 39 krát větší u FRK 07, 20 krát větší u FR 07 a dokonce až 110 krát větš u BL 07, což najednou tyto vzorky přerazuje o dvě kategorie dál do polosladkých vín. U sladkých a polosladkých vín nebyl rozdíl tak patrný.

## 5. ZÁVĚR

V rámci literární rešerše byly z dostupných zdrojů zpracovány informace o vlastnostech sacharidů přítomných ve víně a možnostech jejich stanovení. Byla popsána technologie výroby vína, která je odlišná pro bílé a červené víno, průběh kvašení, složení vína, způsoby přislazování vín a určování cukernatosti.

Hlavním cílem této práce bylo porovnání metod používaných ke stanovení jednoduchých cukrů ve víně, a to hlavně vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a RI detekcí a automatického analyzátoru Skalaru.

V experimentální části diplomové práce byly stanovovány jednoduché sacharidy ve vzorcích vín. Kapalinovou chromatografií byly stanoveny glukóza, fruktóza a sacharóza jednotlivě, Skalarem byly stanoveny celkově redukující cukry.

Pro kvantitativní stanovení glukózy, fruktózy a sacharózy i celkových redukujících cukrů byly použity kalibrační závislosti pro jednotlivé standardní roztoky. Glukóza, fruktóza a sacharóza byly identifikovány porovnáním retenčních časů jednotlivých píků vzorku s retenčním časem standardu glukózy, fruktózy a sacharózy. Byla analyzována vína bílá, červená a růžová. Dle obsahu celkového cukru byla vína rozdělena do 4 kategorií: suchá, polosuchá, sladká a polosladká.

Kapalinovou chromatografií s RI detekcí byl celkový obsah cukru (glukóza, fruktóza, popřípadě sacharóza) u suchých vín naměřen v rozsahu od 0,315 do 1,670 g·l<sup>-1</sup>. Nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku VČ 08 a nejnižší hodnota u vzorku BL 07. Další skupinu tvořila vína polosuchá, zastoupená jedním vzorkem VZ 08. Vína polosladká byla zastoupena také jedním vzorkem ZWR 08. Jednalo se o víno jakostní s přívlaskem výběr z hroznů nebo výběr z bobulí, které obecně má vyšší obsah zbytkového cukru. Nejvyšší obsah cukru byl analyzován u vzorků Tramínu červeného různého stáří, což by se dalo předpokládat vzhledem k tomu, že se jedná o slámové víno, které je charakteristické vysokým obsahem zbytkového cukru a řadí se do kategorie sladkých vín.

Kapalinovou chromatografií s UV detekcí byl celkový obsah cukru (v tomto případě reprezentovaný pouze fruktózou) u suchých vín jednoznačně stanoven u vzorku VČ 08. Odlehle hodnoty byly naměřeny u vzorků FR 08, FRK 08 a BL 08, kde se obsah fruktózy pohyboval v intervalu od 29,463 g·l<sup>-1</sup> do 39,215 g·l<sup>-1</sup>, což odpovídá hodnotám polosladkých vín. Vína polosuchá a polosladká byla zastoupena každé pouze jedním vzorkem; polosuché VZ 08 a polosladké ZWR 08. Vína sladká zahrnovala dva vzorky TČ 05 a TČ 06. HPLC s UV detekcí nebyla schopna stanovit glukózu a sacharózu ve vzorcích vín, proto zde nešlo o rozdělení do kategorie vín dle celkového obsahu cukru, ale jen orientačně podle obsahu fruktózy.

Z údajů získaných stanovením Skalarem plynou následující závěry: Z celkového počtu 20 vzorků byly zastoupeny 75 % vína suchá. Množství celkového cukru stanoveného ve vzorcích suchých vín se nacházelo v intervalu od 0,120 do 3,936 g·l<sup>-1</sup>. Další skupinu tvořila vína polosuchá, která obsahovala 4,597 a 7,312 g·l<sup>-1</sup> zbytkového cukru. Nejvyšší obsah cukru 93,12 g byl analyzován u vzorků TČ 06, což je slámové víno, které se řadí do kategorie sladkých vín.

Z naměřených hodnot byly sestrojeny grafy pro jednotlivé kategorie cukernatosti vín. Z grafů je patrné, že hodnoty získané analýzou Skalarem a mají tendenci být vyšší, než hodnoty naměřené na kapalinovém chromatografu s RI detekcí. Skalar totiž stanovuje celkově redukující cukry, včetně cukrů minoritních, které se kapalinovou chromatografií nestanovovaly.

Metoda HPLC s RI detekcí pro stanovení jednoduchých cukrů ve víně byla ověřena na reálných vzorcích vín, čímž se dokázala její použitelnost v praxi. Dokázala, že je vhodnou

a přesnou metodou na stanovení sacharidů ve víně. RI detektor nezaznamenával jiné interferující látky, což usnadnilo následné vyhodnocení z chromatogramu. O přesnosti stanovení jednotlivých sacharidů svědčilo i to, že největší chyba metody byla pouze 3,1 %. Kapalinovou chromatografií s RI detekcí se sice nestanoví celá suma redukujících cukrů, ale zjištěné množství hlavních sacharidů je přesné. OIV metodu na stanovení sacharidů pomocí HPLC s RI detekcí požaduje Evropská Unie.

Levnější a zcela dostačující metodu pro základní rozdělení vín do kategorií vín dle obsahu cukru je analýza pomocí Skalaru. S ohledem na veškeré (i minoritní) redukující cukry obsažené ve víně se výsledky obsahu sacharidů lišily minimálně od HPLC s RI detekcí. Chyba metody, která zde byla u FR 07 až 20 % , by se dala snížit opakovaným měřením pomocí odborného personálu.

Nejméně vhodnou metodou je HPLC s UV detekcí. Ukázal to špatný průběh analýzy, hlavně u červených vín, a neschopnost identifikovat a odlišit další sacharidy (glukózu a sacharózu). Řešením by bylo zjednodušení vzorku vína extrakcí, což by ale celou metodu zdražilo.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Farkaš, J.: *Technologie a biochemie vína*. 2. přeprac. a doplň. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980. 870 s.
- [2] Steidl, R.: *Sklepní hospodářství*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2002. 307 s. ISBN 80-903201-0-4.
- [3] Zákon o vinohradnictví a vinařství 321/2004 Sb.
- [4] Prof. Ing. Kadlec P., DrSc. A kol.: *Technologie potravin I*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [5] Minárik, E., Navara, A.: *Chemia a mikrobiologia vína*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1986. 560 s.
- [6] Cabálková, J.: *Stanovení mono- a disacharidů v citrusových šťávách pomocí HPLC a CE*. Brno, 2002. 83 s. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického na Ústavu chemie a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce RNDr. Josef Chmelík, CSc.
- [7] Lodder, J. a kol.: *The Yeast a Taxonomic Study*. Amsterdam – London, North – Holland publ. Co. 1970.
- [8] Hubáček, V.: *Výroba réвовého vína*. Institut výchovy a vzdělávání MZe ČR v Praze, 1997. ISBN 80-7105-140-3.
- [9] Kraus, V., Kuttelvašer, Z., Vurm, B.: *Encyklopedie českého a moravského vína*. 1. vyd. Praha: Melantrich, 1997. 223 s. ISBN 80-7023-250-1.
- [10] Malík, F., Minárik, E. : *Liehovárnictvo, Droždiarstvo, Vinárstvo – část: Vinárstvo*. Bratislava: Slovenská vysoká škola technická v Bratislave v Edičnom stredisku SVŠT, 1983.
- [11] Dostupné z: <http://www.svetvina.cz.html>
- [12] Velíšek, J.: *Chemie potravin 1, 2, 3*. Vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-86659-03-8.
- [13] Amerine, M.A., Ough, C.S.: *Methods for analysis of must and wines*. 2. vyd. University of California. Toronto, 1980. ISBN 0-471-05077-6.
- [14] Bc. Bábíková, P.: *Metody stanovení sacharidů ve víně a možnosti jejich využití*. Lednice, 2006. 90 s. Diplomová práce na Zahradnické fakultě Mendlovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Vedoucí diplomové práce Ing. Michal Kumšta.
- [15] Prof. Ing. Příbela, A., DrSc.: *Analýza potravin*. 1. vyd. Bratislava: STU, 1991. 225 s. ISBN 80-227-0374-5.

- [16] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. Praha: Academia, 2002. 192 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [17] Šandera, K., Sázavský, V. a spolupracovníci: *Analytika cukrů* (Metodické základy a laboratorní příručka). Praha: SNTL, 1959.
- [18] Ing. Čopíková, J., CSc.: *Chemie a analytika sacharidů*. VŠCHT Praha: 1997. 104 s. ISBN 80-7080-306-1.
- [19] Sommer, L.: *Základy analytické chemie II*. VUTIUM Brno: 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [20] Meyer, V. R.: *Chromatography/Principles*. Switzerland: EMPA St Gallen, 2005.
- [21] Churáček, J. a kol.: *Kapalinová chromatografie. Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s. ISBN 04-626-90.
- [22] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [23] Čůta, Popl a kolektiv: *Separční metody. Instrumentální analýza*. 1986.
- [24] Ding, M., Wei, Y.: Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 904, pp. 113-117.
- [25] Yuan, J.-P., Chen, F.: Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC – dual detection. *Food Chemistry*, 1999, vol. 64, pp. 423-427.
- [26] Zhu, J., Zhang, X., Niu, W.: Simultaneous determination of carbohydrates and organic acid in beer and wine by ion chromatography. *Mikrochimica Acta*, 1997, vol. 127, pp. 189-194.
- [27] Firemní materiály firmy Supelco
- [28] *Sigma-Aldrich* [online], aktualizace 2009 [cit. 17.3.2009]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=58338|SUPELCO&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=58338|SUPELCO&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- [29] Firemní materiály firmy Waters
- [30] Firemní materiály firmy Agilent Technologies, Agilent ZORBAX Carbohydrate Analysis Column. 2003.
- [31] *Sigma-Aldrich* [online], aktualizace 2009 [cit. 17.3.2009]. Dostupné z: <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/columns/lcandlems/zorbaxcarbohydrateanalysis/pages/default.aspx>

- [32] Firemní materiály firmy Phenomenex
- [33] Firemní materiály firmy Restek
- [32] Churáček J. a koloktív: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academia Praha. 1993.
- [33] Kakita, H. et al.: Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 961, pp. 77-82. ISSN 0021-9673.
- [34] Vonach R., Lendl B., Kellner R.: High-performance liquid chromatography with real-time Fouriertransform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acid in wines. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 8247, pp. 159-167.
- [35] Churms S. C.: *Carbohydrates/Sugars – Chromatographic methods*. University of Cape Town, Rondebosch, South Africa. 2005
- [36] Scott R.: *Chromatography: Liquid/Detectors: Refractive index detector*. Avon, CT, USA. 2000.
- [37] Cataldi TRI., Nardiello D.: Determination of free proline and monosaccharides in wine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, vol. 51, pp. 3737-3742.
- [38] Dostupné z: [www.aix-lin.upol.cz/~jirovsky/IM\\_HPLC\\_2.pdf](http://www.aix-lin.upol.cz/~jirovsky/IM_HPLC_2.pdf)
- [39] Dostupné z: [www: http://www.chemagazin.cz/Texty/CHXVI\\_5\\_cl3.pdf](http://www.chemagazin.cz/Texty/CHXVI_5_cl3.pdf)
- [40] Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/isolacebmm/skripta.pdf>
- [41] Farine S., Versluis C., Bonnici P.J., Heck A., Peschet J.L., Puigserver A., Biagini A.: Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 920, pp. 299-308.
- [42] Veronese T., Bouchu A., Perlot P.: Rapid method for trehalulose production and its purification by preparative high-performance liquid chromatography. *Biotechnology techniques*, 1999, vol. 13, pp. 43-48.
- [43] Navarro A., Caruel H., Rigal L., Phemius P.: Continuous chromatographic separation process: Simulated moving bed allowing simultaneous withdrawal of three fractions. *Journal of chromatography A*. 1997, vol. 770, pp. 39-50.

- [44] Du QZ., Wang K.: Preparative separation of phenolic constituents in the fruits of *Luffa cylindrica* (L.) roem using slow rotary countercurrent chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2007, vol. 30, pp. 1915-1922.
- [45] Zhao WH., Gao CC., Ma XF., Bai XY., Zhang YX.: The isolation of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose from *Acer truncatum* Bunge by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography b-analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2007, vol. 850, pp. 523-527.
- [46] Mehrlander K., Dietrich H., Sembries S., Dongowski G., Will F.: Structural characterization of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction. *Journal of agricultural and food chemistry*. 220, vol. 50, pp. 1230-1236.
- [47] Firemní materiály firmy Skalar, Skalar analytical – Manual San Plus Analyzer, S.F.A.S.
- [48] Dostupné z: [www.skalar.com](http://www.skalar.com)
- [49] Balík J.: *Vinařství – návody do laboratorního cvičení*. MZLU Brno. 2005. ISBN 80-7157-809-6.
- [50] Technická norma ČSN 56 0216 platná od 1. 2. 1994

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 7.1. Seznam použitých zkratek

ACN – acetonitril

ASVK – aktivované sušené vinné kvasinky

BOK – biologické odbourávání kyselin

DAD – diode array detector – detektor diodového pole (typ UV detektoru)

ECD – elektrochemický detektor

ELSD – evaporative light scattering detector – detektor světelného rozptylu

FLD – fluorescenční detektor

HPLC – high performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IMP – ion-moderated partitioning – ionově řízená rozdělovací chromatografie

ISO – International Organization for Standardization – Mezinárodní organizace pro standardizaci

°KMW – stupeň Klosterneuburského moštoměru

°NM – stupeň normovaného moštoměru

NMR – nukleární magnetická rezonance

OIV – Office internationale de la vigne et du vin – mezinárodní organizace pro révu a víno

Psi – pound-force per sq. inch – jednotky tlaku

RSD – relativní směrodatná odchylka (chyba metody)

RID – refractive index detector – refraktometrický detektor

UVD – ultra violet detector – detektor v ultra fialové oblasti světelného spektra

## 7.2. Seznam použitých symbolů

c	koncentrace [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
ID	vnitřní průměr kolony [mm]
L	délka kolony [mm]
$\lambda$	vlnová délka [nm]
LC	kapacita kolony [mmol]
n	počet měření
p	tlak [Pa, bar, psi]
s	směrodatná odchylka
t	teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
V	objem [l; $\text{m}^3$ ]
x	výška (plocha) píku [mm; $\text{mAbs}\cdot\text{min}$ ; $\text{nRIU}\cdot\text{min}$ ]
$\bar{x}$	průměrná výška (plocha) píku [mm; $\text{mAbs}\cdot\text{min}$ ; $\text{nRIU}\cdot\text{min}$ ]

## **8. SEZNAM PŘÍLOH**

### **Skalar**

Příloha 1: Obsah redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích vín

### **HPLC s UV detekcí**

Příloha 2: Naměřené hodnoty kalibračních závislostí fruktózy

Příloha 3: Naměřené hodnoty fruktózy pro jednotlivé vzorky vín

Příloha 4: Průběh analýzy jednotlivých vzorků vín

### **HPLC s RI detekcí**

Příloha 5: Naměřené hodnoty glukózy, fruktózy, sacharózy pro jednotlivé vzorky vín

Příloha 6: Průběh analýzy jednotlivých vzorků vín

## 9. PŘÍLOHY

### 9.1. Naměřené údaje pro Skalar

#### 9.1.1. Příloha 1: Obsah redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích vín

A) Měření č. 1

Měření č. 1		$y = 3,125x + 4,625$		$R^2 = 0,9945$	
vzorek	výška píku (mm)	Ø výška píku (mm)	odchylka s	RSD (%)	c (g·l <sup>-1</sup> )
cuvé 08 7	6,0	6,0	0,0	0,0	0,44
8	6,0				
9	6,0				
RB 08 10	6,5	6,7	0,3	4,4	0,66
11	6,5				
12	7,0				
RŠ 08 13	6,5	6,7	0,3	4,4	0,66
14	7,0				
15	6,5				
16					
VZ 07 17	18,0	18,2	0,3	1,6	4,34
18	18,5				
19	18,0				
RR 07 20	20,0	20,0	0,0	0,0	4,92
21	20,0				
22	20,0				
MM 07 23	7,0	7,0	0,0	0,0	0,76
24	7,0				
25	7,0				
26					
RR 08 27	7,5	7,5	0,0	0,0	0,92
28	7,5				
29	7,5				
RV 07 30	17,0	17,2	0,3	1,7	4,02
31	17,5				
32	17,0				
FR 07 33	9,5	9,7	0,3	3,0	1,62
34	10,0				
35	9,5				
36					

ZW 07 37	8,0	8,2	0,3	3,6	1,14
38	8,5				
39	8,0				
ZW 08 40	6,5	6,7	0,3	4,4	0,66
41	6,5				
42	7,0				
ROŠÉ 43	5,0	5,0	0,0	0,0	0,12
44	5,0				
45	5,0				
46					
PN 07 47	8,5	8,3	0,3	3,5	1,18
48	8,0				
49	8,5				
BL 07 50	17,0	17,0	0,0	0,0	3,96
51	17,0				
52	17,0				
FRK 07 53	11,5	11,5	0,0	0,0	2,20
54	11,5				
55	11,5				
56					

B) Měření č. 2

Měření č. 2		$y = 3,475x + 7,050$		$R^2 = 0,9935$	
vzorek	výška píku (mm)	Ø výška píku (mm)	odchylka s	RSD (%)	c (g·l <sup>-1</sup> )
cuvé 08 7	7,0	7,0	0,0	0,0	-0,01*
8	7,0				
9	7,0				
RB 08 10	7,5	7,3	0,3	4,0	0,07*
11	7,5				
12	7,0				
RŠ 08 13	7,0	7,2	0,3	4,0	0,04*
14	7,0				
15	7,5				
16					
VZ 07 17	20,0	20,0	0,0	0,0	3,73
18	20,0				
19	20,0				
RR 07 20	22,0	22,0	0,0	0,0	4,30
21	22,0				

22	22,0				
MM 07 23	8,0				
24	8,0	8,0	0,0	0,0	0,27
25	8,0				
26					
RR 08 27	8,0				
28	8,0	8,0	0,0	0,0	0,27
29	8,0				
RV 07 30	19,0				
31	19,0	19,0	0,0	0,0	3,44
32	19,0				
FR 07 33	11,0				
34	11,0	10,8	0,3	2,7	1,08
35	10,5				
36					
ZW 07 37	9,5				
38	9,5	9,5	0,0	0,0	0,71
39	9,5				
ZW 08 40	7,0				
41	7,0	7,0	0,0	0,0	-0,01*
42	7,0				
ROSÉ 43	6,0				
44	6,0	6,0	0,0	0,0	-0,30*
45	6,0				
46					
PN 07 47	9,5				
48	9,5	9,5	0,0	0,0	0,71
49	9,5				
BL 07 50	18,5				
51	18,5	18,7	0,3	1,6	3,35
52	19,0				
FRK 07 53	13,0				
54	13,0	12,8	0,3	2,3	1,66
55	12,5				
56					

## C) Měření č. 3

Měření č.3		$y = 3,600x + 6,550$		$R^2 = 0,9966$	
vzorek	výška píku (mm)	Ø výška píku (mm)	odchylka s	RSD (%)	c (g·l <sup>-1</sup> )
cuvé 08 7	7,0	7,0	0,0	0,0	0,13
8	7,0				
9	7,0				
RB 08 10	7,5	7,5	0,0	0,0	0,26
11	7,5				
12	7,5				
RŠ 08 13	7,0	7,2	0,3	4,0	0,18
14	7,0				
15	7,5				
16					
VZ 07 17	20,0	20,0	0,0	0,0	3,74
18	20,0				
19	20,0				
RR 07 20	23,0	23,0	0,0	0,0	4,57
21	23,0				
22	23,0				
MM 07 23	8,0	8,0	0,0	0,0	0,40
24	8,0				
25	8,0				
26					
RR 08 27	8,0	8,0	0,0	0,0	0,403
28	8,0				
29	8,0				
RV 07 30	19,0	19,3	0,3	1,5	3,54
31	19,5				
32	19,5				
FR 07 33	10,5	10,5	0,0	0,0	1,01
34	10,5				
35	10,5				
36					
ZW 07 37	9,0	9,0	0,0	0,0	0,68
38	9,0				
39	9,0				
ZW 08 40	7,0	7,0	0,0	0,0	0,13
41	7,0				
42	7,0				

ROŠÉ 43	6,0	6,0	0,0	0,0	-0,15*
44	6,0				
45	6,0				
46					
PN 07 47	9,0	9,0	0,0	0,0	0,68
48	9,0				
49	9,0				
BL 07 50	18,0	18,3	0,3	1,6	3,26
51	18,5				
52	18,5				
FRK 07 53	13,0	13,0	0,0	0,0	1,79
54	13,0				
55	13,0				
56					

\* Nízke nebo záporné hodnoty nebyly započítány do průměru.

#### D) Měření č. 4

Měření č.4		$y = 8,650x + 84,450$		$R^2 = 0,9986$	
vzorek	odezva detektoru (mV)	Ø odezva (mV)	odchylka s	RSD (%)	c (g·l <sup>-1</sup> )
VČ 08 7	95,0	94,7	0,6	0,6	1,19
8	94,0				
9	95,0				
VZ 08 10	148,0	147,7	0,6	0,4	7,31
11	148,0				
12	147,0				
ZWR 0813	265,0	267,0	1,7	0,6	42,21
14	268,0				
15	268,0				
16					
TČ 06 17	164,0	165,0	1,7	1,0	93,12
18	164,0				
19	167,0				
TČ 05 20	155,0	154,7	0,6	0,4	81,21
21	154,0				
22	155,0				
FR 07 23	95,0	95,3	0,6	0,6	1,25
24	95,0				
25	96,0				

26					
BL 07 27	115,0	114,7	0,6	0,5	3,50
28	114,0				
29	115,0				
FRK 07 30	101,0	101,3	0,6	0,6	1,95
31	101,0				
32	102,0				
33					

## 9.2. Naměřené údaje pro HPLC s UV detekcí

### 9.2.1. Příloha 2: Naměřené hodnoty kalibračních závislostí fruktózy

číslo měření	c (g·l <sup>-1</sup> )	plocha píku (mAbs·min)	průměrná plocha píku (mAbs·min)	odchylka s	RSD (%)
1	2	194 000	188 000	6 000	2,9
2	2	183 000			
3	2	187 000			
4	4	407 000	411 000	10 000	2,4
5	4	404 000			
6	4	423 000			
7	6	506 000	498 000	11 000	2,2
8	6	486 000			
9	6	504 000			
10	8	712 000	710 000	6 000	0,9
11	8	703 000			
12	8	715 000			
13	10	897 000	893 000	11 000	1,2
14	10	882 000			
15	10	902 000			
16	20	1 755 000	1 777 000	30 000	1,7
17	20	1 765 000			
18	20	1 811 000			
19	40	3 210 000	3 250 000	38 000	1,2
20	40	3 285 000			
21	40	3 255 000			
22	60	5 153 000	5 143 000	18 000	0,4
23	60	5 122 000			
24	60	5 153 000			
25	80	7 384 000	7 143 000	218 000	3,1
26	80	6 957 000			
27	80	7 089 000			

## 9.2.2. Příloha 3: Naměřené hodnoty fruktózy pro jednotlivé vzorky vín

### A.) Bílá a růžová vína

číslo měření	vzorek	plocha píku (mAbs·min)	průměrná plocha píku (mAbs·min)	odchylka s	RSD (%)	c (g·l <sup>-1</sup> )
1	VČ 08	300 000	340 000	35 000	10,2	3,87
2	VČ 08	361 000				
3	VČ 08	358 000				
4	VZ 08	906 000	903 000	10 000	1,2	10,24
5	VZ 08	912 000				
6	VZ 08	892 000				
7	ZWR 08	3 504 000	3 579 000	148 000	4,1	41,68
8	ZWR 08	3 750 000				
9	ZWR 08	3 483 000				
10	TČ 05	2 666 000	2 492 000	208 000	8,4	29,59
11	TČ 05	2 548 000				
12	TČ 05	2 261 000				
13	TČ 06	2 663 000	2 715 000	191 000	7,0	32,07
14	TČ 06	2 927 000				
15	TČ 06	2 556 000				

Vzorek TČ 05 byl dvakrát zředěn:  $c = 29,585 \cdot 2 = 59,17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

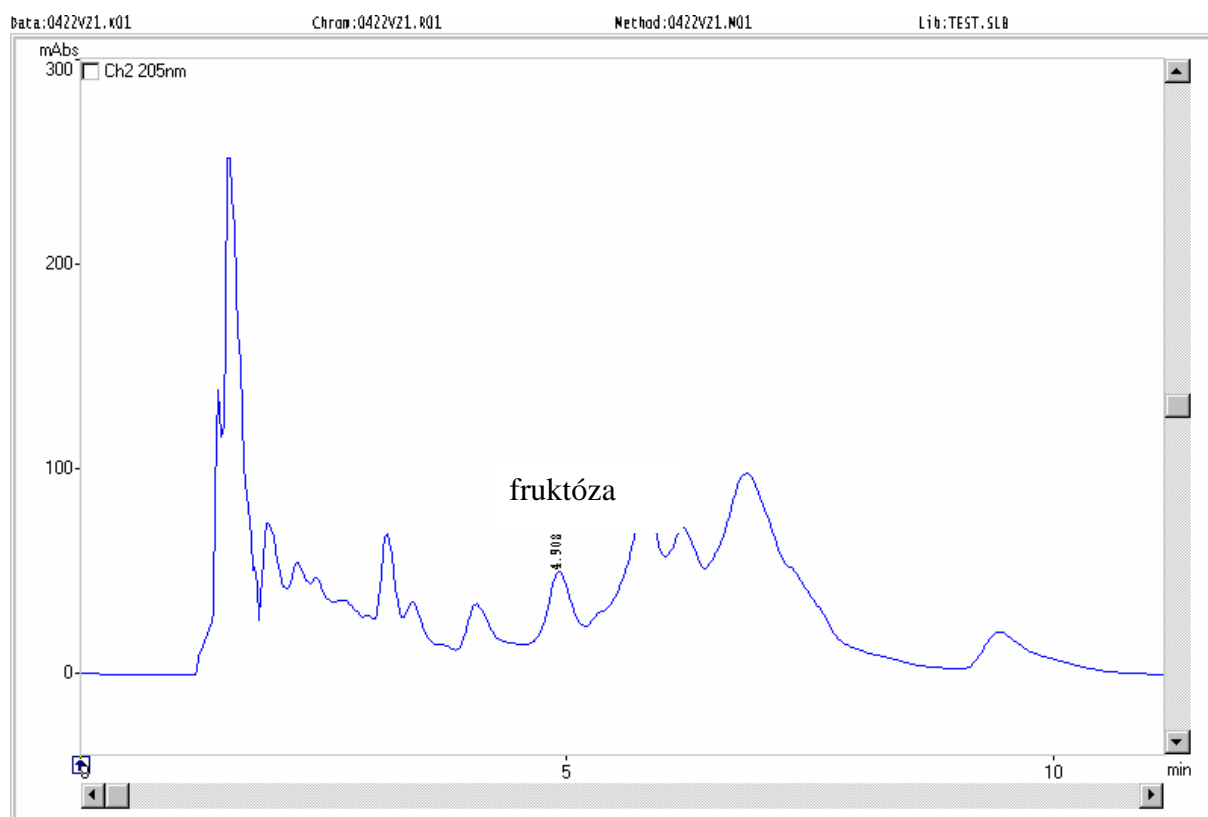
Vzorek TČ 06 byl dvakrát zředěn:  $c = 32,073 \cdot 2 = 64,15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

### B.) Červená vína

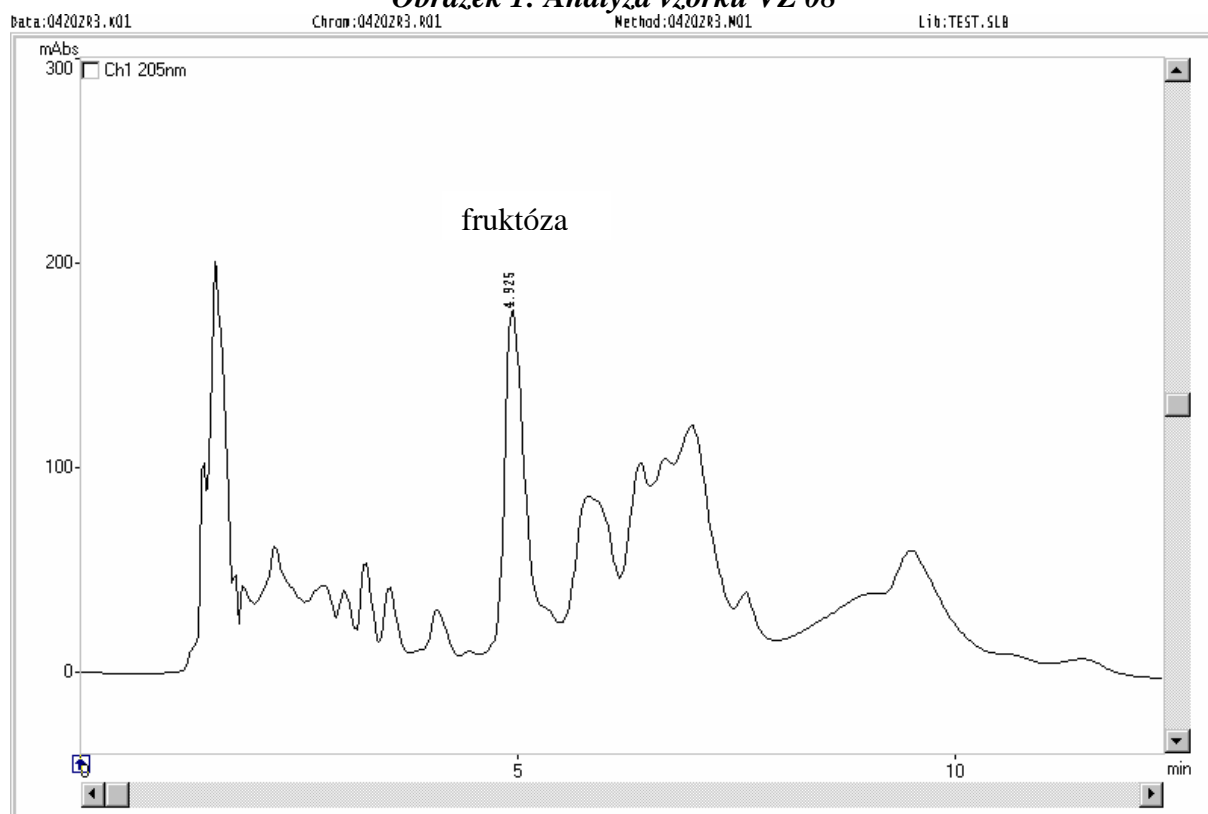
číslo měření	vzorek	plocha píku s přídavkem 40 g·l <sup>-1</sup> fruktózy (mAbs·min)	průměrná plocha píku (mAbs·min)	průměrná plocha píku standardu fruktózy 40 g·l <sup>-1</sup> (mAbs·min)	rozdíl (uAbs/min)	odchylka s	RSD (%)	c (g·l <sup>-1</sup> )
16	FR 07	5 588 000	5 730 000	3 250 000	2 481 000	149 000	0,3	29,46
17	FR 07	5 718 000						
18	FR 07	5 885 000						
19	BL 07	6 255 000	6 291 000	3 250 000	3 041 000	85 000	1,3	35,69
20	BL 07	6 230 000						
21	BL 07	6 387 000						
22	FRK 07	6 720 000	6 608 000	3 250 000	3 358 000	107 000	1,6	39,22
23	FRK 07	6 596 000						
24	FRK 07	6 507 000						

### 9.2.3. Příloha 4: Průběh analýzy jednotlivých vzorků vín

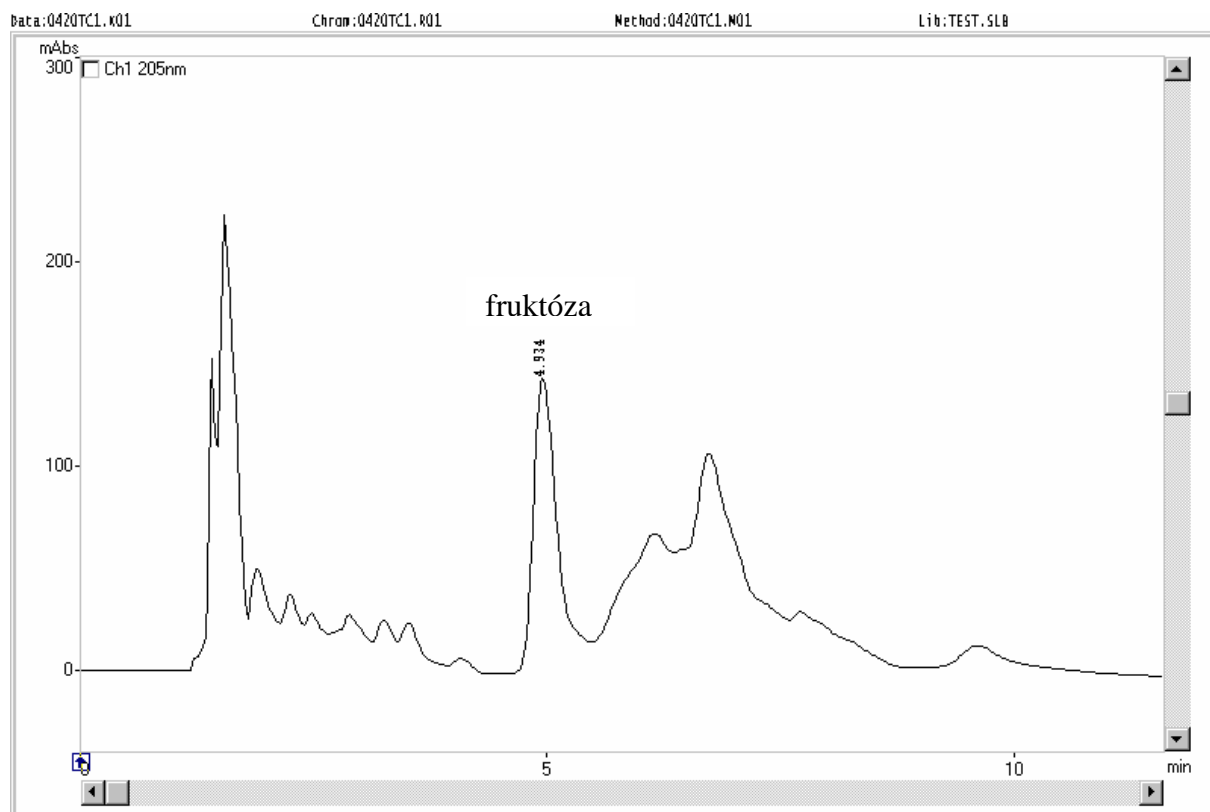
#### A.) Bílá a růžová vína



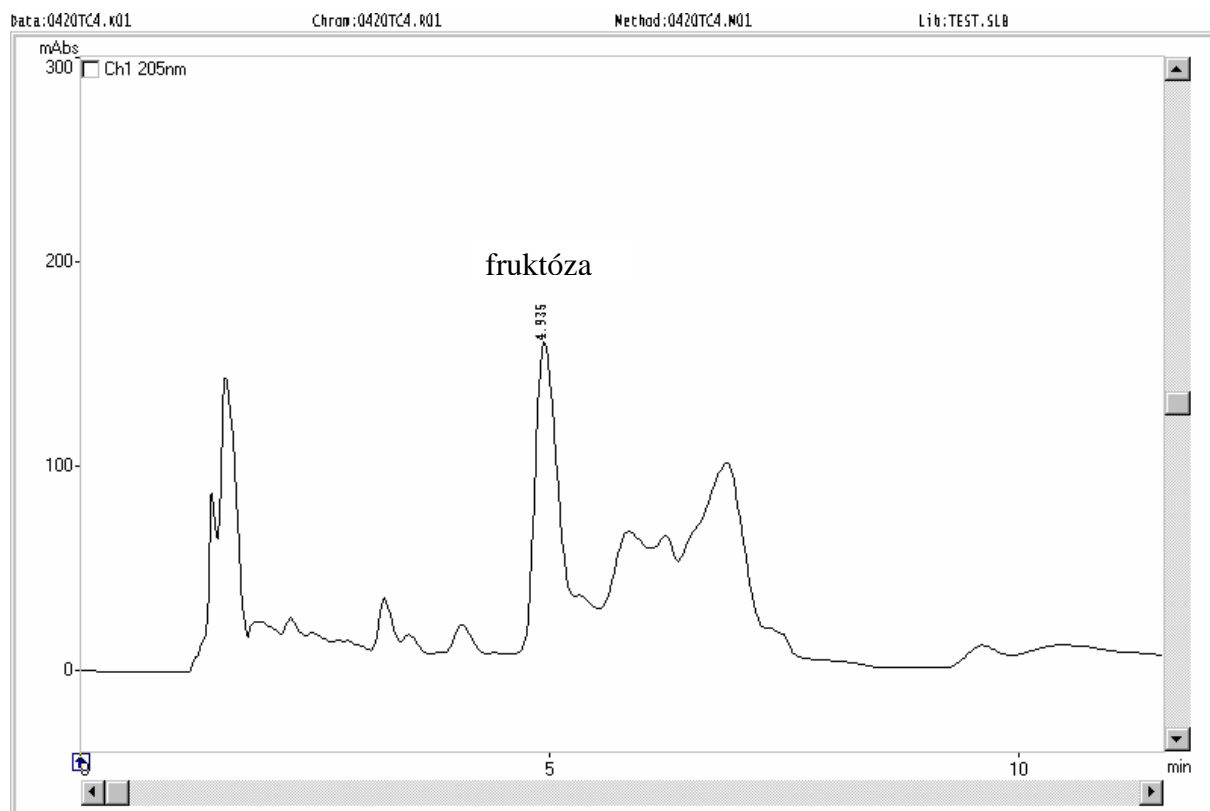
**Obrázek 1: Analýza vzorku VZ 08**



**Obrázek 2: Analýza vzorku ZWR**

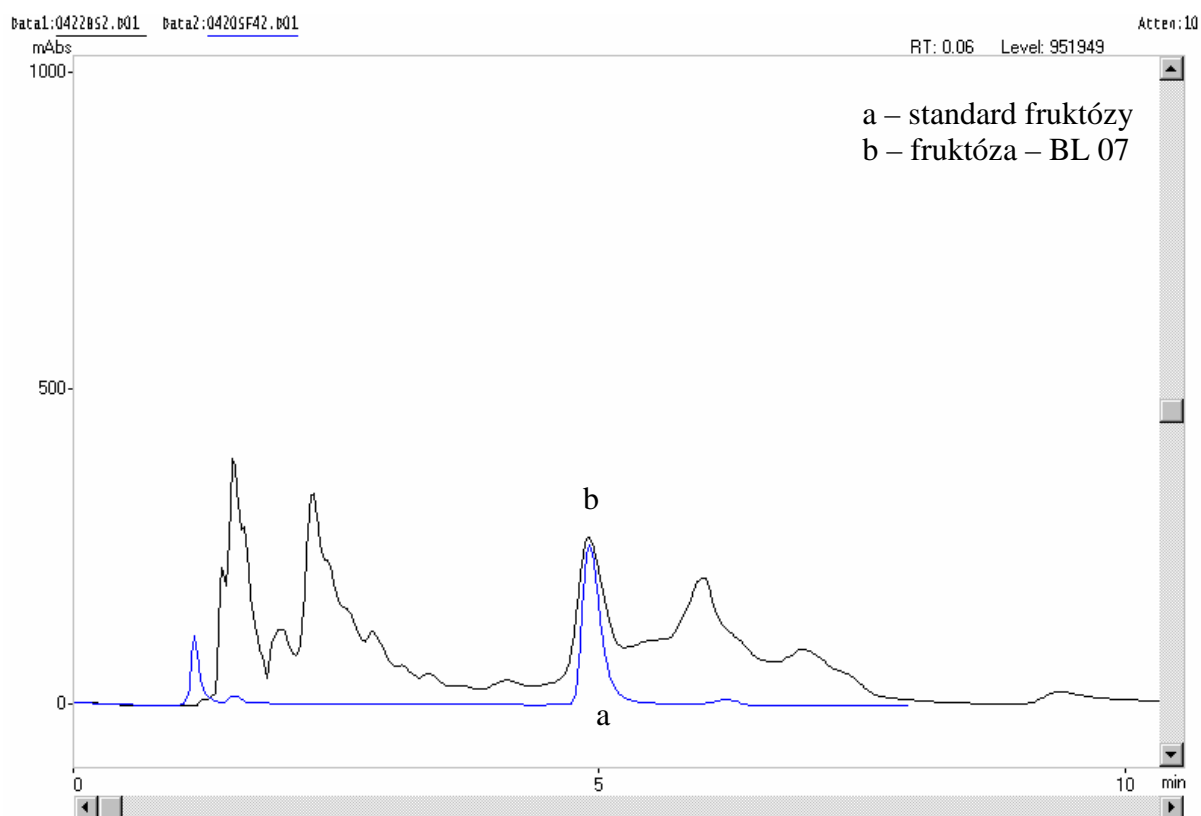


**Obrázek 3: Analýza vzorku TČ 05**

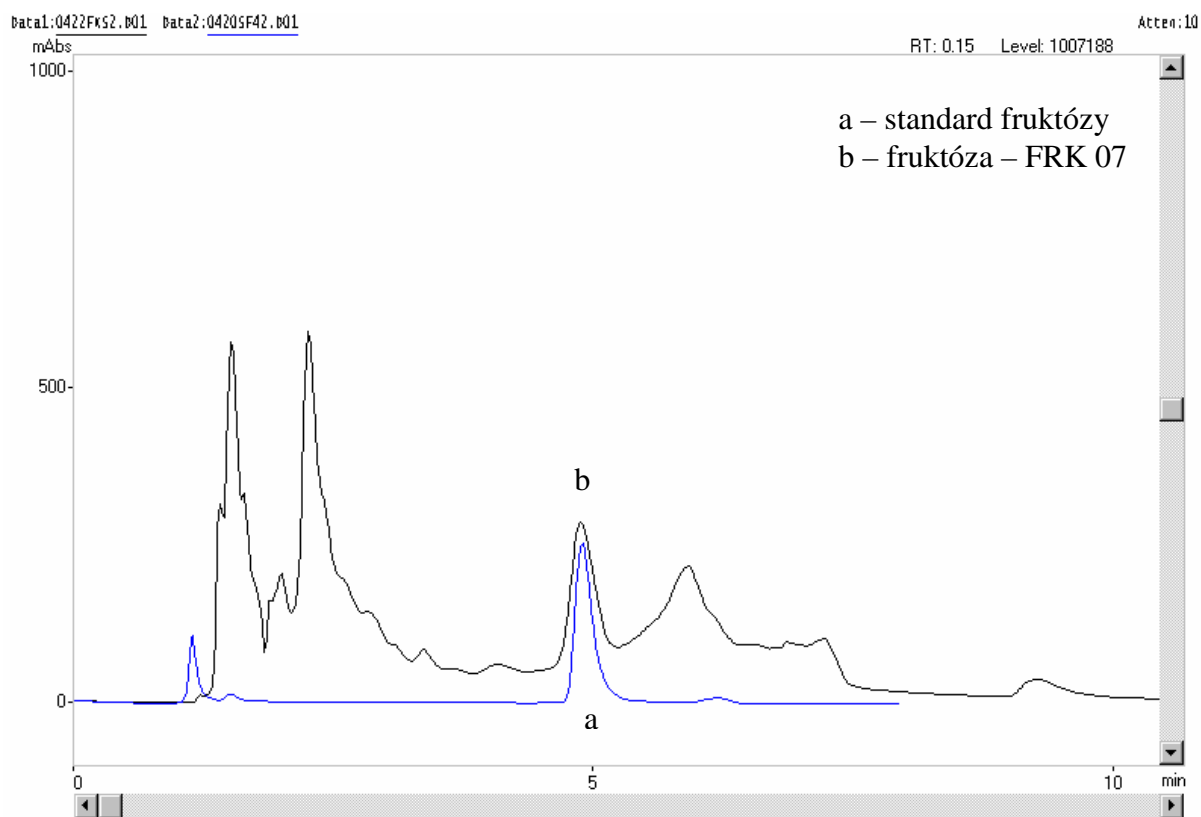


**Obrázek 4: Analýza vzorku TČ 06**

## B.) Červená vína



**Obrázek 5: Analýza vzorku BL 07 se standardní přidávkou fruktózy**



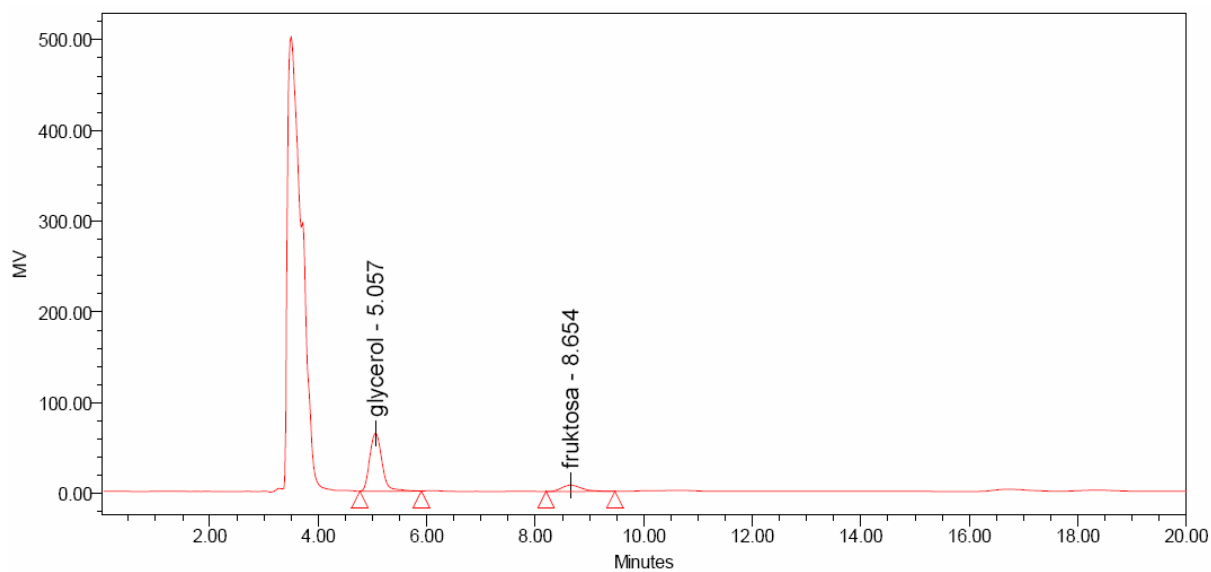
**Obrázek 6: Analýza vzorku FRK 07 se standardním přidávkou fruktózy**

### 9.3. Naměřené údaje pro HPLC s RI detekcí

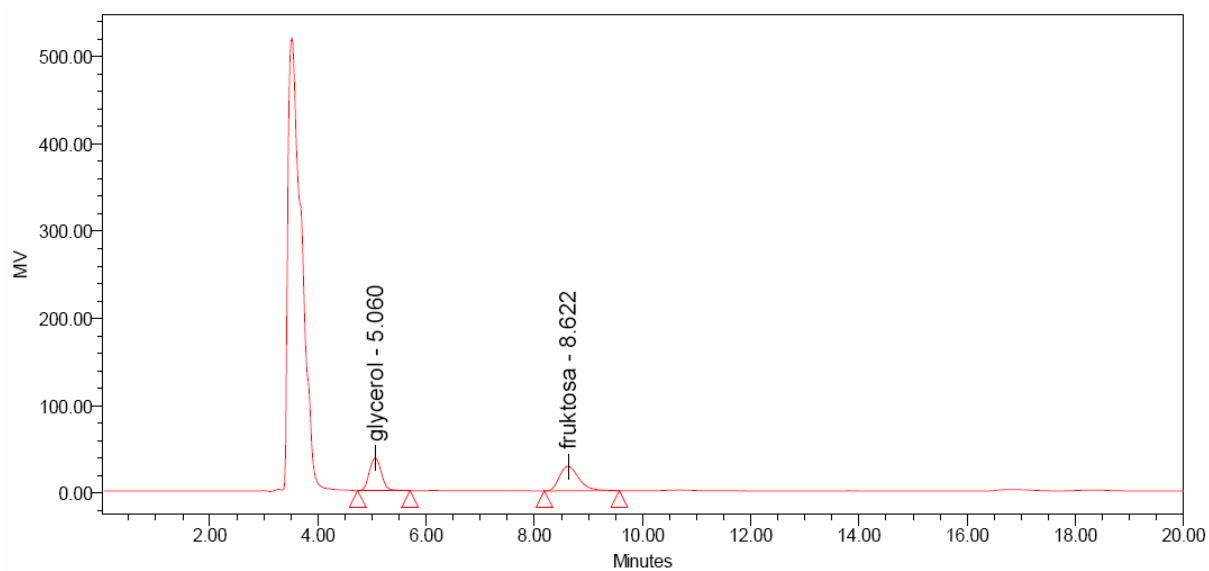
#### 9.3.1. Příloha 5: Naměřené hodnoty glu, fru, sach pro jednotlivé vzorky vín

vzorek	ředění	plocha píku (nRIU·min)			c (g·l <sup>-1</sup> )			celkem c (g·l <sup>-1</sup> )	odchylka s	RSD (%)
		glukóza	fruktóza	sacharóza	glukóza	fruktóza	sacharóza			
VČ 08	1	-	206 000	-	-	1,69	-	1,67	0,03	1,7
VČ 08	1	-	202 000	-	-	1,65	-			
BL 07	1	-	38 000	-	-	0,32	-	0,32	0,01	3,1
BL 07	1	-	37 000	-	-	0,31	-			
FR 07	1	-	174 000	-	-	1,43	-	1,43	0,01	0,7
FR 07	1	-	174 000	-	-	1,42	-			
FRK 07	2	-	62 000	-	-	1,03	-	1,01	0,03	2,8
FRK 07	2	-	60 000	-	-	0,99	-			
VZ 08	1	-	696 000	-	-	5,67	-	5,73	0,08	1,4
VZ 08	1	-	709 000	-	-	5,78	-			
ZWR 08	2	186 000	1 928 000	71 000	6,87	31,38	0,70	38,94	0,01	0,0
ZWR 08	2	182 000	1 940 000	66 000	6,74	31,56	0,63			
TČ 06	5	210 000	1 525 000	-	19,22	62,04	-	81,34	0,11	0,1
TČ 06	5	212 000	1 525 000	-	19,35	62,06	-			
TČ 05	5	187 000	1 354 000	-	17,21	55,11	-	72,06	0,37	0,5
TČ 05	5	179 000	1 356 000	-	16,62	55,18	-			

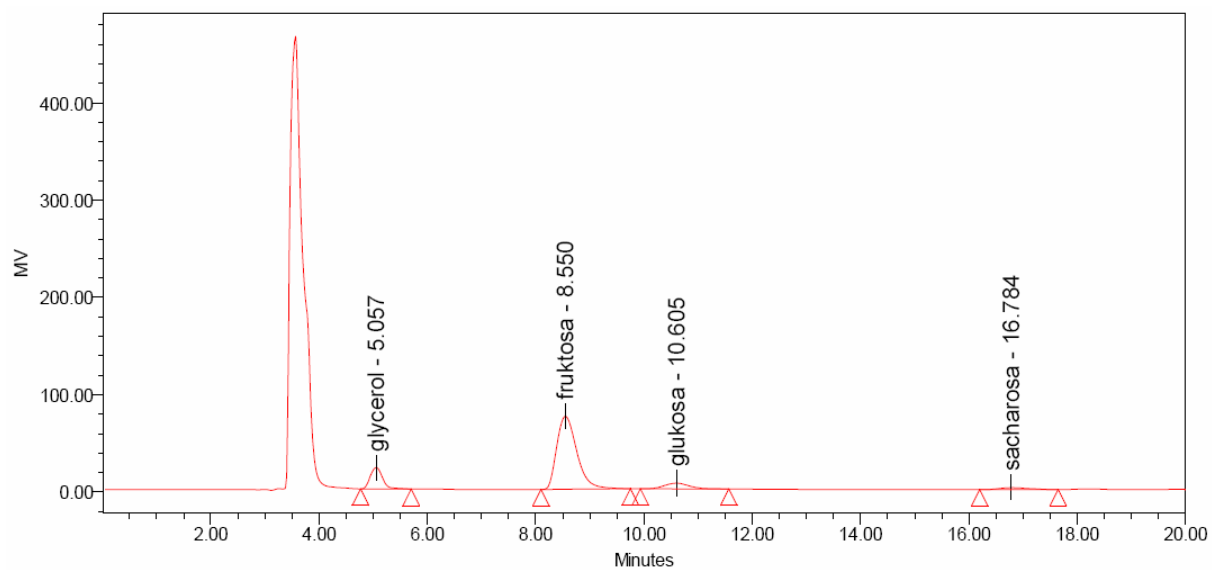
### 9.3.2. Příloha 6: Průběh analýzy jednotlivých vzorků vín



*Obrázek 7: Analýza vzorku FR 07*



*Obrázek 8: Analýza vzorku VZ 08*



**Obrázek 9: Analýza vzorku ZWR 08**