

Využití HPLC na intoměničích při sledování základních obsahových složek vína

663.2

Ing. STANISLAV ONDROUŠEK, CSc., Konzervárny a lihovary, státní podnik vědeckotechnických a obchodních služeb, Praha, JINDRA PAPEŽOVÁ, katedra kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT, Praha

Klíčová slova: *HPLC, organické kyseliny, víno, iontoměniče, diethylenglykol, analýza*

ÚVOD

Nejvýznamnější sloučeniny, které zásadně ovlivňují organoleptický charakter vína, jsou organické kyseliny, sacharidy, alkoholy, estery a látky polyfenolového typu. Pro analýzu všech těchto látek byla vypracována řada metod stanovení pomocí plynové chromatografie i kapalinové chromatografie. Organické kyseliny vína jsou v současné době často stanovovány přímo na kolonách s reverzními fázemi [1, 2], popř. s iontoměniči [3, 4], z nichž nejpoužívanější jsou Aminex HPX 87 H (Bio-Rad-USA), ORH-801 (Interaction-USA), nebo LC DG-1 (Shodex-Japonsko).

Také ke stanovení sacharidů je často využívána kapalinová chromatografie, a to jak ionexová, tak chromatografie na modifikovaných silikagelech [5, 6]. Plynová chromatografie je v tomto případě méně častá, protože vyžaduje převedení sacharidů na dostatečně těkavé deriváty.

Pro stanovení alkoholů je naopak vhodnější použití plynové chromatografie, i když i zde je možno úspěšně

využít chromatografie na iontoměničích, zvláště pak pro stanovení netěkavých alkoholů jako je glycerol [7].

Podrobnější přehled o možnostech chromatografického stanovení jmenovaných látek ve víně a dalších potravinách podává *Evans* [8].

Protože ionexové kolony jsou u nás pro svoji cenu (přibližně 1000 US\$) obtížně dostupné, využívá se často k chromatografickému stanovení organických kyselin a sacharidů kolon s modifikovanými silikagely při použití poměrně složitých, drahých a často toxicckých směsí organických rozpouštědel. V této práci jsme se pokusili o přípravu kolon s iontoměniči čs. produkce zn. OSTION, které jsou běžně dostupné na našem trhu. Chtěli bychom tak rozšířit možnosti jejich použití ve vysokoučinné kapalinové chromatografii.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro stanovení organických kyselin, sacharidů, ethanolu, methanolu, glycerolu a diethylenglykolu bylo použito zařízení sestavené z přístrojů různých výrobců.

Lineární dávkovač HPP 4001, diferenciální refraktometr RIDK 101, dvouliniový zapisovač TZ 4200 a integrátor CI-100 z Laboratorních přístrojů Praha, UV-detektor 2138 Uvicord z LKB Bromma Švédsko, ultratermostat U1 z VEB ML Lipsko NDR a smyčkový dávkovač vlastní konstrukce. Ocelové kolony rozměrů $25 \times 0,8$ cm z Laboratorních přístrojů Praha byly naplněny na plnicím zařízení vlastní konstrukce a skleněné kolony $62 \times 0,6$ cm byly získány z Mikrotechny Praha.

Jako náplně kolon byly použity iontoměničky OSTION LG KS 0803, OSTION LG KS 0800 a OSTION LG KS 0400 ze Spolku pro chemickou a hutní výrobu Ústí nad Labem. Na úpravu vzorků bylo použito iontoměničku Dowex 1X8 a Dowex 1X4 firmy Bio-Rad (USA) a Amberlite IRA 410 firmy Rohm and Haas (USA).

Vzorky standardů kyselin citrónové, vinné, jablečné, jantarové, mléčné, fumarové a octové p.a. čistoty byly získány z Lachemy Erno. Dále byly použity chemikálie: kyselina sírová a chlorovodíková, chlorid lithný, síran sodný, uhličitan sodný a uhličitan amonný — všechny p.a. čistoty.

K ověření metodiky bylo testováno devět druhů červených a bílých vín československého i zahraničního původu, označených v dalším textu A až I.

ÚPRAVA VZORKŮ

Pro stanovení organických kyselin ve víně s použitím refraktometrické detekce bylo třeba analyzované vzorky upravit tímto způsobem: 200 ml anexu v chloridové formě bylo promyto 500 ml Na_2CO_3 ($c = 2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) do negativní reakce na chloridy, 200 ml $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ($c = 1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a vodou do vymyti přebytku uhličitanu. Na 10 ml takto upraveného iontoměniče, umístěného ve skleněné koloně 20×1 cm s nálevkou, se dávkovalo 5 ml vína a po protečení vzorku byla kolona důkladně promyta 8×5 ml redestilované vody. Eluat byl doplněn do 50 ml a použit ke stanovení sacharidů, ethanolu a glycerolu ve víně. Kyseliny byly z kolony eluovány 15 ml HCl ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), (nutno přidávat opatrně po časích pro nebezpečí tvorby velkého množství CO_2), promyty 15 ml redestilované vody a eluat doplněn do 50 ml. Tímto způsobem byly připraveny vzorky vína ke stanovení organických kyselin a byly dávkovány přímo na kolonu.

Z ověřovaných anexů se jako nevhodnější ukázal Dowex 1X8, poté Amberlite IRA 410 a jako nejméně vhodný Dowex 1X4, vzhledem k pomalému průtoku vzorku. Použití všech tří uvedených anexů je však v zásadě možné.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro nalezení optimálních podmínek dělení směsi organických kyselin obsažených ve víně byly testovány čtyři kolony naplněné silně kyselým katexem v různých iontových formách, při různých teplotách dělení a za použití různých elučních činidel.

Byly ověřovány čtyři iontové formy silně kyselých katexů OSTION LG KS 0803 a to H^+ , Na^+ , Li^+ a Ca^{2+} forma. Připravené iontoměniče byly naplněny do kolon $62 \times 0,6$ cm a byla na nich dělena standardní směs sedmi organických kyselin, tj. kyseliny citrónové, vinné, jablečné, jantarové, mléčné, fumarové a octové.

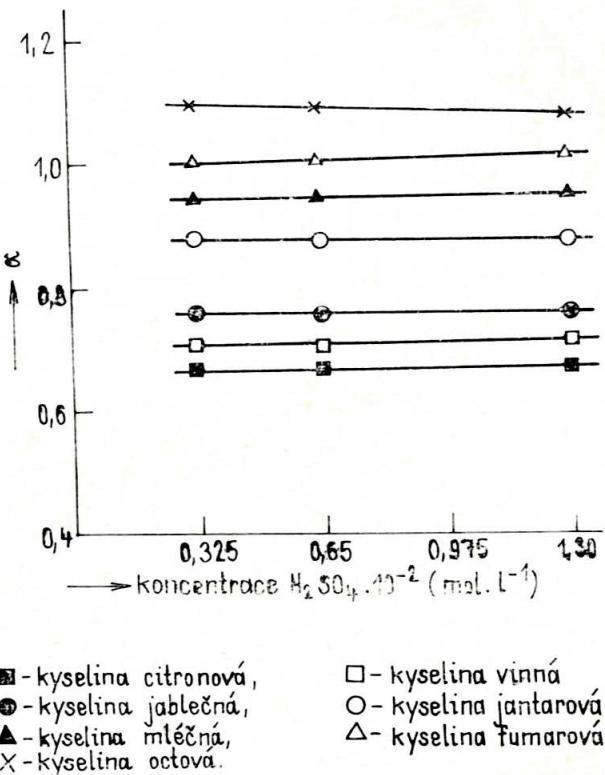
Z ověřovaných iontových forem se nejhůře osvědčila vápenatá forma, při které bylo dělení testovací směsi kyselin zcela nedostatečné. Lepších výsledků bylo dosaženo s kolonou v lithné formě (eluční činidlo LiCl $c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Při 60°C se na této koloně dělily všechny sedm testovaných kyselin, avšak z kvantitativního hlediska bylo rozdelení jednotlivých píků nedostatečné.

Poměrně dobrých výsledků bylo dosaženo na koloně v sodné formě (eluční činidlo H_2SO_4 $c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a Na_2SO_4 $c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), na které se dělily také všechny sledované kyseliny, ale pro dokonalé rozdelení bylo třeba prakticky 40minutové analýzy. Použití kolony s iontem v sodném cyklu však může být vhodné tam, kde je třeba dělit vzorky s vyšším obsahem kyseliny citrónové a vinné.

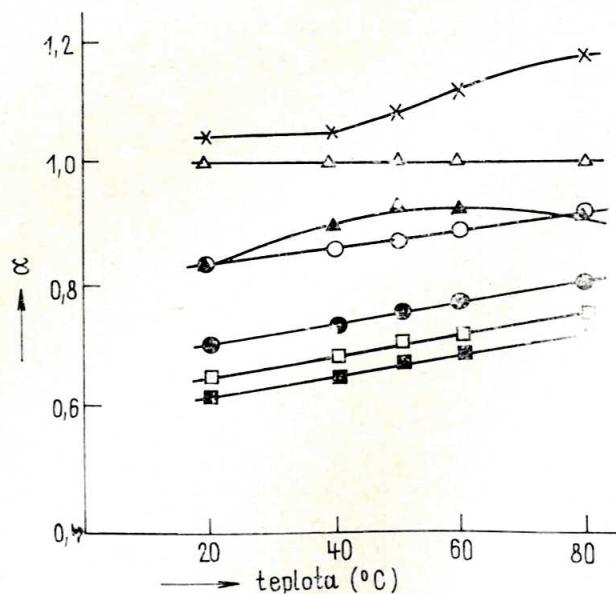
Ve srovnání s kolonou v sodné formě se z provozního hlediska i vzhledem k jednoduchosti přípravy, ukázala

jako vhodnější pro stanovení organických kyselin vodíková forma, která vykazovala obdobné výsledky jako forma sodná, avšak s kratšími retenčními časy.

Aby byly nalezeny optimální podmínky pro vlastní chromatografii, tj. teplota, průtok a složení elučního činidla, byla provedena řada dělení směsi organických kyselin vína na skleněné koloně $62 \times 0,6$ cm naplněné OSTIONEM LG KS 0803 ve vodíkové formě. Ze závislostí zobrazených na obr. 1 a 2 byla určena nevhodnější tep-



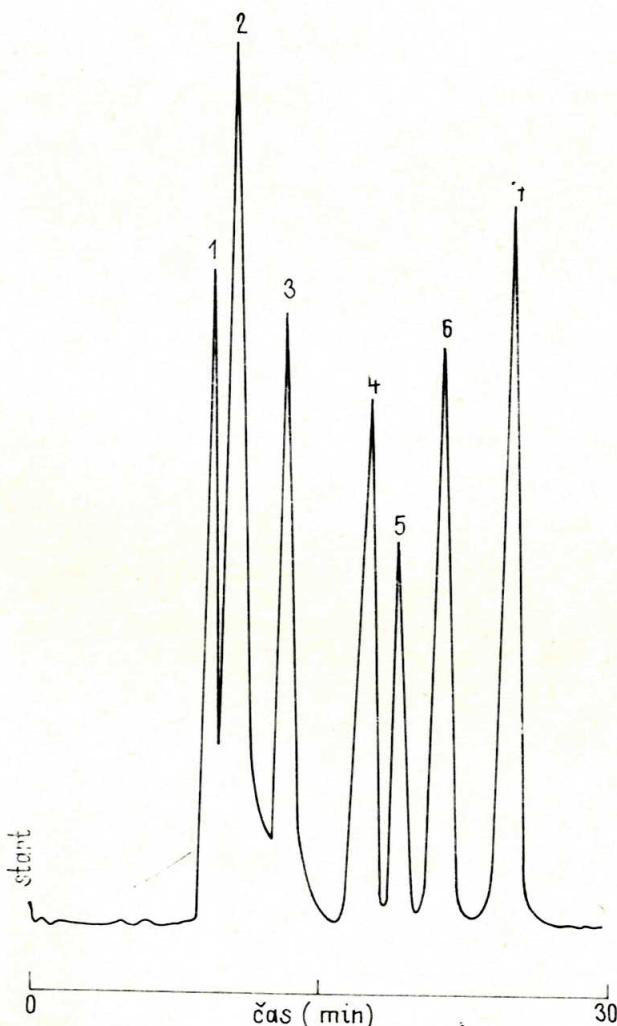
Obr. 1. Relativní retence (α) vzhledem ke kyselině fumarové pro různé koncentrace H_2SO_4



Obr. 2. Relativní retence (α) vzhledem ke kyselině fumarové pro různé teploty analýzy
význam symbolů viz obr. 1

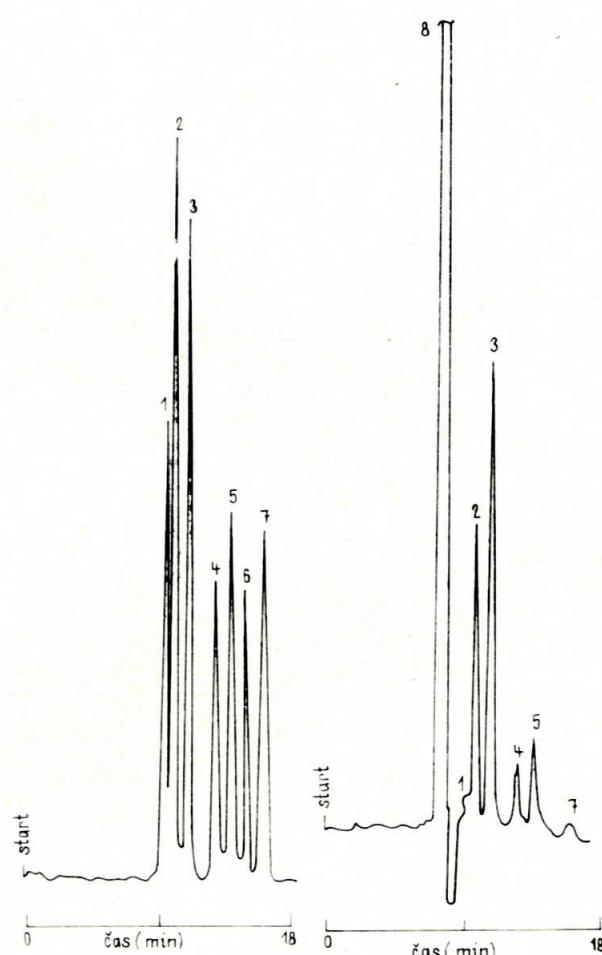
lota dělení 55°C a koncentrace kyseliny sírové $c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Optimální průtok na tomto typu kolony byl $0,75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Protože skleněná kolona $62 \times 0,6 \text{ cm}$ může pracovat do maximálního tlaku $3,0 \text{ MPa}$ a nebylo tedy možno zvyšovat průtok elučního činidla, pohybovala se doba jedné analýzy okolo 30 minut. Výhodou této kolony však je, že ji lze velmi jednoduše naplnit bez použití speciálního plnicího zařízení.

V dalším průběhu práce bylo ověřováno použití iontoměničů OSTION LG KS 0800 a OSTION LG KS 0400 (zrnění $10 \mu\text{m}$) v ocelových kolonách $25 \times 0,8 \text{ cm}$. Kolony byly naplněny oběma materiály do protitlaku $20,0 \text{ MPa}$ a $5,0 \text{ MPa}$ a umístěny do skleněného temperačního pláště. Výsledky získané dělením standardní směsi sedmi organických kyselin byly u obou použitých kolon lepší než v případě skleněné kolony $62 \times 0,6 \text{ cm}$. Také doba analýzy se zkrátila, a to v případě OSTIONU LG KS 0400 na 25 minut a u OSTIONU LG KS 0800 na 20 minut. Nevýhodou iontoměniče OSTION LG KS 0400 je však měkká struktura jeho skeletu (pouze 4% DVB), což má za následek značné zvýšení protitlaku při průtoku větším než $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a nebezpečí poškození náplně kolony. Ukázky chromatogramů směsi standardů organických kyselin jsou znázorněny na obr. 3 a 4. K vlastnímu analytickému stanovení organických kyselin ve víně byla



Obr. 3. Chromatogram standardního roztoku organických kyselin na OSTIONU LG KS 0803 H^+
kolona $62 \times 0,6 \text{ cm}$, eluční činidlo H_2SO_4 ($c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), průtok $0,75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, detekce UV 206 nm (0,01 AUFS)

1 — kyselina citrónová, 2 — kyselina vinná, 3 — kyselina jablečná, 4 — kyselina jantarová, 5 — kyselina mléčná, 6 — kyselina fumarová, 7 — kyselina octová



Obr. 4. Chromatogram standardního roztoku organických kyselin na OSTIONU LG KS 0800 H^+
kolona $25 \times 0,8 \text{ cm}$, eluční činidlo H_2SO_4 ($c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), průtok $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota 55°C , detekce UV 206 nm (0,01 AUFS)
označení píků viz obr. 3

Obr. 5. Chromatogram organických kyselin bílého vína B na OSTIONU LG KS 0800 H^+
kolona $25 \times 0,8 \text{ cm}$, eluční činidlo H_2SO_4 ($c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), průtok $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota 55°C , detekce refraktometrická (R 8X)

označení píků 1 až 7 viz obr. 3, 8 — náběhový pík HCl

tedy použita ocelová kolona $25 \times 0,8 \text{ cm}$, plněná OSTIONEM LG KS 0800 v H^+ formě, jako eluční činidlo kyselina sírová ($c = 0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), průtok $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, teplota 55°C a UV detekce při vlnové délce 206 nm (0,01 AUFS). Vzorky vína byly přefiltrovány a dávkovaný přímo na kolunu a obsahy jednotlivých kyselin byly vypočteny z předem připravených kalibračních rovníc. Vzhledem k vysoké citlivosti UV detekce bylo možno aplikovat velmi malá množství vzorku ($2 \mu\text{l}$), což je výhodné zvláště u materiálů obsahujících velké množství barviv, která postupně znehodnocují délci kolonu. Při těchto analýzách však došlo k interferenci blíže neurčené látky s kyselinou jantarovou, takže se v přepočtu její obsah pohyboval na 5 až 10násobku běžného obsahu. O jakou látku se jednalo, se nám nepodařilo zjistit, mohlo by však jít o některý z biogenních aminů, např. histamin, který vykazuje v oblasti okolo 206 nm absorpční maximum. Proto jsme byli nutni UV detekci nahradit detekcí refraktometrickou.

V tomto případě však došlo při dělení organických kyselin k jejich interferenci se sacharidickými složkami

vína. Kyselina vinná částečně interferovala s glukosou a kyselina jablčná s fruktosou, což prakticky znemožnilo jejich kvantifikaci. Z toho důvodu musely být ze vzorků vína přítomné sacharidy odstraněny, a to pomocí silně bázických anexů.

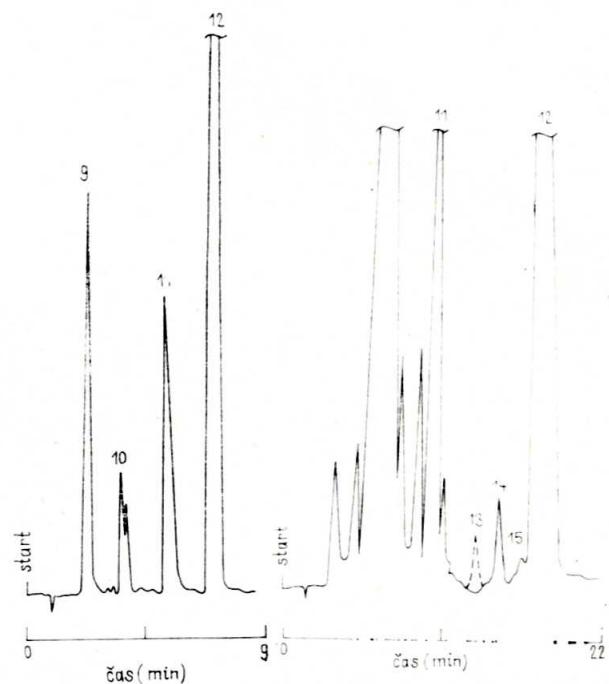
Přestože se v literatuře k odstranění sacharidů z vína doporučuje použití Dowexu 1X8 v OH⁻ formě [4], nepodařilo se nám ani u Dowexu 1X8 ani u jiných vyzkoušených iontoměničů v OH⁻ formě interferující sacharidy odstranit, neboť jsou velmi silně významy a koelují s organickými kyselinami při vymývání kyselinou chlorovodíkovou z preparační kolony. Z tohoto důvodu jsme ověřili možnosti použití jiných iontových forem, a to fosfátové a uhličitanové. V případě anexů ve fosfátové formě se nám podařilo přítomné sacharidy odstranit, avšak vzniklá kyselina fosforečná interferuje s kyselinou vinnou. Jako jediné vhodné řešení se ukázalo použití silně bázického anexu v uhličitanové formě. V tomto případě lze ze vzorků vína odstranit jak přítomné sacharidy, tak barviva červených vín.

Pomocí této úpravy a při použití kolony 25 × 0,8 cm naplněné OSTIONEM LG KS 0800 v H⁺ cyklu byly provedeny analýzy vzorků vína a jejich výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Na obr. 5 je znázorněn chromatogram organických kyselin bílého vína B. Z tabulky je zřejmé, že obsah organických kyselin v různých druzích vín je značně rozdílný a souvisí nejen s odrůdovým charakterem, ale i místem výroby a mikrobiologickým stavem v průběhu kvašení.

Současně se stanovením organických kyselin bylo na stejně koloně, pouze za částečně pozměněných pracovních podmínek, provedeno stanovení sacharidů, ethanolu a glycerolu. Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v tabulce 2 a na obr. 6.

Protože se v posledních letech objevily v některých státech Evropy případy úpravy vína diethylenglykolem a methanolem, pokusili jsme se o možnost stanovit obě tyto látky ve víně pomocí kolony užité ke stanovení organických kyselin. I v tomto případě jsme použili refraktometrické detekce a průběh analýzy, včetně pracovních podmínek, je znázorněn na obr. 7. Zjistili jsme, že touto metodou lze stanovit koncentrace přibližně 10 mg.l⁻¹ diethylenglyku a 20 mg.l⁻¹ methanolu a to přímo bez předchozí úpravy vzorku. Při kontrole nebyl v žádném analyzovaném vínu nalezen diethylenglykol a obsahy methanolu se pohybovaly do 30 mg.l⁻¹.

Celkově lze konstatovat, že předložená metodika chromatografického stanovení organických kyselin vína na zařízení a kolonách čs. výroby je dobré použitelná v našich podmírkách. V porovnání s firemní literaturou [9] se prokázalo, že je možno prakticky nahradit ve světě užívané kolony americké a japonské produkce československými iontoměniči s výrazně nižší cenou. To má z hlediska praktického rozšíření této metody zásadní význam, neboť se jedná o výrazně antiimportní opatření. Nesprávnou výhodou je také to, že na jedné koloně, a za prakticky stejných podmínek, lze stanovit další velmi významné složky vín, tj. sacharidy, ethanol, glycerol,



Obr. 6. Chromatogram sacharidů, ethanolu a glycerolu na OSTIONU LG KS 0800 H⁺ kolona 25 × 0,8 cm, eluční činidlo H₂SO₄ (c = 0,005 mol.l⁻¹), průtok 0,5 ml.min⁻¹, teplota 85 °C, detekce refraktometrická (R 16X)

9 — sacharidy, 10 — neidentifikováno, 11 — glycerol,
12 — ethanol

Obr. 7. Chromatogram bílého vína F bez přídavku a s přídavkem diethylenglyku na OSTIONU LG KS 0800 H⁺ kolona 25 × 0,8 cm, eluční činidlo H₂SO₄ (c = 0,005 mol.l⁻¹), průtok 0,25 ml.min⁻¹, teplota 85 °C, detekce refraktometrická (R 2X)

11 — glycerol, 13 — diethylenglykol, 14 — ethylacetat,
15 — methanol, 12 — ethanol
čárkováný pik 8 — ke vzorku vína byl přidán diethylenglykol (20 mg.l⁻¹)

methanol a diethylenglykol. Touto univerzálností se výhodnost použití iontoměničových kolon ještě zvyšuje, navíc s ohledem na jednoduchost a dostupnost používaného elučního činidla, kterým je ve všech případech vodný roztok kyseliny sírové.

Tato práce byla vypracována v průběhu roku 1988 na Katedře kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT Praha.

Lektoroval Ing. Jiří Uher

Tab. 1. Obsah organických kyselin v červených a bílých vínách čs. a zahraničního původu v g/l

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Kyselina citrónová	0,65	0,64	0,44	0	0	0,74	0,54	0,79	0,60
Kyselina vinná	3,18	2,38	2,42	2,70	2,99	2,41	2,80	3,46	3,02
Kyselina jablčná	3,42	3,75	4,59	2,01	0,50	2,67	0,69	1,19	1,73
Kyselina jantarová	1,01	0,96	0,90	1,21	1,05	0,98	0,68	0,96	0,79
Kyselina mléčná	2,69	1,95	0,55	2,84	3,94	1,64	3,10	0,70	1,60
Kyselina octová	0,62	0,22	0,37	0,27	0,51	0,52	0,43	0,30	0,46
Kyseliny celkem	11,57	9,90	9,27	9,03	8,99	8,96	8,24	7,40	8,20

Pozn.: výsledky jsou průměrem dvou paralelních stanovení

Tab. 2. Obsah sacharidů, ethanolu a glycerolu v červených a bílých vínách čs. a zahraničního původu v g/l

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Sacharidy	9,2	21,4	6,1	7,4	10,1	22,4	21,5	stop	26,2
Ethanol	91,5	83,7	94,8	85,7	97,0	95,2	93,0	111,8	87,5
Glycerol	9,2	10,2	7,8	11,1	7,6	7,5	7,7	16,7	6,9

Pozn.: výsledky jsou průměrem dvou paralelních stanovení

Literatura

- [1] THURMAN, J.: J. Chromatogr., č. 185, 1980, s. 625.
- [2] LEE, D., LORD, A. D.: Instrum. Anal. Foods, 5, 1987, s. 261.
- [3] PREIFFER, P., RADLER, F.: Z. Lebensm.-Untersuchung Forsch., 181, 1985, s. 24.
- [4] FLAK, W., PLUHAR, G.: Mitt. Klosterneuburg, 33, 1983, s. 60.
- [5] PALMER, J. K., BRANDS, W. B.: J. Agric. Food Chem., 22, 1974, s. 709.
- [6] JWONG-CHONG, J., MARTIN, F. A.: J. Agric. Food. Chem., 27, 1979, s. 929.
- [7] ONDROUŠEK, S., BASAROVÁ, G.: Sborník ÚVTIZ-Potravinářské vědy, 4, 1986, s. 91.
- [8] EVANS, M. E.: J. Liq. Cromatogr., 6, 1983, s. 153.
- [9] Bio-Rad Laboratories, The Liquid Chromatographer, Number 2EG, August 1979.

Ondroušek, S. - Papežová, J.: Využití HPLC na ionto-měničích při sledování základních obsahových složek vína. Kvas. prům., 35, 1989, č. 4, s. 99—103.

Článek pojednává o možnostech stanovení organických kyselin, sacharidů, ethanolu, methanolu a diethylen glyku ve víně na kolonách plněných československými iontoměničí značky OSTION. Předložená metodika úpravy vzorku, pomocí anexů v uhličitanové formě, umožňuje použít k detekci jmenovaných látek diferenciální refraktometru. Získané výsledky prokazují srovnatelnost připravených kolon s obdobnými kolonami zahraničního původu. Součástí článku jsou analytické rozborové devíti druhů červených a bílých vín československé i zahraniční produkce.

Ондроушек, С. - Папежова, И.: Использование метода HPLC при исследовании основных составляющих вина. Квас. прум., 35, 1989, № 4, стр. 99—103.

Статья занимается возможностями определения органических кислот, сахаридов, этанола, метанола и диэтиленгликоля в вине на колонках, наполняемых чехословацкими ионнообменниками марки ОСТИОН. Предложенная методика обработки образца при помощи анионов в карбонатной форме позволяет применить для определения названных веществ дифференциальный ре-

фрактометр. Полученные результаты доказывают сравнимость подготовленных колонок с аналогичными колонками зарубежного происхождения. Часть работы приводит аналитический обзор девяти сортов красных и белых вин чехословацкого и зарубежного происхождения.

Ondroušek, S. - Papežová, J.: Application of HPLC with Ion Exchanger in Determination of Basic Components of Wine. Kvas. prům., 35, 1989, No. 4, pp. 99—103.

The determination of organic acids, saccharides, ethanol, methanol and diethylene glycol in wine using columns, filled with Czechoslovak ion exchanger OSTION is described. After a sample treatment with anion exchanger in the form of carbonate the detection of the above mentioned substances can be made with a differential refractometer. The results proved good properties of the Czechoslovak preparate OSTION in comparison with similar foreign preparations. Further, the analytical results of nine sorts of red and white wines from Czechoslovak and foreign production are described in the article.

Ondroušek, S. - Papežová, J.: Die Ausnutzung von HPLC auf den Ionen austauschern bei der Verfolgung der Grundkomponenten des Weines. Kvas. prům., 35, 1989, č. 4, s. 99—103.

Der Artikel behandelt die Möglichkeiten der Bestimmung der organischen Säuren, der Saccharide, des Ethanol, Methanols und Diethylenglykols im Wein auf den Kolonnen, die mit den tschechoslowakischen Ionen-austauschern der Marke OSTION gefüllt sind. Die vorgelegte Methodik der Bearbeitung des Musters, mit Hilfe der Annexe in der Karbonatform, ermöglicht die Anwendung der Differentialrefraktometer zur Detektion der genannten Stoffe. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen die Vergleichbarkeit der vorbereiteten Kolonnen mit analogischen Kolonnen einer ausländischen Herkunft. Einen Bestandteil des Artikels bilden die Analysen von neuen Arten von Rot- und Weisswein der tschechoslowakischen und ausländischen Produktion.