

Obsah povolených konzervačních látek v tuzemských vínech

Ing. JANA KRAUSOVÁ, Ing. ZDENA SVOBODOVÁ, Česká zemědělská a potravinářská inspekce, Praha
Ing. BOHUMIL ŠPINAR, CSc., Ing. VLADIMÍR KELLNER, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Klíčová slova: Oxid uhličitý, kyselina sorbová, průtoková injekční analýza (FIA), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), víno bílé, víno červené

1. ÚVOD

Jako konzervační látky ve vínu povoluje Směrnice o cizorodých látkách a poživatínách č. 50 [1] používání oxidu siřičitého a kyseliny sorbové. Limit maximálního obsahu je 200 mg/l

Hodnocení kvality vína z hlediska této Směrnice proto zůstává velmi problematické, vzhledem k vysokým obsahům oxidu siřičitého i kyseliny sorbové a je nutno obsahy oxidu siřičitého i kyseliny sorbové ve vínech sledovat. Ve víně se mohou vyskytovat i siřičitany přirozeného původu, vznikající mikrobiální redukcí endogenních síranů [2].

Siřičitany jako konzervační činidla byly dlouho pokládány v dávkách, ve kterých se aplikují, za neškodné lidskému zdraví, avšak lidé citliví na siřičitany mohou mít zdravotní problémy i při malých množstvích. Předpokládá se, že asi 5 - 10 % populace astmatiků vykazuje zvýšenou citlivost na siřičitany, což vede k různým poruchám. Alergická citlivost se přisuzuje hlavně volným siřičitanovým aniontům [3].

Používání oxidu siřičitého jako stabilizátoru vína má ve vinařství dlouhou tradici. Oxid siřičitý chrání víno od destruktivního působení peroxidu, který vzniká oxidací kyseliny askorbové kyslíkem. Zvýšená oxidace je provázána vznikem vedlejších chuťových zplodin působením bakterií a kvasinek [4]. Ve vínech se značná část siřičitanů slučuje s aldehydy za vzniku hydroxysulfonátové adiční sloučeniny a jen malá část je přítomna ve formě volných siřičitanových aniontů [5]. Podíl různých forem závisí na přítomnosti ostatních složek, podmínkách skladování, způsobu zpracování, teplotě a pH.

Kyselina sorbová má vedle konzervačních účinků vliv na jablečno-mléčné kvašení, kdy se za určitých podmínek mění na kyselinu hexanovou či hexanoat, dodávající vínu nežádoucí pachuč, běžnými prostředky neodstranitelnou [6].

Při vyhodnocování kvality vína podle Směrnice č. 50 jsou pro stanovení obsahu oxidu siřičitého a kyseliny sorbové u nás platné metody podle ČSN [7, 8]. Pro stanovení celkového obsahu oxidu siřičitého je předepsána titrační metoda jódometrická, která má však některé nedostatky, především malou citlivost, výskyt interferencí a značnou pracovní náročnost, což vylučuje její použitelnost k rutinním analýzám. Tato metoda je Office international du Vin (OIV)⁺ označena jako rychlá, zkušební metoda [9]. Relativně citlivá, avšak dlouhou destilací únavná a časově náročná je i metoda Moniera-Williamse [10], kterou Food and Drug Administration v USA (FDA)⁺⁺ používá jako referenční.

Uvedené nedostatky nemají plně automatizované metody založené na principu průtokové injekční analýzy. Je to metoda p-rosanilinová [11] a metoda s malachitovou zelení [12]. Obě tyto metody byly navrženy Association of Official Analytical Chemists (AOAC)⁺⁺⁺, jako pokusné rozhodčí metody. Mají ve srovnání s metodou podle Moniera-Williamse nižší mez stanovitelnosti a lepší reprodukovatelnost [13].

Metoda FIA je založena na vstříkování definovaného objemu vzorku bez vzdušné segmentace do proudu nosiče, který se

spojuje s proudem reagenčního činidla. Detekce je spektrofotometrická. Doba setrvání v systému je konstantní. Stupeň disperze je možno řídit změnou celé řady faktorů, jako je objem vzorku, délka a průměr průtokových hadic a mísících spirál a rychlost průtoku. Při stanovení celkového oxidu siřičitého se uvolnění provádí automaticky in-line, což přispívá ke zlepšení přesnosti a správnosti stanovení [14].

V současné době je pro stanovení kyseliny sorbové ve vínech s úspěchem používána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s využitím normálních i reverzních fází. Tato metoda umožňuje velmi rychlé stanovení s nenáročnou předúpravou vzorku s mezí stanovitelnosti nad 0,1 mg/l [15].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

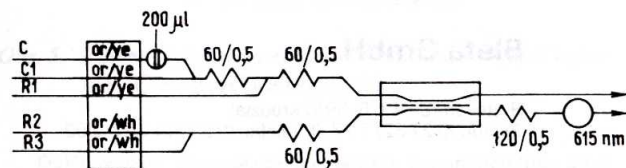
2.1 Materiál

Konzervační činidla, tj. obsah celkového oxidu siřičitého a obsah kyseliny sorbové, byla sledována v roce 1989 u přírodních vín z tuzemské produkce.

Sledovaný soubor obsahoval 108 vzorků vín, z toho 48 vzorků červených a 60 bílých. Každý analyzovaný vzorek představoval láhev původního nepoškozeného balení. Stanovení celkového oxidu siřičitého i kyseliny sorbové časově na sebe bezprostředně navazovalo.

2.2 Metody

Ke stanovení kyseliny sorbové byla použita metoda HPLC na reverzních fázích. K analýzám byl použit kapalinový chromatograf HEWLETT-PACKARD HP 1090 s fotodiodovým detektorem DAD. Chromatografické dělení probíhalo na kovové



Obr. 1 Pracovní sestavení pro stanovení celkového oxidu siřičitého metodou FIA na přístroji FIA-star 5010

- C = destilovaná voda
- C₁ = roztok hydroxidu sodného
- R₁ = roztok kyseliny sírové
- R₂ = roztok malachitové zeleně
- R₃ = roztok dihydrogenfosforečnanu sodného, pH = 8 or (oranžová), ye (žlutá), w (bílá) znamená barevné označení hadiček odlišných svým průměrem a tím i průtokem čerpaných roztoků

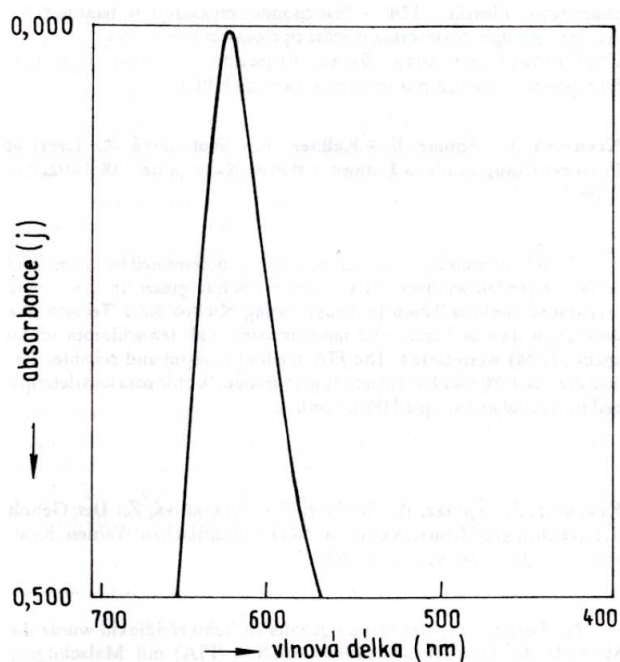
+ Mezinárodní úřad pro víno

++ Úřad řízení jakosti potravin a léčiv (USA)

+++ Svaz autorizovaných analytických chemiků

koloně 100 x 2,1mm s náplní Hypersil ODS, 5 µm. Jako mobilní fáze sloužila směs KH₂PO₄ (c = 0,01 mol/l) o pH = 2,5 s acetonitrilem v poměru 70 : 30, průtok 0,3 ml/min [15].

Ke stanovení celkového obsahu oxidu siřičitého jsme zvolili metodu FIA s malachitovou zelení. K analýzám byl použit nový typ přístroje FIA-star 5010 Tecator se spektrofotometrickou detekcí [16] - viz obr.1. V systému FIA roztok vzorku nejprve reaguje se silnou zásadou - vodný roztok hydroxidu sodného (c = 1 mol/l), aby došlo k uvolnění siřičitanů vázaných na aldehydy. Pak je proud vzorku okyselen roztokem kyseliny sírové (c = 1 mol/l), k uvolnění plynného oxidu siřičitého. Vzniklý oxid siřičitý difunduje přes teflonovou plynopropustnou membránu do proudu roztoku malachitové zeleně spojeného s roztokem fosfátového pufru (NaH₂PO₄, c = 0,3 mol/l), o pH = 8. Oxid siřičitý odbarvuje malachitovou zeleně a pokles absorbance se měří spektrofotometricky při vlnové délce 615 nm (obr.2). Jako doplněk k detekci adiční sloučeniny oxidu siřičitého dochází ke změně absorpčního spektra malachitové zeleně. Citlivost měření při obou vlnových délkách je stejná [17].



Obr. 2 Scan-závislost absorbance na vlnové délce
vlnová délka $\lambda = 615$ nm, gain = -1,0 (faktor zvětšení),
max. absorbance 0,5; min. absorbance 0,0; reakční čas 90 s

U bílých vín byl vzorek přímo aplikován do přístroje, u červených vín vzhledem k mnoha interferencím bylo nutno vzorek destilovat.

V rámci přípravy vzorku jsme ověřili použití destilační jednotky Kjeltec 102 Tecator [18]. Při této automatické metodě se k 100 ml vzorku přidá 20 ml kyseliny fosforečné (c = 0,6 mol/l) a destiluje se v přístroji 3 minuty. Při nízkém pH se uvolní oxid siřičitý, jímá se v peroxidu vodíku (35 %) a vznikající kyselina sírová se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (c = 0,05 mol/l) na bromfenolovou modř. Tento postup v podstatě představuje modifikaci metody OIV [19].

Srovnatelné výsledky jsme získali při jímání destilací uvolněného oxidu siřičitého do alkalického roztoku, který byl analyzován přímým nástřikem do přístroje, za podmínek jako u bílých vín. Dále jsme ověřili doporučený standardní postup AOAC

s "tetrachlormercurátovým činidlem" (TCM), používaný pro pevné potraviny [20]. Při přípravě TCM činidla se rozpustí 2,3 g chloridu sodného, 5,45 g chloridu rtuťnatého a 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 1 000 ml destilované vody a objem se doplní na 2 000 ml [21]. Velmi dobré výtěžnosti (90 - 98 %) jsme dosahovali extrakcí při pH = 4,5 a při ředění 2 ml vína s 58 ml roztoku TCM.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Optimalizace podmínek stanovení FIA, tj. určení průtoku, faktoru zvětšení, rozsahu a reakčního času bylo provedeno se standardním roztokem siřičitanu sodného (c = 200 mg/l). Pro zjištění přesnosti měření bylo provedeno 20 analýz standardního roztoku. Směrodatná odchylka průměru $S_{\bar{x}} = 0,2$, směrodatná odchylka jednotlivých měření $S_x = 0,9$. Variační koeficient $v = 0,6$ %, výtěžnost je 90 %, detekční limit je 3 mg/l.

Korelace metody FIA s malachitovou zelení s metodou podle Moniera-Williamse [22] byla potvrzena u souboru vzorků vína (n = 15). Koeficient korelace se blíží jedné (r = 0,9656). Náhodná chyba v laboratoři vyjádřená jako směrodatná odchylka pro definované n za podmínek opakovatelnosti $S_y = 4$. Výběrová směrodatná odchylka mezi hodnotami metodou FIA a metodou podle Moniera-Williamse $S_d = 12$.

Protože obě proměnné, tj. výsledky obou srovnávaných metod, jsou zatíženy chybami, byl referenční rozdíl mezi oběma metodami vypočítán z koeficientů regrese a lineární závislost obou proměnných je vyjádřena ortogonální regresní přímkou. Předpokladem je 95 % konfidenční pravděpodobnost, tj. 95 % bodů korelačního diagramu je zahrnuto do elipsy, jejíž osou je ortogonální regresní přímka [23]. Rovnice regresní přímky je $y = 0,9758x + 12$ ($y = b_1x + b_0$). Směrnice přímky charakterizující pootočení od ideální přímky $\tan \gamma = 0,9758$ je výrazem proporcionální chyby. Výrazem systematické chyby je koeficient $b_0 = 12$. Protože hodnota proporcionální chyby je zanedbatelná, je referenční rozdíl mezi oběma metodami 12 mg/l oxidu siřičitého v oboru reálných koncentrací.

Zvolené metody stanovení celkového oxidu siřičitého a kyseliny sorbové patří v současné době k progresivním moderním metodám, využívajícím špičkovou přístrojovou techniku.

Tab. 1. Přehled obsahu celkového oxidu siřičitého ve vínech

Vino	Počet vzorků celkem	Počet vzorků s obsahem celkového SO ₂			
		do 100 mg/l	100-150 mg/l	150-200 mg/l	nad 200 mg/l
bílé	60	5	34	21	0
červené	48	22	25	1	0

Tab. 2. Přehled obsahu kyseliny sorbové ve vínech

Vino	Počet vzorků celkem	Počet vzorků s obsahem kyseliny sorbové			
		do 100 mg/l	100-150 mg/l	150-200 mg/l	nad 200 mg/l
bílé	60	5	22	30	3
červené	48	1	22	23	2

Tab. 3. Přehled obsahu konzervačních látek ve vínech

Víno	Počet vzorků celkem	Podíl (%) vzorků s obsahem konzervačních látek			
		do 200 mg/l	200-250 mg/l	250-300 mg/l	nad 300 mg/l
bílé	60	5	12	46	37
červené	48	19	21	52	8

Tím, že vycházíme z těchto metod dokládaných přesnými výsledky stanovení celkového oxidu siřičitého i kyseliny sorbové, snažíme se upozornit především na způsob současného vyhodnocení kvality vína.

Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1, 2, 3. Při součtu obou konzervačních činidel nevyhovuje požadavkům Hygienických předpisů 95 % bílých vín a 81 % červených vín.

Literatura

- [1] Hygienické předpisy MZ ČSR, Směrnice č. 50, Avicenum 1978
- [2] ABERG, L., PERSON, J.: Focus, 11, 1, 1988, s. 8
- [3] HEINMANN, M., WISSER, K.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 142, 1970, s. 102
- [4] OVOH, C.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 1986, s. 5
- [5] BOLIN, H., STEELE, R.: J. Food Sci., 50, 1985, S. 1649
- [6] FARKAŠ, J.: Technologie a biochemie vína, 1. vydání SNTL, Praha 1980, s. 770
- [7] ČSN 56 0216, část 7
- [8] ČSN 56 0216, část 10
- [9] RIPPER, M.: J. Prakt. Chem., 46, 1982, s. 428
- [10] COKER, L.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 1986, s. 8
- [11] KRAUSOVÁ, J., JEDLIČKOVÁ, J.: Prům. potravin, 41, 1990, s. 40
- [12] Aplikční listy Tecator ASTN 48 - 88, Tecator, Höganäs, Sweden, 1988
- [13] SULLIVAN, J., HOLLINGWORTH, T.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 1986, s. 542
- [14] TYSON, J., FRESENIUS, Z.: Anal. Chem., 329, 1988, s. 675
- [15] ŠPINAR, B., KELLNER, V., ČULÍK, J.: Kvas. prům., 36, 1990, s. 99
- [16] KRAUSOVÁ, J., JEDLIČKOVÁ, J.: Kvas. prům., 36, 1990, s. 147
- [17] IMAIZUMI, N.: Chem. Pharm. Bull., 29, 1981, s. 3755
- [18] Aplikční listy Tecator AN 90 - 87, Tecator, Höganäs, Sweden, 1987
- [19] Official Methods of Analysis of the AOAC, 9. vydání, Arlington, Virginia, USA, 1984, s. 391
- [21] Aplikční listy Tecator AN 61 - 21, Tecator, Höganäs, Sweden, 1983
- [22] WEDZICHA, B.: Chemistry of Sulphur Dioxide in Foods. Elsevier Applied Science, Essex, England 1984
- [23] ČSN 01 0252

Lektoroval doc. Ing. J. Čepička, CSc.

Krausová, J. - Špinar, B. - Kellner, V. - Svobodová, Z.: Obsah povolených konzervačních látek v tuzemských vínech. Kvas. prům., 38, 1992, č. 4, s. 106 - 108

Ke stanovení celkového obsahu oxidu siřičitého byla použita metoda průtokové injekční analýzy (FIA) s malachitovou zelení. Při přípravě vzorku byl ověřen jednak destilační postup s jednotkou Kjeltec 1002 Tecator (destilace trvá 3 minuty), jednak extrakce s tetrachlormerkurovým činidlem (TCM). Metoda FIA je rychlá a spolehlivá, analýza bez přípravy vzorku trvá 90 s.

Kyselina sorbová byla stanovena rychlou a jednoduchou metodou HPLC.

Краусова, Я. - Шпинар, Б. - Келлер, В. - Свободова, З.: Содержание разрешенных консервирующих веществ в отечественных винах. Квас. прум., 38, 1992, N° 4, стр. 106 - 108

V целях определения суммарного содержания двуокиси серы применен метод проточного анализа (FIA) с малахитовой зеленью. При получении пробы исследовался ход дистилляции с установкой Kjeltec 1002 Tecator (дистилляция продолжается 3 минуты) и далее экстрагирование с тетрачлормеркуратным реактивом. Метод FIA - быстродействующий и надежный, анализ без приготовления пробы продолжается 90 сек.

Сорбиновая кислота была определена при помощи быстродействующего и простого метода HPL C.

Krausová, J. - Špinar, B. - Kellner, V. - Svobodová, Z.: Level of Preserve Compounds in Domestic Wines. Kvas. prům., 38, 1992, No. 4, pp. 106 - 108

The whole content of sulphur dioxide was determined by the method of flow injection analysis (FIA) using malachite green. In the sample preparation the distillation procedure using Kjeltec 1002 Tecator (the distillation time is 3 min) and the extraction with tetrachloromercuric agent (TCM) were tested. The FIA method is rapid and reliable. The analysis lasts 90 s without a sample preparation. Sorbic acid was determined by a rapid and simple HPLC method.

Krausová, J. - Špinar, B. - Kellner, V. - Svobodová, Z.: Der Gehalt der genehmigten Konservationsmittel in inländischen Weinen. Kvas. prům., 38, 1992, Nr. 4, S. 106 - 108

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Schwefeldioxid wurde die Methode der Durchfluß-Injektions-Analyse (FIA) mit Malachitgrün appliziert. Bei der Zubereitung der Probe wurde das Destillationsverfahren mit der Einheit Kjeltec 1002 Tecator erprobt (die Destillation dauert 3 Minuten) sowie auch die Extraktion mit dem Tetrachlormerkurat-Reagens (TCM). Die Methode FIA ist schnell und verlässlich, die Analyse ohne Probezubereitung dauert 90 s.

Die Sorbinsäure wurde mittels der schnellen und einfachen HPLC-Methode bestimmt.