



Instrumentální stanovení 2,3-butandionu ve víně

Bc. Roman Kovář

Diplomová práce
2010

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Roman KOVÁŘ**
Osobní číslo: **T08804**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Instrumentální stanovení 2,3 – butandionu ve víně**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace 2,3 – butandionu.
2. Technologie výroby vína.
3. Instrumentální metody stanovení 2,3 – butandionu.

II. Praktická část

1. Metodika separace a HPLC stanovení 2,3 – butandionu.
2. Stanovení 2,3 – butandionu ve vybraných vzorcích vína.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ČEPIČKA, J. *Obecná potravinářská technologie*, 1.vydání, VŠCHT, 1995.

[2] BARTOWSKY, E. J., HENSCHKE, P. A. The "buttery" attribute of wine – diacetyl – desirability, spoilage and beyond, *International Journal of Food Microbiology*, 96, 2004, 235-252.

[3] LE BARS, D., YVON, M. Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 2008, 171-177.

[4] LI, R., KENYON, G. L. A spectrophotometric determination of alfa-dicarbonyl compounds and its application to the enzymatic formation of alfa-ketobutyrate, *Analytical Biochemistry*, 230, 1995, 37-40.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

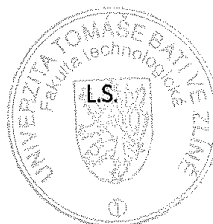
4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu



Příjmení a jméno: Kovář Roman

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve

Zlíně

.....

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.



(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.



ABSTRAKT

Cílem této práce bylo charakterizovat 2,3-butandion, popsat technologii výroby vína a vhodné instrumentální metody stanovení 2,3-butandionu. Ke stanovení obsahu 2,3-butandionu ve vzorcích vína byla použita metoda HPLC-ECD.

Klíčová slova: 2,3-butandion, Technologie výroby vína, Instrumentální metody, HPLC-ECD

ABSTRACT

The aim of this study was characterized 2,3-butandione, described the technology of wine making and appropriate instrumental methods for determination of 2,3-butandione. To determine the content of 2,3-butandione in wine samples was used HPLC-ECD.

Keywords: 2,3-butandione, wine making technology, instrumental methods, HPLC-ECD



Poděkování, motto

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu diplomové práce, panu Ing. Pavlu Hanuštiakovi za odborné vedení, cenné připomínky a rady, které mi poskytoval v průběhu vypracování mé diplomové práce. Poděkování patří také mojí rodině, která mě podporovala po celou dobu studia

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. Odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta



OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KARBONYLOVÉ SLOUČENINY	13
1.1 KETONY	13
1.2 ALDEHYDY	14
2 CHARAKTERIZACE 2,3 BUTANDIONU.....	15
2.1 VLASTNOSTI 2,3-BUTANDIONU	15
2.2 PŘÍDAVEK 2,3-BUTANDIONU DO POTRAVIN	15
2.3 METABOLISMUS 2,3-BUTANDIONU	16
2.4 SENZORICKÉ HODNOCENÍ 2,3-BUTANDIONU VE VÍNĚ	16
2.5 SMYSLOVÉ VNÍMÁNÍ A DOPAD 2,3-BUTANDIONU VE VÍNĚ.....	17
2.6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ OBSAH 2,3-BUTANDIONU VE VÍNĚ.....	17
2.6.1 Jablečno-mléčné kvašení (MLF)	17
2.6.2 pH	18
2.6.3 Dávka inokula mléčných bakterií.....	18
2.6.4 Omezené vystavení vzduchu během kvašení	19
2.6.5 Kontakt s usazeninami kvasinek	19
2.6.6 Obsah kyseliny citrónové.....	19
2.6.7 Obsah SO ₂	19
2.7 ZDRAVOTNÍ RIZIKA 2,3-BUTANDIONU	20
2.7.1 Negativní vlivy 2,3-butandionu na lidský organismus.....	20
3 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA	21
3.1 SKLIZEŇ HROZNŮ	21
3.2 PŘEJÍMKA HROZNŮ	21
3.3 ODZRŇOVÁNÍ A MLETÍ HROZNŮ	21
3.4 NAKVÁŠENÍ RMUTU.....	21
3.5 LISOVÁNÍ.....	22
3.6 ÚPRAVA MOŠTU	22
3.6.1 Odkalování	22
3.6.2 Okyselování	23
3.6.3 Odkyselování	23
3.6.4 Síření	23
3.6.5 Úprava cukernatosti.....	23
3.7 FERMENTACE MOŠTU.....	23
3.8 ŠKOLENÍ (ZRÁNÍ) VÍNA	24
3.8.1 Stáčení vína.....	24
3.8.2 Síření	25



3.8.3	Dolévání.....	25
3.8.4	Číření.....	25
3.8.5	Filtrace.....	25
3.9	ZÁVĚREČNÉ ÚPRAVY HOTOVÉHO VÍNA.....	26
4	INSTRUMENTÁLNÍ METODY STANOVENÍ 2,3-BUTANDIONU.....	27
4.1	KOLORIMETRIE	27
4.1.1	Kolorimetrické stanovení 2,3-butandionu	27
4.2	POLAROGRAFIE	27
4.2.1	Polarografické stanovení 2,3-butandionu	28
4.3	GRAVIMETRIE (VÁŽKOVÁ ANALÝZA)	28
4.3.1	Gravimetrické stanovení 2,3-butandionu.....	28
4.4	FLUORIMETRIE	29
4.4.1	Fluorimetrické stanovení 2,3-butandionu	29
4.5	SPEKROFOTOMETRIE	29
4.5.1	Spektrofotometrické stanovení 2,3-butandionu.....	30
4.6	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE (GC).....	30
4.6.1	Popis GC analýzy.....	30
4.6.2	Stanovení obsahu 2,3-butandionu GC.....	32
4.7	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	32
4.7.1	Kapalinový chromatograf	32
4.7.2	Stanovení obsahu 2,3-butandionu HPLC	35
5	CÍLE PRÁCE.....	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	37
6	METODA SEPARACE A HPLC STANOVENÍ 2,3-BUTANDIONU	38
6.1	ANALYZOVANÝ MATERIÁL	38
6.2	CHEMIKÁLIE	39
6.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	40
6.4	VLASTNÍ PRACOVNÍ POSTUP.....	41
6.4.1	Příprava mobilní fáze.....	41
6.4.2	Příprava vzorku před destilací	41
6.4.3	Destilace vzorku	41
6.4.4	Vlastní chromatografická analýza	42
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
7.1	EFEKT POTENCIÁLU NA APLIKOVANÉM NA PRACOVNÍ ELEKTRODU	43
7.2	OBSAH 2,3-BUTANDIONU VE VYBRANÝCH VZORCÍCH VÍN	46
ZÁVĚR	48	
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49	
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55	
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	56	



SEZNAM TABULEK	57
SEZNAM PŘÍLOH	58



ÚVOD

Voda, vzdušný kyslík a živiny tvoří tři základní fyziologické potřeby, bez kterých by člověk nemohl existovat. Požívaná potrava nejen že obsahuje vodu a živiny a tím tyto potřeby uspokojuje, ale zároveň se může různě upravovat a sestavovat, aby člověku poskytla i pocit nasycení a uspokojení. Takto upravenou potravu, kterou si člověk navykl přijímat v určitém množství, složení a v určitou denní dobu, označujeme jako stravu. Strava by měla být složená a upravená tak, aby dodávala tělu vše, co je pro jeho rozvoj, udržování a činnost nejprospěšnější. Především by měl být zajištěn dostatečný přísun hlavních živin (bílkovin, lipidů, sacharidů), které tvoří značnou část sušiny stravy, ale také přísun minerálních látek a vitamínů, které do jisté míry blahodárně působí na zdraví konzumenta.

Pozitivní vliv mají kromě živin také některé sensoricky aktivní látky, které mohou být zároveň i zdrojem energie nebo živin. Přesto jejich hlavní úlohou je zlepšovat sensorickou jakost potravin. Zvýšení sensorické jakosti příznivě ovlivňuje intenzitu trávení a vstřebávání a zlepšuje tak využitelnost živin.

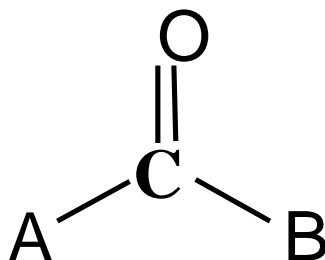
2,3-butandion je sloučenina zodpovědná za charakteristické máslové aroma a chuť. Jako vedlejší produkt kvašení se běžně vyskytuje ve vínech v nízkých koncentracích. Jeho obsah však může být ovlivněn různými faktory (stylem vína, obsahem SO_2 a kyseliny citrónové atd). Je známo, že někteří výrobci vín podporují produkci 2,3-butandionu kvůli pocitu a vůni, kterou jim uděluje. Přesto 2,3-butandion hraje zásadní roli při určování kvality vín, protože při vysokých koncentracích negativně ovlivňuje jejich vůni a chuť.



I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KARBONYLOVÉ SLOUČENINY

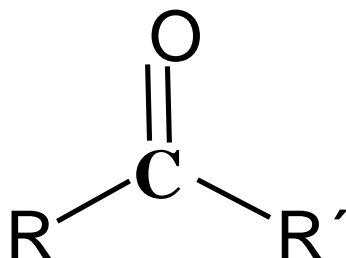
Karbonylové sloučeniny jsou především organické sloučeniny, které obsahují karbonylovou skupinu, která se skládá z uhlíkového atomu vázaného dvojnou vazbou ke kyslíkovému atomu. Karbonylová skupina je jedna z nejdůležitějších funkčních skupin. Tato skupina je přítomna v aldehydech, ketonech, karboxylových kyselinách, jejich esterech a i dalších třídách různých sloučenin. Všechny tyto skupiny látek hrají významnou roli jak v biologických procesech, tak i v chemickém průmyslu. V organické chemii je samotná karbonylová skupina obsažena v aldehydech a ketonech. V systematickém názvosloví je ve sloučenině karbonylová skupina vždy na druhém místě. [1], [2]



Obr.1 Obecný strukturní vzorec karbonylové skupiny

1.1 Ketony

Ketony jsou organické sloučeniny, které obsahují ketoskupinu (C=O) uprostřed uhlovodíkového řetězce. V ketonech jsou na karbonylovou skupinu navázány vždy dva uhlíkaté zbytky. V chemickém názvosloví se přidává koncovka „-on“. Do skupiny ketonů patří **2,3-butandion** [3]

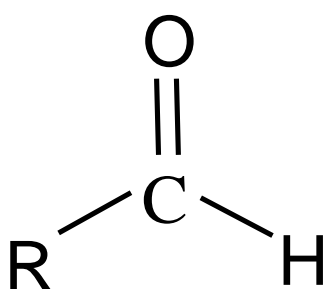


Obr. 2 Obecný strukturní vzorec ketonu



1.2 Aldehydy

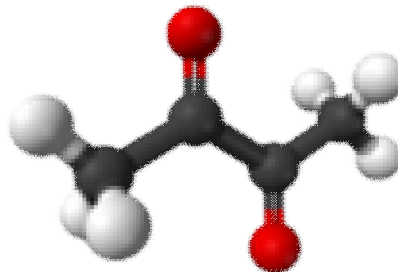
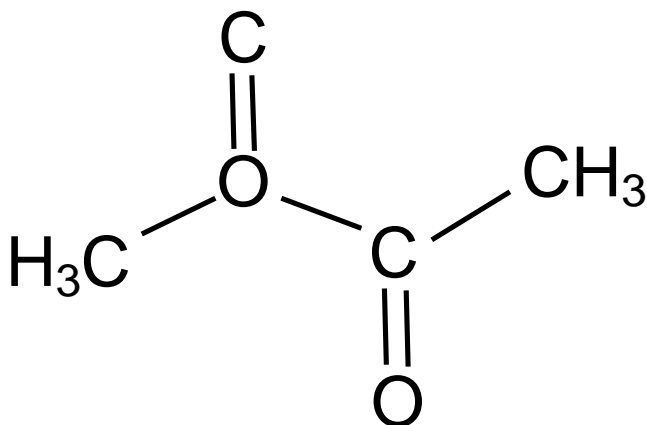
Aldehydy jsou organické sloučeniny, které obsahují aldehydickou funkční skupinu (-COH) na konci uhlovodíkového řetězce. Jak aldehydy tak ketony jsou v přírodě velmi běžné. Jsou to vonné součásti rostlinných silic a také meziproducty biochemických reakcí, například Krebsova cyklu. Systematické názvy aldehydů se tvoří z kmene názvu uhlovodíku, od něhož jsou odvozeny přidáním koncovky *-al*. Pokud karbonylová skupina není součástí hlavního řetězce, označuje se koncovkou *-karbaldehyd*. Mezi nejvýznamnější aldehydy patří acetaldehyd, benzaldehyd a formaldehyd. [4]



Obr. 3 Obecný strukturní vzorec aldehydu

2 CHARAKTERIZACE 2,3 BUTANDIONU

2,3-butandion je diketon, tvořený dvěma karbonylovými skupinami vedle sebe [5]



Obr. 4 Strukturní vzorec 2,3-butandionu Obr. 5 Grafický vzorec 2,3-butandionu [59]

2.1 Vlastnosti 2,3-butandionu

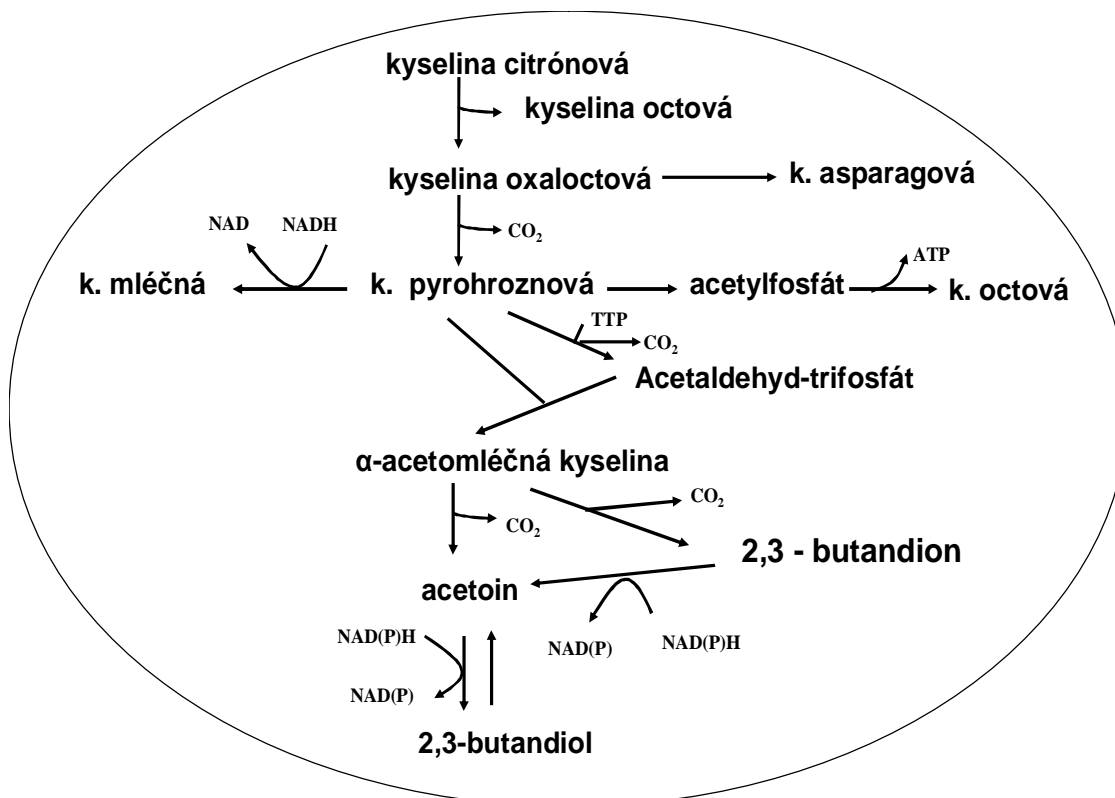
2,3-butandion je nejznámější sloučenina zodpovědná za charakteristické máslové aroma a chuť. [6] Ve víně je syntetizován během alkoholového a jablečno-mléčného kvašení. [7] Je produkován některými druhy mléčných bakterií, zahrnující rody *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Oenococcus*. Kromě vína je přirozeně obsažen také v mléčných výrobcích.[8]

2.2 Přídavek 2,3-butandionu do potravin

Výrobci přidávají 2,3-butandion do margarínů nebo olejů, aby dodali konečnému výrobku typickou chuť, protože by byly relativně nechutné. [9] Dále se přidává do sýra, mléka, sušenek, cukroví a produktů cukrářství, čokolády a produktů kakaa, ochucených sirupů, bramborových lupínků nebo mouky.[10] Dr. Nielsen a Richelieu ve své práci popisují, že někteří výrobci vín, např. odrůdy Chardonnay, vědomě podporovali produkci 2,3-butandionu kvůli pocitu a vůni, kterou jim uděluje. [11]

2.3 Metabolismus 2,3-butandionu

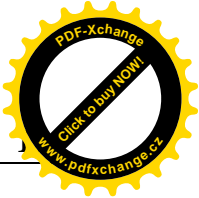
2,3-butandion je vytvořený jako meziproduct dekarboxylace kyseliny pyrohroznové a 2,3-butandiolu. [12] Kyselina pyrohroznová je odvozená z metabolismu cukru a kyseliny. Tvorba 2,3-butandiolu přispívá k redukční rovnováze buněčného metabolismu. Teoreticky 1 mol citrátu vyprodukuje 1 mol kyseliny octové, 2 moly oxidu uhličitého a 0,5 mol [2,3-butandion + acetoinu a 2,3 butandiolu]. [13]



Obr. 6 Metabolismus 2,3-butandionu [60]

2.4 Senzorické hodnocení 2,3-butandionu ve víně

Senzorické hodnocení 2,3-butandionu ve víně se provádí pomocí vyškoleného smyslového panelu, který je složen ze 20 účastníků. Vzoroký vína jsou představeny panelu, který hodnotí podle stupnice 0-9. Stupeň 0 indikuje, že máslový atribut nemůže být povšimnut, zatímco stupeň 9 se vyznačuje vysokou intenzitou 2,3-butandionu [8]



2.5 Smyslové vnímání a dopad 2,3-butandionu ve víně

2,3-butandionu v nízkých koncentracích (v kombinaci s ostatními sloučeninami) udává kvasnou, ořechovou, jemně máslovou chuť. Ve vysokých koncentracích tvoří charakteristickou máslovou vůni, která je spojená s mléčným znakem. [14] Smyslový práh 2,3-butandionu ve víně závisí na stylu a typu vína. [15]

V Austrálii byl proveden průzkum 400 demonstrováných vín, u kterých se sledoval obsah 2,3-butandionu. Když byla přítomná koncentrace 2,3-butandionu ve víně v rozmezí 5 až 8 mg/l, považoval se 2,3-butandion jako nevhodný. Naopak nižší koncentrace 2,3-butandionu v rozmezí 1 až 4 mg/l (v závislosti na stylu vína a typu vína) byla považována jako prospěšná, protože vínu dodala žádoucí jemnou máslovou chuť. [16] Smyslový práh 2,3-butandionu ve víně byl již dříve stanoven na 2-3 mg/l. [15]

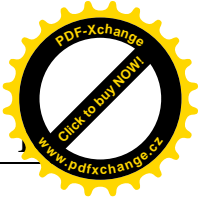
2.6 Faktory ovlivňující obsah 2,3-butandionu ve víně

Obsah 2,3-butandionu ve víně ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří jablečno-mléčné kvašení, pH, dávka inokula mléčných bakterií, omezené vystavení vzduchu během kvašení, kontakt s usazeninami kvasinek, obsah kyseliny citrónové a SO₂. [17]

2.6.1 Jablečno-mléčné kvašení (MLF)

Jablečno-mléčné kvašení je druhotné kvašení neboli biochemický proces, při kterém se mění tvrdá kyselina jablečná na jemnou **kyselinu mléčnou a oxid uhličitý**. Kvašení způsobují specifické bakterie, které se nacházejí na slupkách hroznů a při lisování přecházejí do moštu nebo se přímo naočkují do vína. Aby kvašení proběhlo, je nutná teplota kolem 15-25 °C, nízký obsah oxidu siřičitého a pH mezi 3- 4. [18]

V moderní technologii se MLF používá zejména při výrobě červených vín. Optimální množství kyselin ve víně je 0,6 – 0,8 %. V teplých letech v našich podmínkách je tohoto obsahu dosaženo, takže úprava kyselosti se nedělá. Problém nastává, když je chladné počasí, v tom případě obsah kyselin bývá vyšší až 1,6 %. Když stoupne obsah kyselin, bývá to tak, že se netvoří kyselina vinná, ale tvoří se více kyselina jablečná. Víno s tak vysokým obsahem kyselin je chuťově nepřijatelné. [19] Proto se provádí MLF. Část kyseliny jablečné se úplně odbourá a část se přemění na kyselinu mléčnou, která je ve víně chuťově mnohem přijatelnější. [18] Ze začátku kvašení bývá koncentrace 2,3-butandionu 2x větší než u konce. Po-



kles je zapříčiněn jeho dvojstupňovou redukcí, nejprve na acetoin a potom na 2,3- butandiol. [8]

Existují dva způsoby, jak podporovat jablečno-mléčné kvašení:

- 1) Víno se stáčí o měsíc až o dva později než klasicky - nechává se dlouho ležet na kvasnicích
- 2) Sklep se krátkodobě (pár hodin) vytopí na 20-25 °C a pak se zase zchladí na skladovací teplotu. [19]

Ačkoliv optimální růstová teplota mléčných bakterií se pohybuje kolem 27 °C, pro růst ve víně je omezena na 15-25 °C, protože při 30 °C by hrozilo octové kvašení. Všeobecně je žádoucí, aby se víno naočkovalo při 20 °C pro povzbuzení prudkého růstu kultury a zahájení jablečno-mléčného kvašení. Očkování vína se nejčastěji provádí mléčnou kulturou *Oenococcus oeni* s optimem růstu 20-22 °C. [20]

2.6.2 pH

pH je velmi důležitým faktorem při procesu výroby vína. Ovlivňuje průběh MLF, stabilitu vína, smyslové atributy a tempo růstu mléčných bakterií. Při pH nižším jak 3,5 nedochází k růstu druhů *Laktobacillus* a *Pediococcus*. [21] Jediný *Oenococcus oeni* je schopen množit i při pH 3,3- 3,5 ve víně. [22] Zatímco při vyšším pH dochází k tvorbě kyseliny octové, tak při nižším pH k hromadění 2,3-butandionu ve víně. [23]

2.6.3 Dávka inokula mléčných bakterií

Dávka inokula mléčných bakterií značně ovlivňuje produkci 2,3-butandionu, dosazení a dokončení MLF. [8] Dr. Lonvauda a Zmirou zjistili, že nižší poměr očkování způsobuje vyšší hromadění 2,3-butandionu ve víně. [24] Ke svému výzkumu použili víno Rulandské bílé, s počátečním obsahem 2,3-butandionu 0,5 mg/l, které naočkovali mléčnou kulturou *Oenococcus oeni* a nechali se projít MLF. Po dokončení MLF mělo víno, které se naočkovalo 2×10^4 CFU/ml, obsahovalo 3,9 mg/l 2,3-butandionu, zatímco víno naočkované v 2×10^6 CFU/ml mělo jen 1,7 mg/l. Pro optimální produkci 2,3-butandionu se doporučuje množství inokula 0.5 až 5×10^6 CFU/ml. [8]



2.6.4 Omezené vystavení vzduchu během kvašení

MLF je v podstatě anaerobní proces, při kterém se kontakt vína se vzduchem omezuje na minimum, abychom předešli oxidaci. [8] Podle průzkumů omezené vystavení vzduchu při kvašení má za následek zvýšené koncentrace 2,3-butandionu. [25] Takto bylo demonstrováno na odrůdě Chardonnay. Během kvašení se za anaerobních podmínek vytvářelo kolem 2 mg/l 2,3-butandionu, zatímco za semi-aerobních podmínek až 12 mg/l. U takto vysoké koncentrace 2,3-butandionu bylo nezbytné proces kvašení přesušit a provést zasíření nebo filtraci. [25]

2.6.5 Kontakt s usazeninami kvasinek

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopné syntézy i degradace 2,3-butandionu. Kvasinky přítomné během MLF mohou do jisté míry ovlivnit obsah 2,3-butandionu. [26] Víno v nepřetržitém kontaktu s kvasinkami mělo nízkou koncentraci 2,3-butandionu. Čas, po který víno zůstává v kontaktu s usazeninami kvasinek, hraje důležitou roli při určování finálního obsahu 2,3-butandionu. [27]

2.6.6 Obsah kyseliny citrónové

Známa organická kyselina, vyskytující se ve víně v rozsahu 0,1-0,7 g/l. [8] Nejdříve se kyselina citrónová degraduje na kyselinu octovou a pyrohroznovou. Většina kyseliny pyrohroznové je poté metabolizována na kyselinu mléčnou a zbytek přes α -acetomléčnou kyselinu na 2,3-butandion, acetoin a 2,3-butandiol. [28] Přidává se do vína nebo hroznů za účelem hromadění 2,3-butandionu a úpravy kyselosti. Vyšší koncentrace kyseliny citrónové zvyšuje produkci 2,3-butandionu [29] Musíme ovšem postupovat s velkou opatrností, protože zvýšená produkce 2,3-butandionu je doprovázena tvořením dalších chuťových metabolitů, především kyseliny octové. V některých zemích je zakázáno přidávat kyselinu citrónovou do vína. [8]

2.6.7 Obsah SO₂

Jedná se o ostře páchnoucí a dusivý plyn vznikající spalováním síry. Snadno se rozpouští ve vodě na H₂SO₃ a část SO₂ se váže na karbonylové sloučeniny. Ve vinařství se používá k dezinfekci nádob a skladovacích tanků. [30] Reakce mezi 2,3-butandionem a SO₂ je vratná. Zpočátku během zrání vína potlačuje máselnou chuť, ale časem dochází



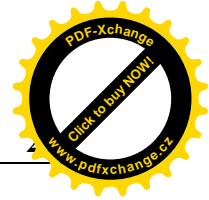
k samovolnému těkaní SO₂ a obnově máselné chuti. Se snižující koncentrací SO₂ se zvyšuje koncentrace 2,3-butandionu ve víně. [25]

2.7 Zdravotní rizika 2,3-butandionu

Zaměstnanci pracující ve firmách, kde se vyrábí 2,3-butandion nebo záměrně přidává do výrobků pro udělení máslové chuti, by měli častěji podrobovat lékařským prohlídkám. Riziko zdravotních efektů závisí na koncentraci 2,3-butandionu ve vzduchu a jak dlouho jsou pracovníci tomu vystaveni. 2,3-butandion vstupuje do těla inhalováním páry, ve formě kapének při rozprašování nebo kontaktem s kůží člověka. [31]

2.7.1 Negativní vlivy 2,3-butandionu na lidský organismus

- 1) **Plíce** – Na základě pokusů na zvířatech 2,3-butandion prokazatelně poškozuje dýchací ústrojí. Časté vystavení inhalacím 2,3-butandionu může způsobit vážnou plicní chorobu **Bronchiolitis obliterans**. Poškození plicí často bývá trvalé a v pokročilých stádiích může vést i k úmrtí. Hlavními symptomy jsou dušnost, úporný kašel a nedostatek dechu, který se projevuje dokonce během nepatrné námahy jako jsou rychlá chůze nebo chůze do kopce. Doktoři spojují tyto symptomy s astmatem, chronickou bronchitidou, zápallem plic nebo kouřením. [31] Tato plicní choroba byla diagnostikována u několika amerických zaměstnanců, kteří pracovali ve firmě vyrábějící 2,3-butandion a praženou kukuřici. Bronchiolitis obliterans se může vzácně vyskytnout u osob, kteří konzumují nadměrné množství popcornu, spojené s následným inhalováním páry z plastové tašky. [32]
- 2) **Oči** - Při kontaktu s párami 2,3-butandionu způsobuje píchání a pálení očí. V horších případech může dojít k povrchovým chemickým spáleninám očí. To vyžaduje nutné lékařské vyšetření.
- 3) **Nos a hrdlo** - Páry také negativně působí na horní cesty dýchací. Projevuje se pálením a vytvářením boláků.
- 4) **Kůže** - Páry nebo kapénky 2,3-butandionu nejenom že dráždí kůži, ale také způsobují její praskání a odlupování. U citlivých jedinců se vyskytují vyrážky, projevující se zčervenáním kůže. [31]



3 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA

3.1 Sklizeň hroznů

Výroba vína začíná sklizní hroznů. Hrozny révy vinné v našich klimatických podmínkách a zeměpisné poloze dozrávají koncem srpna. V září a začátkem října se sklízí ručně nebo mechanicky, s výjimkou pozdních a ledových sběrů. Období sklizně hroznů se nazývá vino-braní. Hrozny se sklízí v našich vinařských oblastech v plné zralosti, neboť vína z předčasně sklizených hroznů jsou zpravidla kyselá s drsnou a neharmonickou chutí. [33]

3.2 Přejímka hroznů

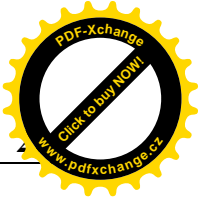
Sklizené hrozny se dopravují do zpracovatelských závodů v různých obalech (přepravky, kádě, sudy). Při skládce hroznů se zjišťuje hmotnost na polo- nebo automatických váhách. Dále se při přejímce stanovuje průměrná cukernatost a jakostní skupina podle třídy, odrůdy, stupeň zralosti a zdravotní stav hroznů. [34] Ke zjišťování cukernatosti slouží speciální moštoměry. U nás se cukernatost vyjadřuje ve stupních Československého normalizovaného moštoměru (ČNM), které udávají množství cukru v kg na 100 l moštu nebo Klosterneuburským moštoměrem (KMW), který udává množství cukru v kg na 100 kg moštu při 20 °C. [35], [36]

3.3 Odzrňování a mletí hroznů

Mlýnkování slouží k rozdrcení bobulí a provzdušnění drtě. Dělá se různými typy mlýnků - válcovými, bubnovými a odstředivými. Směs šťávy a rozdrcených bobulí nazýváme rmut. Odzrňování slouží k odstranění třapin z rmutu, aby do moštu nepřecházely nežádoucí látky. Provádí se na různých typech vystíracích či odstředivkových odzrňovačů, v nichž se v perforovaném válci zachycují třapiny, kdežto rmut jím protéká do sběrné nádrže. Stroje, které umožňují mlýnkování a odzrňování najednou, se nazývají mlýnkoodzrňovače [34]

3.4 Nakvášení rmutu

Rmut ze světlých hroznů pro výrobu bílého vína se lisuje ihned. Rmut ze silně aromatických světlých a modrých hroznů pro výrobu červeného vína se před lisováním nakvašuje. Bílé odrůdy se nakvašují obvykle 1 až 2 dny a modré odrůdy 4-14 dní. Při nakvašování přecházejí barviva ze slupek a třísloviny z pečiček do rmutu. [34]



Princip nakvašování rmutu:

Po rozemletí a odzrnění se rmut přečerpává rmutových čerpadlem do kádí. Nakvašuje se při teplotě 20-25 °C v závislosti na zpracovávané odrůdě. Při nakvášení v kádi vzniká na povrchu rmutový klobouk - slupky bobulí a zbytek třapin jsou nadnášeny tvořícím se oxidem uhličitým. Vzniklý rmutový klobouk je potřeba občas narušit a ponořit pod hladinu. Provádí je to běžně pomocí tyče, aby byl mošt v neustálém kontaktu s barvivy obsaženými ve slupkách. Tímto způsobem je také bráněno bakteriálním infekcím moštu.[37]

3.5 Lisování

Lisování má za účel oddělení šťávy, která byla uvolněna z buněk předchozími technologickými operacemi. Rmut se lisuje šroubovým nebo hydraulickým tlačným zařízením. Po naplnění do lisu se oddělí samotok, z kterého je nejjemnější a nejkvalitnější víno. Samotok je první podíl vylisovaného moštu, který obsahuje nejméně tříslovin. Pak se postupně zvyšuje tlak na lisovanou hmotu (1,2 až 2,5 MPa). Výtěžek moštu se pohybuje kolem 70 %. Ze 100 kg hroznů se získá 90 l rmutu, to odpovídá 75 l moštu. Z celkového výtěžku moštu připadá 60 % na samotok, 26 % pochází z prvního lisování, 10 % z druhého lisování a 4 % z třetího lisování. Na 100 l moštu je potřeba asi 140 kg hroznů. Na závěr je odlisován zbytek moštu nazývaný dotažek. [19], [34]

3.6 Úprava moštu

K dosažení optimální kvality moštu, zaručující hladký průběh kvašení a vysokou jakost vyrobeného vína, je třeba mošt získaný lisováním dodatečně upravovat. V praxi se provádí odkalování, odkyselování, okyselování, síření, a úprava cukernatosti moštu.[34]

3.6.1 Odkalování

Odkalování moštu slouží k oddělení hrubých kalů a nečistot, s nimiž se částečně strhávají slizové látky, vysokomolekulární dusíkaté látky, těžké kovy a pesticidy. Odkalování se provádí buď prostou sedimentací nebo membránovou filtrací. [19,34]



3.6.2 Okyselování

Okyselování se provádí v letech s nízkým obsahem kyselin v moštu. Přidává se kyselina vinná v množství 1-2 g/l tak, aby celková kyselost byla 7-8 g/l [34]

3.6.3 Odkyselování

Odkyselování má za účel snížení kyselosti moštů (tj. přebytky kyseliny vinné a jablečné) s nízkým obsahem cukru. Odkyseluje se :

- 1) CaCO_3 , který vysráží pouze vínan vápenatý
- 2) CaCO_3 a úpravou pH na cca 3, kterou se vysráží i jablečnan
- 3) Průtokem přes vrstvu anexu – měniče iontů
- 4) Mísením kyselých moštů s méně kyselými - tzv. scelování [34]

3.6.4 Síření

Síření se provádí kvůli ochraně moštu před oxidací, bakteriální a plísňovou kontaminací. Sítí se SO_2 dávkou 25-50 mg/l. SO_2 potlačuje činnost nežádoucích MO a příznivě ovlivňuje senzorický charakter následného vína.[34]

3.6.5 Úprava cukernatosti

Úprava cukernatosti moštu se dělá v nepříznivých letech, kdy mošty obsahují málo cukru a příliš kyselin. Upravuje se přidávkem sacharózy u bílých hroznů na 21° a u červených vín na 22° cukernatosti. Optimální je poměr 20-25 °ČNM cukru na 6-10 % kyselin. V příznivých vegetačních ročnících je tento poměr zachován a není třeba mošty přislazovat. [19,34] Podle Zákona 321 ze dne 29. dubna 2004 o vinohradnictví a vinařství je slazení u jakostních vín s přívlastkem přísně zakázáno. [36]

3.7 Fermentace moštu

Alkoholové kvašení moštů je základem technologie výroby vína. Jedná se o složitý biochemický proces rozkladu cukru obsaženého v moště na alkohol a oxid uhličitý způsobený kvasinkami. Jednoduchá rovnice alkoholového kvašení: [19]





Během etanolového kvašení nevzniká z cukru pouze etanol a oxid uhličitý, ale i četné vedlejší produkty. Kvašením se získává přibližně následující zastoupení kvasných produktů: etanol 47,2 %; CO₂ 45,4 %; glycerol 3,2 %; buněčná hmota 2,0 %; vyšší alkoholy 0,8 %; organické kyseliny 0,6 %; 2,3-butandion 0,2%; stopy acetaldehydu, 2,3-butandiolu a furfuralu. [30]

Ve vinařství se používají kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (synonyma *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces ellipsoideus*). Stále více se používají i ve formě ASVK – aktivovaných sušených vinařských kvasinek. V současnosti se používá především řízené kvašení. Zákvas se připravuje v množství 1 % veškerého moštu namnožením vhodné rasy vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu. [34]

Fermentace probíhá ve 3 fázích:

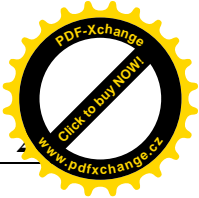
- 1) Začátek kvašení** - je charakteristický pozvolným rozmnožováním kvasinek a pomalým začátkem prokvašování cukru moštu a trvá 2-3 dny.
- 2) Bouřlivé kvašení** nastává 3 až 4 den a projevuje se vývinem tepla, zvýšením teploty až nad 25 °C a uvolňováním oxidu uhličitého, který strhává i aromatické a 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 7-14 dní.
- 3) Dokvašování** je poslední fáze kvašení, která nastává po poklesu obsahu cukru na 2-5 g/l a která trvá 1-2 měsíce, někdy i půl roku. Kvašení je ukončeno v době, kdy cukr obsažený v moštu je zkvašen, resp. jeho zbytkový nezkvašený obsah je velmi malý. Víno po ukončení kvašení se nazývá mladé víno. [34]

3.8 Školení (zrání) vína

Školením vína vytváří konečné sensorické vlastnosti a celkový charakter vína. Provádí se před plněním do lahví a zahrnuje 1 a 2 druhé stáčení, síření, pravidelné dolévání, čiření a filtraci.

3.8.1 Stáčení vína

Stáčení vína je činnost, při níž víno oddělujeme od sedimentu kalů a kvasinek. První stáčení určuje především zdravotní stav vína a obsah kyselin. Po prvním stáčení se víno obvykle



provzdušní a nastane další vysrážení kalů. Dochází vylučování vinného kamene ve formě vínanu vápenatého a hydrogenvinanu draselného. Proto se po 6-8 týdnech víno provádí **druhé stáčení** [19,34]

3.8.2 Síření

Dokvašené víno se odděluje od sedimentu kalů a kvasinek stáčením do čistých zasířených kvasných tanků. Síříme nejčastěji při druhém stáčení, může se provádět i v průběhu zrání. Síříme zapalováním sirných knotů, KSO_4 a nebo rovnou kyselinou siřičitou. Síření způsobuje především konzervaci vína, podporuje tvorbu glycerolu a usnadňuje čiření. [19, 34]

3.8.3 Dolévání

Při dokvašování dochází k odparu vody a nad vínem v nádobě vzniká volný prostor, který se vyplňuje vzduchem. Existuje tu nebezpečí hnědnutí a křísovatění vína. Proto se objem musí doplňovat vyškoleným zralým vínem stejné odrůdy a třídy jakosti, tzv. dolévání. [19]

3.8.4 Čiření

Čiření provádíme mezi prvním a druhým stáčením vína. Je založeno jednak na povrchovém adsorpční schopnosti čiridel, jednak na schopnosti se srážet s některými nežádoucími látkami ve víně. Srážením vniknou sraženiny, čímž se z vína strhávají i jemné koloidní látky. Celý proces srážení a usazování trvá zpravidla 2 až 3 týdny při teplotě do 25 °C. [19]

Čiridla dělíme do tří základních skupin podle jejich účinku :

- 1) Čiridla založená na absorpci nebo chemické reakci – aktivní uhlí, $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$
- 2) Čiridla s kladným nábojem – vaječný bílek, želatina, kasein
- 3) Čiridla se záporným nábojem – tanin, agar, kyselina křemičitá, kaolin [19]

3.8.5 Filtrace

Filtrace vín je oddělování pevných částic vína na pórovité stěně filtru. Účinnost filtrace závisí na velikosti pórů filtrační hmoty a způsobu zachycení pevných částic. Při průtokové filtraci se zachytnou kalící částice větší než je průměr póru filtrační hmoty. Při adsorpční filtraci se zachytávají na povrchu filtrační hmoty i částice, které jsou menší než je průměr póru. Obvykle se filtrační hmoty kombinují tak, aby byly využity oba způsoby. [19]



3.9 Závěrečné úpravy hotového vína

Po skončeném školení, kdy víno je optimálně vyzrálé a je ukončen proces tvorby aroma a chuti vína, se provádí závěrečné úpravy hotového vína. Závěrečné úpravy hotového vína zahrnuje scelování vína, úpravu koncentrace zbytkového cukru, etanolu a kyselin, odkyselování či okyselování vína, barvení či odbarvování vína, alkoholizování vína a osvěžování vína. Poté se víno plní do lahví či jiných expedičních obalů. [34]



4 INSTRUMENTÁLNÍ METODY STANOVENÍ 2,3-BUTANDIONU

Obsah 2,3-butandionu v potravinách lze stanovit různými instrumentální metodami, mezi které patří:

- Kolorimetrie, Polarografie, Gravimetrie, Fluorimetrie, Spektrofotometrie
- Plynová a kapalinová chromatografie

4.1 Kolorimetrie

Kolorimetrie je metoda založená na porovnávání intenzity zabarveného roztoku o neznámé koncentraci s roztokem téže látky o známé koncentraci. Intenzita zabarveného roztoku se měří pomocí kolorimetru. Kolorimetr je zařízení, které měří absorbanci jednotlivých vlnových délek světla (400 až 700 nm) [38] Metoda je vhodná pro stanovení 2,3-butandionu a acetoinu ve vzorcích vína, ale má příliš vysokou mez detekce [39]

4.1.1 Kolorimetrické stanovení 2,3-butandionu

Kolorimetrické stanovení 2,3-butandionu je založeno na Voges-Proskauerově reakci, kdy 2,3-butandion reaguje s guanidovou skupinou kreatinu v přítomnosti α -naftolu.[39] Destilací vzorku vína nedochází k úplnému oddělení 2,3-butandionu od acetoinu a proto může dojít k jejímu nadhodnocení obsahu. Přídavek α -naftolu k destilátu má za následek tvorby růžového komplexu. Využitím rozdílu v rychlosti tvorby růžové barvy lze získat dobrý odhad jejich obsahů v individuálním vzorku vína.[40] Obsah 2,3-butandionu se zjišťuje přesně v 10. minutě, při které dochází k maximální tvorbě růžového zbarvení. Maximální tvorba barvy u acetoinu byla dosažena v 60 minutě po přidavku α -naftolu. Množství barvy se stanoví pomocí kolorimetru při vlnové délce 522 nm. [39]

4.2 Polarografie

Polarografie je elektrochemická metoda založená na vyhodnocování závislosti elektrického proudu na napětí přivedeném na dvojici elektrod, ponořených do zkoumaného roztoku, z nichž jedna je tzv. dokonale polarizovatelná (znamená změnu potenciálu elektrody průchodem elektrického proudu) a druhá je tzv. nepolarizovatelná elektroda (potenciál se průtokem proudu nemění).[41] Při klasické polarografii se jako polarizovatelná elektroda používá malá kapka Hg, která se vytváří na konci tlustostěnné skleněné kapiláry pomalým vyté-



káním rtuti ze zásobníku rtuti. Jako nepolarizovatelná elektroda se používá kalomelová, chloridostříbrná nebo velkoplochá rtuťová.[42] Tuto metodu vynalezl a objasnil prof. Jaroslav Heyrovský, který za ni obdržel 10. prosince 1959 Nobelovu cenu za chemii.[66]

Stanovovaná látka musí být schopná redukce nebo případně oxidace na polarizovatelné elektrodě. Při klasickém uspořádání se zvyšuje zvolna napětí vkládané na obě elektrody a sleduje se, jak se mění proud protékající obvodem v závislosti na vkládaném napětí. Sledovaná závislost proudu na napětí má tvar tzv. **polarografické vlny**. [42]

4.2.1 Polarografické stanovení 2,3-butandionu

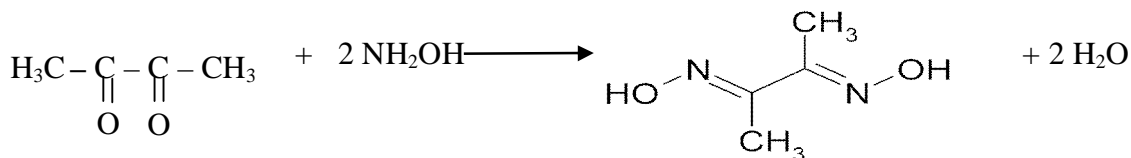
Principem klasického polarografického stanovení je destilace 2,3-butandionu ze vzorku s vodní parou a poté se zaznamenání polarografické vlny v rozsahu -0,4 až -1,0 V. Metoda je vhodná ke zjišťování obsahu 2,3-butandionu ve víně a másle. [43]

4.3 Gravimetrie (vážková analýza)

Gravimetrie je založena na vyloučení stanovované složky ve formě málo rozpustné sloučeniny a na jejím převedení na sloučeninu o přesně definovaném složení, která se poté váží. [44] Gravimetrie patří mezi chemické metody kvantitativní analýzy. Metoda je vhodná pro stanovení 2,3-butandionu, acetoinu a 2,3-butandiolu i ve vzorcích vína. [43]

4.3.1 Gravimetrické stanovení 2,3-butandionu

Gravimetrické stanovení 2,3-butandionu je založeno na tomto principu: 2,3-butandion reaguje s hydroxylaminem za vzniku diacetyldioximu, který tvoří se solemi dvojmocného niklu tmavě červený bis(dimethylglyoximato)nikl. [43]



Do 250 ml destilační baňky se nadávkuje 50 ml vzorku vína a se destiluje s vodní parou. Destilát se jímá do 200 ml Erlenmeyerovy baňky a v okamžiku, kdy se nadeziluje 150 ml, tak se destilace přerušuje. Ke 150 ml destilátu se přidá 2 ml 10 % chloridu nikelnatého, 4ml 20% octanu sodného a 4 ml 20 % hydroxylaminu hydrochloridu. Poté se baňka s destilátem zahřívá 1 hodinu ve vroucí vodní lázni. Sraženina se odfiltruje, promyje horkou vodou, suší



zhruba 1 hodinu při 105 °C a zváží. Navážené množství vynásobené faktorem 0,596 udává množství 2,3-butandionu ve vzorku vína. [43]

4.4 Fluorimetrie

Fluorimetrie je metoda, které se používá k měření intenzity fluorescenčního záření emitovaného zkoušenou látkou ve vztahu k intenzitě fluorescenčního záření standardu. [45] Fluoreskující látka je excitována monochromatickým světlem, čímž se některý z valenčních elektronů vypudí do vyšší energetické hladiny. Při návratu zpět do původního energetického stavu se promaří část energie jako teplo a část vyzáří ve formě fotonu. Energie emitovaného záření je proto vždy nižší než energie záření excitačního. Emitované světlo se snímá zpravidla ve směru kolmém na excitační paprsek a po průchodu emisním monochromátorem se jeho intenzita měří fotonásobičem. [46]

4.4.1 Fluorimetrické stanovení 2,3-butandionu

Fluorimetrické stanovení 2,3-butandionu je založeno na extrakci vzorku ve směsi rozpouštědel a měření intenzity fluorescenčního záření emitovaného zkoušenou látkou ve vztahu k intenzitě fluorescenčního záření standardu. [45]

Další možností je fluorimetrické stanovení 2,3-butandionu ve vzorku vína po detekci zirkonia komplexu. 2,3-butandion reaguje s isoniazidem v kyselém prostředí za vzniku hydrazonu, který tvoří se zirkoniovými solemi fluorescenční komplexy. [47]

4.5 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda založená na interakci elektromagnetického záření s analyzovaným roztokem. Ve spektrofotometrii se vychází z Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje vztah mezi koncentrací látky v roztoku a její absorpční. Při průchodu světelného toku roztokem dochází k jeho zeslabení, protože částice látek přítomných v roztoku část elektromagnetického záření pohltí. Zbývající záření, které projde kyvetou, dopadá na detektor, který měří jeho intenzitu. [48] Tato metoda se využívá pro stanovení obsahu 2,3-butandionu ve vzorku vína a piva. [49]



4.5.1 Spektrofotometrické stanovení 2,3-butandionu

Princípem spektrofotometrického stanovení je destilace 2,3-butandionu ze vzorku s vodní parou, poté se do destilátu přidá roztok o-fenylendiaminu a změří se absorbance při 335 nm. [49]

4.6 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je analytická a separační metoda, která má výsadní postavení v analýze těkavých látek. GC používá jako mobilní fázi plyn a jako stacionární fázi kapalinu zakotvenou na povrchu pevné látky. Přístroj používaný pro GC se nazývá plynový chromatograf. [50]

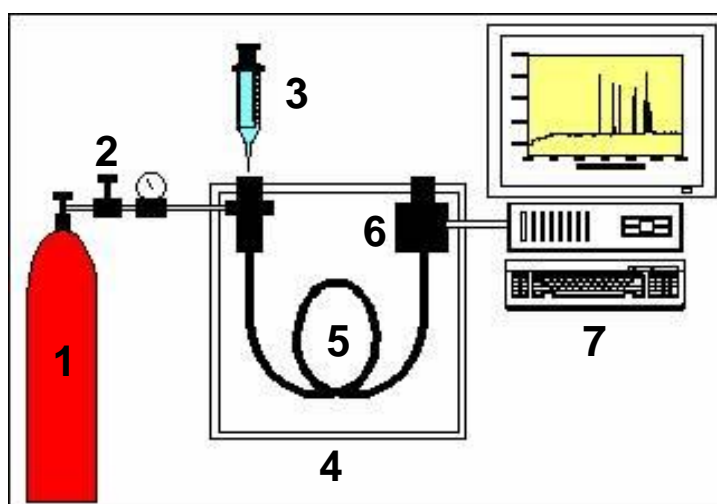
4.6.1 Popis GC analýzy

Separční kolona uvnitř termostatu je zahřívána na určitou teplotu, vhodnou pro danou analýzu, kterou udržuje nebo programovatelně mění termostat. Do kolony vchází nosný plyn o konstantní průtokové rychlosti. Výstup z kolony je zaveden do příslušného detektoru. Do proudu nosného plynu je přes nástříkový port nastříknut vzorek analyzované směsi. Nosný plyn unáší plynnou směs analyzované látky a nosného plynu skrze kolonu, kde nastává její dělení na jednotlivé složky. Princípem dělení směsi na složky je rozdílná rozpustnost těchto složek ve stacionární fázi. Čím je daná složka směsi rozpustnější ve stacionární fázi, tím více je kolonou její průchod zpomalován. Během chromatografické separace se neustále opakuje proces „rozpuštění“ a „odpařování“ složek směsi, takže na výstupu se objeví prakticky všechny analyt, který byl do kolony nastříknut. Jednotlivé složky směsi pak vchází do příslušného detektoru, jehož signál je zaznamenáván v podobě chromatogramu. Hlavními parametry, které ovlivňují kvalitu separace a dobu GC analýzy, jsou teplota kolony a průtoková rychlost nosného plynu. [50]

Plynový chromatograf se skládá z těchto částí :

- 1) **Zásobník nosného plynu** - nosný plyn tvoří mobilní fázi. Nejčastěji bývá nosným plynem He, Ar, N₂, H₂, CO₂
- 2) **Regulátor průtoku nosného plynu** - zajišťuje konstantní průtok nosného plynu a vzorku kolonou

- 3) **Dávkovací systém (injektor)** - provádí se ručně nebo automaticky speciální injekční stříkačkou
- 4) **Termostat** - vyhřívá kolonu a udržuje její stálou teplotu
- 5) **Chromatografická kolona** - samotné místo separace plynné směsi. Rozeznáváme:
 - a) náplňové kolony (délka 0,5 až 5 m, průměr 2 až 5 mm) - jsou naplněné stacionární fází
 - b) kapilární kolony (délka 10 až 100 m, průměr 0,01 až 0,5 mm) - stacionární fází tvoří jen povrch kolony
- 6) **Detektor** – je zařízení určené k detekování složek již odseparované směsi. Nejvíce používaný v GC je plamenově ionizační a hmotnostní detektor
 - a) **Plamenově ionizační detektor (FID)** – univerzální detektor vyznačující se dobrou citlivostí a mezí detekce (až 10^{-12} g/ml). Molekuly plynu se ionizují v kyslíkovém plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami. Nosný plyn se před vstupem do hořáku mísí s vodíkem, vzduch je přiváděn z vnějšku. Přítomnost složky zvýší ionizaci a elektrický proud se zvětší. FID detekuje prakticky vše, s výjimkou organických par a plynů.
 - b) **Hmotnostní** - vyznačuje se nižší mezí detekce (detekční limit 10^{-13} g/ml). Na rozdíl od FIDu lze ho přímo použít pro identifikaci látek.
- 7) **Vyhodnocovací zařízení (počítač)** [51]



Obr. 7 Schématické znázornění plynového chromatografu [61]



4.6.2 Stanovení obsahu 2,3-butandionu GC

Stanovení obsahu 2,3-butandionu GC lze provádět několika pracovními postupy:

- 1) **Pracovní postup:** Do 3 plastových ampulek se odměří po 5 ml vzorku a přidají se rozpouštědla (aceton a 2,3-pentadion). Poté se provede centrifugace po dobu 15 min a vzniklý supernatant (tj. tekutina nad sedimentem) se zfiltruje. Filtrát je potom přímo vstříkován do plynového chromatografu s plameno-ionizačním detektorem. Tento postup je využíván pro jednoduché a rychlé stanovení obsahu 2,3-butandionu ve másle, mléce, kysaných a fermentovaných mléčných výrobcích. [52]
- 2) **Pracovní postup:** 20 ml odplyněného vzorku se napipetuje do 50 ml láhve, která se propláchla dusíkem po dobu 1 minuty. Láhev se uzavře zátkou a umístí do vodní lázně o 40 °C po dobu 15 minut. Po 15 min se odebere injekční stříkačkou 2,0 ml vzorku a vstříkne do plynového chromatografu. Tento postup je vhodný pro stanovení obsahu 2,3-butandionu v pivě a víně. [53]
- 3) **Pracovní postup:** Do vzorku se přidá 1,2-diaminobenzen, který reaguje s 2,3-butandionem za vzniku 2,3-dimethylquinoxalínu. Metoda se hodí pro stanovení 2,3-butandionu ve vzorcích piva a vína. Vzniklý produkt se stanoví plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem. [54]

4.7 Kapalinová chromatografie

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika **HPLC** (vysoko účinná kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. HPLC analýza je ve srovnání s GC analýzou mnohem méně citlivá na teplotu kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze. Je však citlivá na složení a pH mobilní fáze. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky (např. vitamíny), které by při použití plynové chromatografie degradovaly a byly by tak neanalyzovatelné. [50]

4.7.1 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf je přístroj, na kterém se provádí HPLC analýza. Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadáv-



kován vzorek (řádově několik málo μl). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě **chromatogramu**. [50]

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí :

- 1) **Zásobník mobilní fáze** - mobilní fází v HPLC může být např. redestilovaná voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. [50]
- 2) **Vysokotlaká pumpa** - je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi, které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z tohoto důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem (až 40 MPa), aby mohla projít přes kolonu. Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze zajišťuje právě vysokotlaká pumpa. [50]
- 3) **Dávkovací zařízení** - vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače. [50]
- 4) **Kolona** - zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce typicky 5-25 cm, která je naplněna stacionární fází. Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μm), na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze je tvořena nepolárními uhlovodíky (C8-oktan, C18- oktadekan) [50]
- 5) **Detektor** – je zařízení určené k detekování složek již odseparované směsi. V HPLC se používá celá řada detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a mezí detekce. Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů :
 - a) **Spektrofotometrický** - nejvíce se v praxi používají spektrofotometrické detektory. Jsou vysoce selektivní, takže základním požadavkem je, aby při dané vlnové délce detekovaná látka absorbovala co nejvíce. Vlnovou délku lze libovolně naprogramovat. [50]
 - b) **Fluorescenční** - je založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat UV a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem

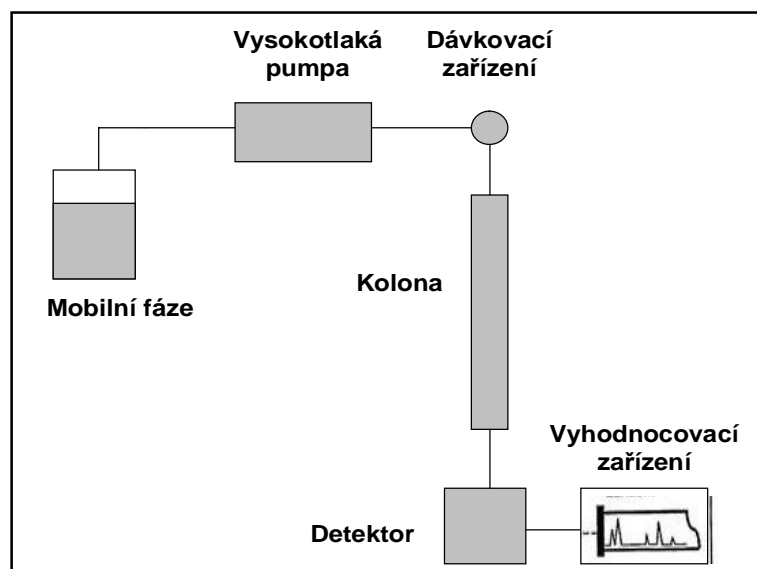
kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor má detekční limit až 10^{-12} a je vysoce selektivní. [55]

- c) **Refraktometrický** - měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý (detekční limit 10^{-7} g/ml), ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu [55]
- d) **Hmotnostní detektor** - je použitelný jak plynové tak i v kapalinové chromatografii pro přímou identifikaci látek. Vyznačuje se nižší mezí detekce (detekční limit 10^{-13} g/ml). [55]
- e) **Elektrochemický detektor** – lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě.[55] V elektrochemickém detektoru eluent prochází skrz průtokovou kvetu, poskytuje vhodné potenciály a kontroluje proudění. Citlivost ECD je významně lepší než pro mnoho jiných běžně užívaných režimů z detekce pro HPLC. Selektivita ECD spočívá v tom, že jestliže se z kolony vymývají dvě a více látek a mají-li různý oxidační nebo redukční potenciál, můžeme vybrat potenciál tak, že budeme selektivně detekovat pouze jednu z těch látek. ECD využívá dvou typů detekce. U amperometrického detektoru eluent teče po povrchu elektrody. Většina elektroaktivních prvků směsi teče na povrchu elektrody a nereaguje. Pouze 5-15 % elektroaktivních látek reaguje s touto elektrodou. U coulometrického detektoru eluent protéká pórovitou grafitovou elektrodou. Detektor tak může poskytnout zvýšenou citlivost. Proud je pak úměrný koncentraci vzorků [56]



Obr. 8 Coulchem III [62]

- 6) **Vyhodnocovací zařízení** - výsledkem měření je chromatogram s příslušným pí-
kem, jehož plocha bude přímo úměrná koncentraci 2,3-butandionu. Vyhodnocení
chromatografu se provede pomocí počítačového softwaru. [50]



Obr. 9 Schématický náčrt kapalinového [63]

4.7.2 Stanovení obsahu 2,3-butandionu HPLC

Principem stanovení HPLC je destilace 2,3-butandionu ze vzorku s vodní parou a následné nadávkování do kapalinového chromatografu. Případně se vzorek nedestiluje, ale centrifuguje, získá se supernatant a ten se nastříkuje do HPLC. Metoda HPLC je vhodná pro stanovení obsahu 2,3-butandionu v sýrech a vínech. [57] Stanovení obsahu 2,3-butandionu ve víně bude popsáno blíže v praktické části.

Pracovní postup stanovení 2,3-butandionu ve vzorku sýra:

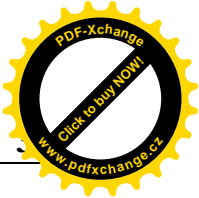
Do plastového sáčku se odváží 5 g vzorku sýra. Přidá se 25 ml 0,013 N H_2SO_4 . Poté se vzorek homogenizuje 10 min ve homogenizátoru. Po homogenizaci se vzorek převede do 3 plastových ampulek a provede se centrifugace při 7000 otáčkách po dobu 5 min. Vzniklý supernatant je zfiltrován přes 0,2 μm membránový filtr a potom přímo nadávkován do kapalinového chromatografu. Jako mobilní fáze se použila 0,013 N H_2SO_4 , která byla přefiltrována přes membránový filtr o 0,45 μm a odplyněna na vakua. [57]



5 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce v teoretické části bylo charakterizovat 2,3-butandion a popsat technologii výroby vína. Dále pak uvést vhodné instrumentální metody stanovení 2,3-butandionu a detailněji popsat HPLC .

Cílem diplomové práce v praktické části, bylo touto metodou stanovit 2,3-butandion v poskytnutých vzorcích vín, které se staly šampióny soutěže „Král vín 2009“



II. PRAKTICKÁ ČÁST



6 METODA SEPARACE A HPLC STANOVENÍ 2,3-BUTANDIONU

6.1 Analyzovaný materiál

Na analýzu byly použity nejlépe ohodnocená vína z vinařské soutěže „Král vín 2009“. Jednotlivé vzorky vín od sebe liší cukernatostí, ročníkem, vinařskou oblastí a podoblastí.

Jmenný seznam vzorků vína:

- **CABERNET MORAVIA**, odrůdové červené víno jakostní, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Znojemská, vinařská obec Dunajovice, 2005, 12,0% vol
- **CABERNET SAUVIGNON**, pozdní sběr, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Mikulovská, vinařská obec Mikulov, 2008, 13,0% vol
- **CUVÉE**, jakostní víno, Kolby a.s. Pouzdřany, 2008
- **FANTOMME CUVÉE**, nové vinařství, směska – Cabernet Sauvignon, Merlot a Rulandské modré, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Mikulovská, vinařská obec Drnholec, 2007, 11,5% vol
- **FRANKOVKA**, pozdní sběr, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Velkopavlovická, vinařská obec Čejkovice, 2008, 12,5% vol
- **FRANKOVKA BARRIQUE**, výběr z hroznů, Chateau Strážnice, 2006, 14,0% vol
- **CHARDONNAY**, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Mikulovská, vinařská obec Pavlov, 2008, 12,8% vol
- **LANGEWARTE CUVÉE** – Ryzlink rýnský, nové vinařství, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Mikulovská, 2005, 11,5% vol
- **MERLOT ROSE**, pozdní sběr, polosladké, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Znojemská, vinařská obec Dolní Kounice, 2008, 12,0% vol
- **MODRÝ PORTUGAL**, pozdní sběr, suché, vinařská oblast Morava, podoblast Velkopavlovická, vinařská obec Kobylí, 2007, 12% vol
- **NERONET**, moravské zemské víno, panenská sklizeň, suché, Čejkovice, 2007, 13,0% vol



- **PETRONILLA VINUM PRIMAEVUM**, přírodně polosladké, tradiční metodou dokvašování, vinařství Proqin, František Prokeš, 10% vol
- **RULANDSKÉ BÍLÉ**, zemské bílé víno, suché, Svatobořice – Mistrín, 2008, 12,5% vol
- **RULANDSKÉ BÍLÉ**, pozdní sběr, polosuché, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Mikulovská, vinařská obec Valtice, 2008
- **RULANDSKÉ BÍLÉ**, výběr z hroznů, sladké, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Slovácká, vinařská obec Kyjov, 2007, 11,5% vol
- **RULANDSKÉ MODRÉ**, výběr z hroznů, vinařství Štěpán Maňák, Žadovice, 2008
- **RULANDSKÉ ŠEDÉ**, výběr z hroznů, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Mikulovská, vinařská obec Mikulov, 2008, 12,5% vol
- **RYZLINK RÝNSKÝ**, ledové víno, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Znojemská, 2008, 9,5 % vol
- **RYZLINK VLAŠSKÝ**, pozdní sběr, Kolby a.s. Pouzdřany, 2007
- **TRAMÍN**, pozdní sběr, vinařská oblast Čechy, vinařská podoblast Litomeřická, 2007, 12,5% vol
- **TRAMÍN ČERVENÝ**, pozdní sběr, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast Znojemská, vinařská obec Jasovice, 2008, 12,5% vol
- **VETLÍNSKÉ ZELENÉ**, ledové víno, vinařská oblast Morava, vinařská podoblast. Mikulovská, vinařská obec Rakvice, 2008, 9% vol

6.2 Chemikálie

H₂SO₄ byla zakoupena od firmy Aldrich Corporation (USA). Methanol čistoty pro HPLC byly dodány firmou Sigma Aldrich (Germany). Standard 2,3-butandionu byl získán od firmy Karlsroth GmbH (Karlsruhe, Germany). Redestilovaná voda byla vyrobena destilačním přístrojem IDPE (8-18N) od firmy Vitrum.

6.3 Použité přístroje a zařízení

Na odplynění vzorku vína byl použit ultrazvuk od firmy Kraitek, (ČR). Na destilaci vzorku vína byla použita destilační aparatura podle Parnas-Wagnera od firmy Fischer s.r.o., (Slovensko). Mobilní fáze byla přefiltrována přes speciální filtrační aparaturu (Fischer Scientific, ČR) s filtrem o velikosti 0,2 μ m (Supelco, USA). Vzorek vína byl nadávkován pomocí speciální stříkačky (Hamilton, USA). Analýza vzorku vína probíhala na aparatuře HPLC-ECD, která se skládala z těchto částí:

- o analytická cela 5010A
- o guard cela 5020
- o vysokotlaká pumpa Model 582 Solvent delivery system (ESA, USA)
- o elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, USA)
- o dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka o objemu 20 μ l)
- o kolona AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm; Bio Rad, USA)
- o PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)



Obr. 10 Kolony Aminex [64]



6.4 Vlastní pracovní postup

Vlastní pracovní postup se skládá ze čtyř fází:

- 1) Přípravy mobilní fáze
- 2) Přípravy vzorku před destilací
- 3) Destilace vzorku
- 4) Vlastní chromatografické analýza

6.4.1 Příprava mobilní fáze

Na analýzu se připraví 1000 ml mobilní fáze, kterou je 1,5 mM H_2SO_4 . Nejprve v odměrné baňce se zředí patřičné množství H_2SO_4 v redestilované vodě a doplní se po rysku. Poté se mobilní fáze zfiltruje se přes speciální aparaturou s filtrem o velikosti pórů 0,2 μm .

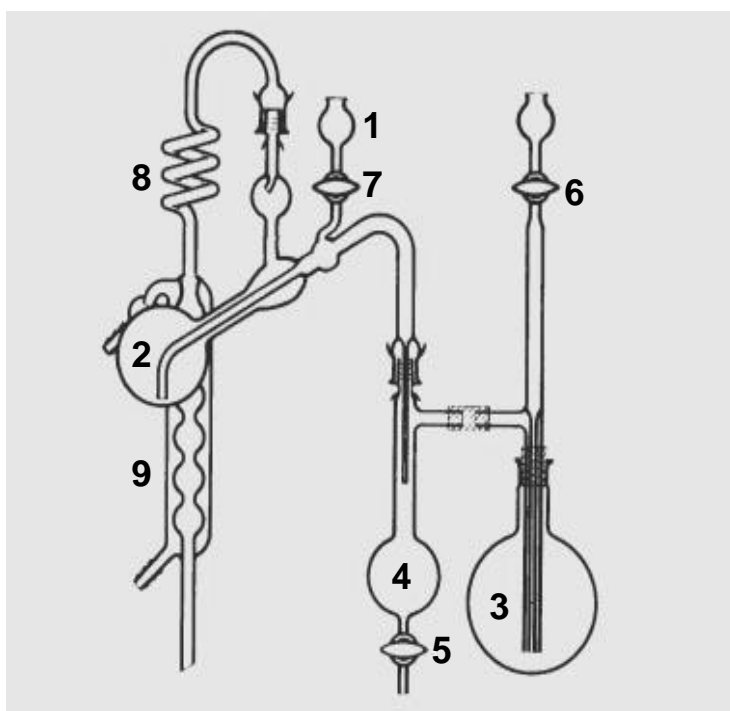
6.4.2 Příprava vzorku před destilací

50 ml odměrná baňka se zvaží na analytických váhách s přesností $\pm 0,0001\text{g}$. Poté se odměří 50 ml vychlazeného vzorku vína do 50 ml odměrné baňky a opět se zvaží. Odměrná baňka vzorkem vína se umístí na 10 min do ultrazvuku. Poté je vzorek připraven k destilaci.

6.4.3 Destilace vzorku

Destilace je metoda oddělování kapalných látek na základě různého bodu varu. Při zahřátí dvousložkové směsi na teplotu varu přechází do plynné fáze směs bohatší na těkavější složku. Kondenzací plynné fáze v tepelném výměníku se získá destilát. Zbylá kapalná fáze tvoří destilační zbytek. Podstatou destilace je uvedení kapaliny do varu přiváděním tepla a kondenzace vzniklých par v oddělené části přístroje. [58]

50 ml vzorku vína se přelije do destilační baňky přístroje, který se předem vyhřeje. Ze vzorku se oddestiluje 50 ml destilátu do odměrného válečku. Potom se destilát promíchá a napijetuje se do 2 plastových testovacích zkumavek, následně je vzorek připraven pro přímé dávkování do kapalinového chromatografu.



- 1 – nálevka
- 2 – destilační baňka
- 3 – vyvíječ vodní páry
- 4 - odlučovač kondenzátu
- 5, 6, 7 – kohouty
- 8 – vzdušný chladič
- 9 – vodní chladič

Obr. 11 Destilační aparatura dle Parnas-Wagnera [65]

6.4.4 Vlastní chromatografická analýza

Stanovení obsahu 2,3-butandionu ve vzorcích vína bylo provedeno na kapalinovém chromatografu (ESA, USA) s elektrochemickým detektorem nesoucí název Coulochem III. Do systému se dávkoval vzorek v alikvotním podílu 20 μ l. Chromatografická separace probíhala na koloně AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (1,5 mM H_2SO_4) při 30°C a průtoku 1,0 ml/min. Ochranný potenciál na guard cele se zvolil na 850 mV.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Efekt potenciálu na aplikovaném na pracovní elektrodu

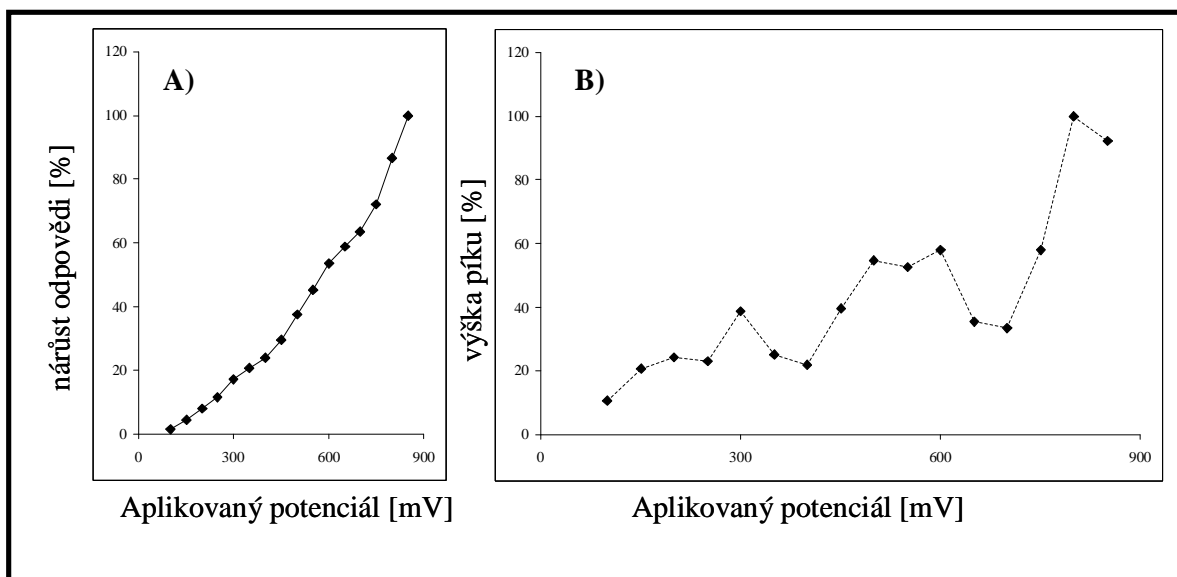
Pro nalezení podmínek pro co nejcitlivější stanovení studovaných látek je nejdříve nezbytné nalézt optimální odpověď elektrochemického detektoru. Pro maximální signál detektoru je velmi důležité nejprve zjistit optimální napětí vkládané na elektrody. V této části pokusu byl na grafitové porézní elektrody elektrochemického detektoru vkládán potenciál od 100 do 850 mV po 50 mV intervalech. Na obr. 12 je zobrazen hydrodynamický voltamogram 2,3-butandionu. Ze získaných dat elektrochemického měření (viz. tab. 2) vyplývá, že maxima píku bylo dosaženo při vkládaném potenciálu 800 mV (viz. obr. 13), protože došlo v rychlému nárůstu a poklesu na elektrodách. Vkládaný potenciál 800 mV byl vybrán jako nejvhodnější potenciál pro analytické stanovení 2,3-butandionu.

Tab. 1 Hodnot aplikovaného potenciálu a nárůstu odpovědi

Aplikovaný potenciál (mV)	Nárůst odpovědi (%)
100	1,531
150	4,531
200	8,043
250	11,404
300	17,037
350	20,671
400	23,868
450	29,611
500	37,567
550	45,223
600	53,633
650	58,794
700	63,644
750	72,078
800	86,614
850	100,000

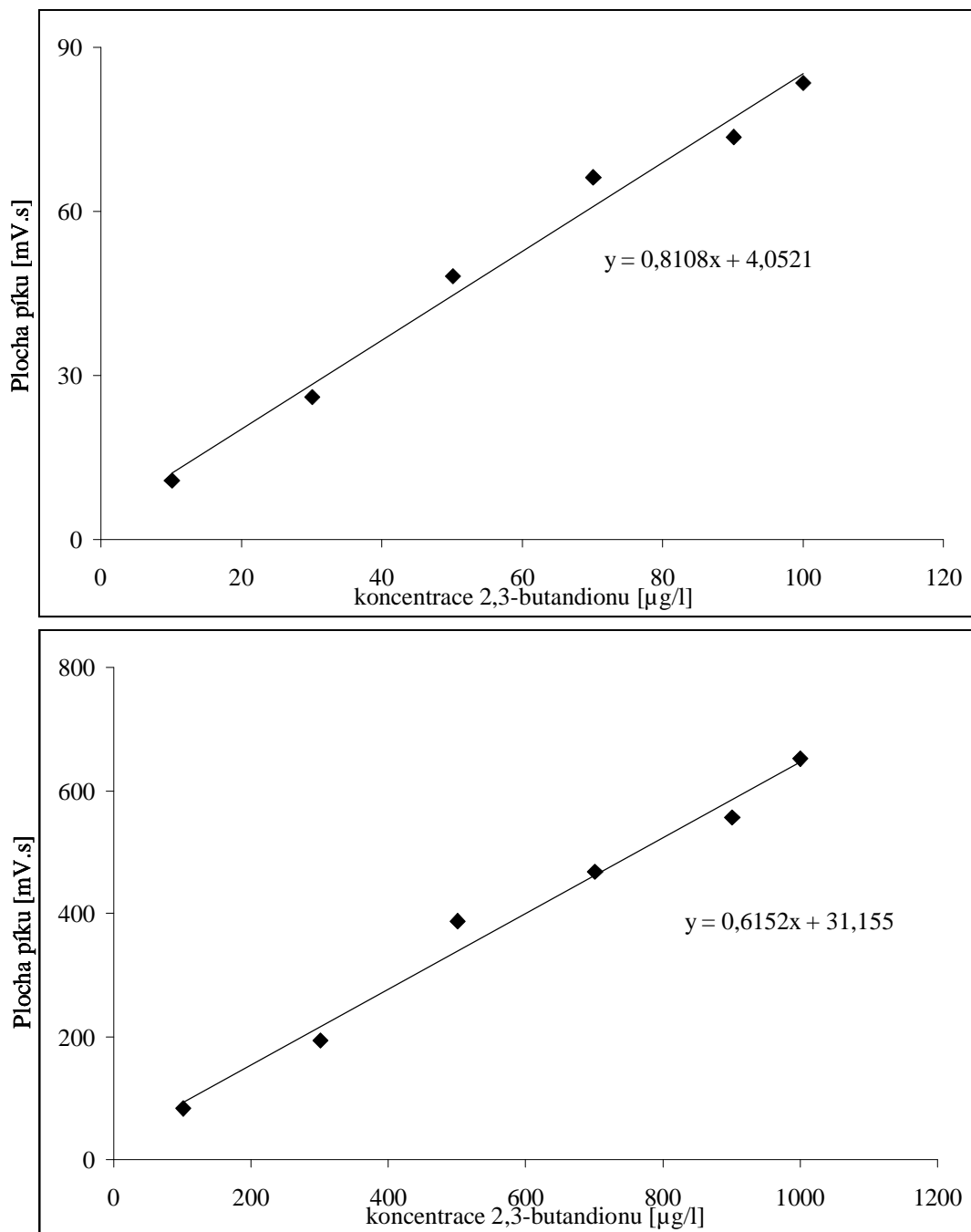
Tab. 2 Hodnot aplikovaného potenciálu a výšky píku

Aplikovaný potenciál (mV)	Výška píku (%)
100	10,533
150	20,643
200	24,154
250	23,124
300	38,746
350	25,000
400	22,000
450	39,498
500	54,718
550	52,753
600	57,790
650	35,500
700	33,365
750	58,015
800	100,000
850	92,085



Obr. 12 A) Hydrodynamický HPLC-ECD voltamogram 2,3-butandionu. B) Závislost výšky píku na aplikovaném potenciálu za podmínek : koncentrace analytu 10 μ l, kolona AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm; Bio Rad, USA), izokratická eluce, mobilní fáze 1,5 mM H₂SO₄, průtok 1,0 ml/min, nástřik 20 μ l, kolona a detektor nastaveny na 30 °C. Výška píku 2,3-butandionu při potenciálu 800 mV odpovídá 100%.

Následně byl proveden sken koncentrací 2,3-butandionu ve dvou kalibračních řadách: první v intervalu koncentrací od 10 do 100 μ g/l a druhá v intervalu koncentrací 100 až 1000 μ g/l. Z těchto řad jsme získali 2 kalibrační závislosti, a to konkrétně v koncentracích do 100 μ g/l $y = 0,8108x + 4,0521$ a pro koncentrace nad 100 μ g/l do 1000 μ g/l kalibrační závislost $y = 0,6152x + 31,15$. Jak je patrné, u obou kalibračních rovnic se velmi liší směrnice rovnice, proto je použití tohoto intervalového rozdělení koncentrací při tvorbě kalibračních závislostí správné. Na obrázku 13 jsou vidět obě naměřené kalibrační závislosti.



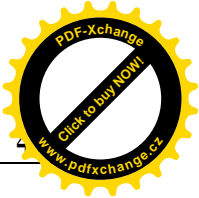
Obr. 13: Závislost výšky píku na koncentraci 2,3-butandionu v rozmezí 10-100 µg/l a 100-1000 µg/l. Další podmínky stanovení viz obr. 12

Následně byla provedena měření na reálných vzorcích vína (po předchozí destilaci), výsledky byly vyhodnoceny podle zjištěných kalibračních závislostí a souhrnné výsledky zobrazuje tab. 3



7.2 Obsah 2,3-butandionu ve vybraných vzorcích vín

Dle autorů (RANKINE, B.C., FORNACHON, J.C.M. and BRIDSON, D.A.) se koncentrace 2,3-butandionu ve víně v rozmezí 1 až 4 mg/l považuje prospěšnou, protože dodává žádoucí jemnou máslovou chuť a vůni. Zatímco koncentrace v rozmezí od 5 a více mg/l zásadně ovlivňuje chuť a vůni samotného vína. Dle autorů (BARTOWSKY, E.J., BURVILL, T.B. and HENSCHKE, P.) se ledová vína vyznačují velmi nízkou koncentrací 2,3-butandionu v rozmezí od 0,001 až 0,05mg/l. Velmi nízká koncentrace 2,3-butandionu je zapříčiněna tím, že ledová vína zpravidla bývají vysoce zasířená (400 až 550 mg/l SO₂). U vzorků (VETLÍNSKÉ ZELENÉ 2008 a RYZLINK RÝNSKÝ 2008) se potvrdilo, že se ledová vína vyznačují velmi nízkou koncentrací 2,3-butandionu. 2,3-butandionu nebyl u těchto vzorků vín detekován. Autoři (HENICK-KLING, T., MARTINEAU, B. and ACREE) popisují ve své práci, že se vína (Chardonnay a Rulandské) vyznačují optimální koncentrací 2,3-butandionu. Ve vínech Chardonnay se pohybuje koncentrace 2,3-butandionu v rozmezí od 0,3 až 1,7mg/l a u Rulandského od 0,5 až 2,0 mg/l. U vína Chardonnay je známo, že někteří vinaři vědomě podporovali produkci 2,3-butandionu kvůli pocitu a vůni, kterou jim uděluje. Vzorky vín (RULANDSKÉ BÍLÉ 2007 a RULANDSKÉ BÍLÉ 2008) se vykazovaly optimální koncentrací 2,3-butandionu tj. 0,8 a 1,8mg/l. U ostatních vzorků vín (RULANDSKÉ BÍLÉ 2008-Mikulov, RULANDSKÉ MODRÉ 2008, RULANDSKÉ ŠEDÉ 2008) nebyl 2,3-butandion detekován. U vína (CHARDONNAY 2008) byla zaznamenána vysoká koncentrace 2,3-butandionu tj. 5,3 mg/l, která mohla negativně ovlivnit povahu samotného vína. Je možné, že takto vysoká koncentrace byla zapříčiněna tím, že vinaři nadměrně podporovali produkci 2,3-butandionu, případně dalšími faktory (stylu vína, pH vína, obsah SO₂). Autoři (BELLON, J. R, HENSCHKE, P.A., FRANCIS I.L.) popisují ve své práci, že červená vína běžně obsahují 0,7 až 2,8 mg/l 2,3-butandionu, přesto u některých druhů červených vín např. u Cabernetu může značně hodnota kolísat (0,1 až 4,5 mg/l). U vzorků červených vín (FRANKOVKA 2008, MODRÝ PORTUGAL 2007) byla zaznamenána optimální koncentrace 2,3-butandionu v rozmezí 2,1 až 2,5 mg/l a u (FRANKOVKY BARRIQUE 2006) vyšší koncentrace 2,3-butandionu tj. 3,8 mg/l, která ještě zásadně neovlivnila kvalitu vína. U vzorků (CABERNET SAUVIGNON 2008, CABERNET MORAVIA 2005) se potvrdilo, že u některých druhů vín může obsah 2,3-butandionu značně kolísat. U těchto vzorků nebyl 2,3-butandion detekován.



U vzorků vín (CUVÉE 1244, FANTOMME CUVÉE, LANGE´ WARTE CUVÉE 2007, PETRONILLA) nebyl 2,3-butandion detekován. Tyto vzorky vín byly vyrobeny scelováním (míšením několika odrůd dohromady), což mohlo do jisté ovlivnit obsah 2,3-butandionu.

Růžová vína se vyznačují nízkou koncentrací 2,3-butandionu. U vzorků růžových vín (NERONET 2007, MERLOT ROSÉ 2008) proto nebyl 2,3-butandion detekován. Neronet díky své neutrální chuti a vůni nenarušuje odrůdový charakter vín a proto používá se ke scelování za účelem zlepšení barvy nebo vyrovnání hladiny 2,3-butandionu. Rozdílné výsledky byly zaznamenány u vzorků Tramínu. U Tramínu 2007 nebyl 2,3-butandion detekován, ale Tramínu červeného 2008 byla zaznamenána vysoká koncentrace 2,3-butandionu tj. 4,9 mg/l. Je pravděpodobné, že u Tramín (stejně jako u Cabernetu) mohou značně kolísat hodnoty 2,3-butandionu.

Tab. č. 3 – Obsah 2,3-butandionu ve vzorcích vína

Vzorek vína	Obsah 2,3-butandionu [mg/l]
CABERNET MORAVIA 2005	---
CABERNET SAUVIGNON 2008	---
CUVÉE 1244	---
FANTOMME CUVÉE	---
FRANKOVKA 2008	2,1
FRANKOVKA BARRIQUE 2006	3,8
CHARDONNAY 2008	5,3
LANGE´ WARTE CUVÉE 2007	---
MERLOT ROSÉ 2008	---
MODRÝ PORTUGAL 2007	2,5
NERONET 2007	---
PETRONILLA	---
RULANDSKÉ BÍLÉ 2007	0,8
RULANDSKÉ BÍLÉ 2008	1,8
RULANDSKÉ BÍLÉ 2008	---
RULANDSKÉ MODRÉ 2008	---
RULANDSKÉ ŠEDÉ 2008	---
RYZLINK RÝNSKÝ 2008	---
RYZLINK VLAŠSKÝ 2007	---
TRAMÍN 2007	---
TRAMÍN ČERVENÝ 2008	4,9
VETLÍNSKÉ ZELENÉ 2008	---



ZÁVĚR

Hlavní úlohou 2,3-butandionu je zlepšovat senzoryckou jakost potravin. Zvýšení senzorycké jakosti příznivě ovlivňuje intenzitu trávení a vstřebávání a zlepšuje tak využitelnost živin. U vína hraje 2,3-butandion významnou roli při určování kvality vína, protože při nízkých koncentracích (1 až 4 mg/l) dodává žádoucí jemnou máslovou chuť a vůni. Při vysokých koncentracích (5 a více mg/l) se tvoří intenzivní máslová vůně, která zásadně ovlivňuje chuť a vůni samotného vína. Tento problém často bývá vyřešen tím, že se některé odrůdy vín s vysokým a velmi nízkým obsahem 2,3-butandionu scelují.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickým detektorem je sestava, která se zdá být velmi vhodná pro stanovení 2,3-butandionu ve víně a minimálně srovnatelná s ostatními metodami. Jejími hlavními výhodami jsou především rychlost, přesnost a relativní levnost použití.



SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANONYM, *Karbonylové sloučeniny*. [on-line]. [cit. 2009-08-16, 2:05 SEČ]. Dostupný z : http://cs.wikipedia.org/wiki/Karbonylové_sloučeniny
- [2] KOTORA, M., *Aldehydy a karbonylové sloučeniny*, [on-line]. [cit. 2009-05-05, 12:26 SEČ], Dostupný z : <https://portal.natur.cuni.cz/search?SearchableText=karbonylové+sloučeniny>
- [3] ALBERTI, M., *Chemie pro fyziky, Ketony*. [on-line]. [cit. 2006-04-08, 12:38 SEČ]. Dostupný z: http://is.muni.cz/th/175344/prif_b_b1/CHEMIE_PRO_FYZIKY_KOM-PLET-final1.txt?lang=en
- [4] ANONYM, Organické sloučeniny obsahující kyslík, Aldehydy, [on-line]. [cit. 2006-08-18, 11:38 SEČ]. Dostupný z : www.mefanetmotol.cuni.cz/download.php?fid=154
- [5] CHEMSPIDER, *Butane-2,3-dione*. [on-line]. [cit. 2008-05-28, 20:38 SEČ]. Dostupný z : <http://motd.chemspider.com/Chemical-Structure.630.html>
- [6] VAN NEIL, C.B., KLUYVER, A.J. and DERX, H.G., Über das Butteraroma. *Biochemische Zeitschrift* 210, pp. 234–251, 1929
- [7] POSTEL, W., MEIER, B., *The behaviour of 2-acetolactate, 2-acetohydroxybutyrate, diacetyl, 2,3-pentanedione and acetoin during malolactic fermentation in wine*, *Lebensm. Unters. Forsch.*, str. 176, 356- 9, 1983
- [8] BARTOWSKY, E.J., HENSCHKE, P.A., *The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and betone*, *International Journal of Food Mikrobiology*, str 235-252, 2004
- [9] PAVIA et. al., *Introduction to Organic Laboratory Techniques*, 4th ed., ISBN 978-0-495-28069-9
- [10] SHARP, *Food Flavorings and Lung Disease (Diacetyl)*, [on-line]. [cit. 2009-10-18, 8:38 SEČ]. Dostupný z: <http://www.lni.wa.gov/Safety/Research/Hazardous-Chem/FoodFlavor/>
- [11] SEARCH.COM, *In alcoholic beverages*, [on-line]. [cit. 2007-09-18, 15:49 SEČ]. Dostupný z : <http://www.search.com/reference/Diacetyl>



- [12] COGAN, T.M., *Co-metabolism of citrate and glucose by Leuconostoc spp.: effects of growth, substrates and products*, J.Appl. Bacteriol. 63, pp. 551–558, 1987
- [13] RAMOS, A., LOLKEMA, J.S., KONINGS, W.N. and SANTOS, H., *Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by Leuconostoc oenos.*, Appl. Environ. Microbiol. 61, pp. 1303–1310, 1995.
- [14] ETIEVANT, P.X., *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, pp. 483–546, 1991 New York
- [15] RANKINE, B.C., FORNACHON, J.C.M. and BRIDSON, D.A., *Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality*. Vitis 8, pp. 129–134, 1969
- [16] DAVIS, C.R., WIBOWO, D., LEE, T.H. and FLEET, G.H., *Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines.*, Food Technol. Aust. 38, pp. 35–40, 1986
- [17] MARTINEA, B., ACREE, T.E. and HENICK-KLING, T., *Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl.*, Food Res. Int. 28, pp. 139–143, 1995
- [18] VINOPARK, *Jablečno-mléčné kvašení*, [on-line]. [cit. 2006-09-15, 7:49 SEČ].
Dostupný z : <http://www.vinopark.cz/slovník/slovo/jablecno-mlecne-kvaseni/>
- [19] ROP, O., HRABĚ, J., *Nealkoholické a alkoholické nápoje*, ISBN 978-80-7318-748-4, 2009 Zlín
- [20] ASMUNDSON, R.V. and KELLY, W.J., *The effect of temperature and ethanol concentration on the growth of Leuconostoc oenos.*, pp. 251–252, 1990
- [21] WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., DAVIS, C.R., FLEET, G.H. and LEE, T.H., *Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review*. Am. J. Enol. Vitic. 36, pp. 302–313, 1985
- [22] COSTELLO, P.J., MORRISON, G.J., LEE, T.H. and FLEET, G.H., *Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification.*, Food Technol. Aust. 35, pp. 14–18, 1983



- [23] HENICK-KLING, T., MARTINEAU, B. and ACREE, T., *The role of diacetyl in wine flavour: metabolism by yeast and bacteria*. In: 11th International Oenological Symposium, Sopron, Hungary, pp. 133–152, 1996
- [24] LONVAUD, A., ZMIROU, C. and LARUE, F., *Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques de la fermentation malolactiques des vins.*, Sci. Aliments 4, pp. 81–85, 1984
- [25] NIELSEN, J.C. and RICHELIEU, M., *Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by Oenococcus oeni.*, Appl. Environ. Microbiol. 65, pp. 740–745, 1999
- [26] ROMANO, P. and SUZZI, G., *Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation.*, Appl. Environ. Microbiol. 62, pp. 309–315, 1996
- [27] MARTINEAU, B. and HENICK-KLING, T., *Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with Saccharomyces cerevisiae strain EC 1118 and malolactic fermentation with Leuconostoc oenos strain MCW.*, Am. J. Enol. Vitic. 46, pp. 442–448, 1995
- [28] VERHUE, W.M. and TJAN, S.B., *Metabolic routes of citrate and pyruvate in L. diacetylactis as determined by ¹³C NMR.*, FEMS Microbiol. Rev. 87, p. 69., 1990
- [29] BARTOWSKY, E.J., BURVILL, T.B. and HENSCHKE, P.A., *Diacetyl in wine: role of malolactic bacteria and citrate.*, Aust. Grapegrow. Winemak. 402a, pp. 130–135, 1997
- [30] ROP O., VALÁŠEK P, HOZA I., *Teoretické principy konzervace potravin I*. Skripta, UTB, 129 s., ISBN 80 - 7318 - 339 - 0, 2005 Zlín
- [31] BERRY, CH., *Diacetyl Use by Food Manufacturers*, 1-800-625-2267. Dostupný z: [http://www.nclabor.com/osha/etta/hazard_alerts/Diacetyl_\(Butter\)_Alert.pdf](http://www.nclabor.com/osha/etta/hazard_alerts/Diacetyl_(Butter)_Alert.pdf)
- [32] ANONYM, *Dangers of diacetyl*, [on-line]. [cit. 2009-10-22, 15:01 SEČ]. Dostupný z : <http://www.articlesbase.com/personal-injury-articles/dangers-of-diacetyl-1369204.html>
- [33] KADLEC, P., *Technologie potravin II.*, 236 str, ISBN 80-7080-510-2, skripta VŠCHT Praha 2002



- [34] ČEPIČKA, J., *Obecná potravinářská technologie.*, 1.vydání, str.199-204, ISBN 80-7080-239-1, VŠCHT 1995
- [35] PETR DOLEŽAL, *Evropská vína s podmínkách české gastronomie- (část V – Vína Rakouska)*, 120 str, ISBN 80-902748-0-3, 2003
- [36] MINISTERSTVO VNITRA ČR, *Zákon 321 ze dne 29. dubna 2004 o vinohradnictví a vinařství.* Dostupný z: <http://www.mvcr.cz/sbirka/2004/sb105-04.pdf>
- [37] KUTTELVAŠER, Z., *Abeceda vína*, 1. vydání, str. 150, ISBN 80-86031-43-8, Radix, s.r.o. Praha ©2003
- [38] ARAJ, J., *Fyzikální a fyzikálněchemické analytické metody*, 1. vydání, str. 299-300, ISBN 63-555-77, 1977 Bratislava
- [39] WESTERFELD, W.W., *A colorimetric determination of blood acetoin.*, *J. Biol. Chem.* 161, pp. 495–502, 1945
- [40] OUGH, C.S., AMERINE, M.A., *Methods for Analysis of Musts and Wine.*, Chp 4 Carbonyl Compounds. 2nd edition., University of California, pp. 150–153, New York 1988
- [41] WANG, J., *Analytical Electrochemistry*, New York : VCH Publishers, 1994
- [42] SYNEK, V., *Polarografie*, UJEP Ústí nad labem, Dostupný z : <http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/5PolarografiePred.doc>
- [43] DAVÍDEK, J. a kol, *Laboratorní příručka analýzy potravin*, 2.vydání, str. 412-430, ISBN 04-814-81, Praha 1981
- [44] KOMÍNKOVÁ, J., VOSMANSKÁ, M., *Obecné základy práce v analytické laboratoři, Návodů pro laboratorní cvičení z analytické chemie*, 20str, VŠCHT Praha 2000. Dostupný z : http://www.vscht.cz/anl/lach1/1_6r+chel.pdf
- [45] ČESKÝ LÉKOPIS, *Fyzikální a fyzikálně-chemické metody*, 1997. Dostupný z : http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_21.htm
- [46] VEJRAŽKA, M., *Optické metody používané v biochemii*, Karlova Univerzita, Praha 2008. Dostupný z : <http://portal.lf1.cuni.cz/download.php?fid=217>
- [47] GARCIA-VILLANOVA, R.J., GARCIA ESTEPA, R.M., *Fluorimetric determination of 2,3-butandione and 2,3-pentanedione with isoniazide and zirconium*



- salt*, Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Spain 1993
- [48] KVASNICOVÁ, V., BALÍNOVÁ, P., *Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie*, Karlova Univerzita v Praze, Dostupný z : http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B1.htm#pouzita_analyticka_metoda
- [49] BASÁŘOVÁ, G., *Pivovarsko-sladařská analytika*, 1.vydání, str.700, Praha 1993
- [50] KVASNICOVÁ, V., BALÍNOVÁ, P., *Praktická cvičení z lékařské chemie a biochemie – Chromatografie*, Karlova Univerzita v Praze, Dostupný z : old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
- [51] ANONYM, Plynová chromatografie, [on-line]. [cit. 2005-05-20, 12:32 SEČ], Dostupný z : http://sk.wikipedia.org/wiki/Plynova_chromatografie
- [52] MACCIOLA, V., CANDELA, G., DE LEONARDIS, A., *Rapid gas chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter*, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Ambientali e Microbiologiche, Università degli Studi del Molise, Italy 2006
- [53] BUIJTEN, J.C., HOLM, B., *An automated distillation Method for the determination of diacetyl in beer: a comparison of analysis by AutoAnalyzer and gas chromatography*, The Department of Analytical Chemistry, Stockholm, Sweden
- [54] PEJIN, D., GRUJIČ, O.S., MARJANOVIČ, N.J., ¹⁹⁷⁹ Determination of diacetyl and pentadione in beer and wine by GC/MS using solid-phase extraction volume, pp. 4554, Serbia 2002
- [55] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*, 132 str., 2.vydání, ISBN 80-86369-07-2, 2003
- [56] WILSON, K., WALKER, J., *Principles and Technique of Practical Biochemistry*, University Press, Cambridge 2000
- [57] GIUSEPPE, Z., CONTERNO, L., GERDI, V., *Determination of Organic Acids, Sugars, 2,3-butandione and Acetoin in Cheese by High-Performance Liquid Chromatography*, J.Agric. Food Chem. 49, str. 2722-2726, Italy 2001



- [58] ANONYM, *Studijní materiály z chemie*, Mararykova Univerzita v Brně, Dostupný z : <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pdf/ulohy/uloha11.pdf>
- [59] ANONYM, *Delayed Racking Experiment*, [on-line]. [cit. 2009-08-23, 8:32 SEČ], Dostupný z : <http://abnormalbrewers.org/category/homebrewing/>
- [60] ANONYM, 2,3-butandione in Your Wine, [on-line]. [cit. 2008-02-02, 11:32 SEČ], Dostupný z : <http://wpress.blogspot.com/2008/02/to-sniff-or-not-to-sniffdiacetyl-in.html>
- [61] ANONYM, *Studijní materiály*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Dostupný z : <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>
- [62] EUROSEP INSTRUMENTS, Separative Method Division, Dostupný z : http://www.eurosep.com/Dep_method/msed61.htm
- [63] ANONYM, *HPLC Instruments*, [on-line]. [cit. 2007-11-22, 13:32 SEČ]. Dostupný z : <http://www.lcresources.com/resources/getstart/1c01.htm>
- [64] BIO-RAD, *Aminex columns*, [on-line]. [cit. 2008-03-21, 9:45 SEČ], Dostupný z : www.bio-rad.com/.../lsl_aminex_columns.jpg
- [65] FISCHER SCIENTIFIC, Destilační aparatura Wagner-Parnas, [on-line]. [cit. 2007-04-24, 7:32 SEČ]. Dostupný z : http://www.thermofisher.cz/eshop/1689_0011.html
- [66] HEYROVSKÝ J., *Polarografie*, 1, vydání, ISBN 80-7015-132-3, 1990



SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MLF	Malolactic fermentation - jablečno-mléčné kvašení
CFU	Colony Forming Unit - jednotky tvořící kolonie
ČNM	Československý normalizovaný moštoměr
KMW	Klosterneuburger Mostwaage
GC	Gas chromatography - plynová chromatografie
FID	Flame ionization detector - plamenově-ionizační detektor
HPLC	High performance liquid chromatography – výsokoúčinná kap. chromatografie
ECD	Elektrochemický detektor



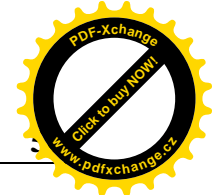
SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Obecný strukturní vzorec karbonylové skupiny.....	13
Obr. 2	Obecný strukturní vzorec ketonu	13
Obr. 3	Obecný strukturní vzorec aldehydu.....	14
Obr. 4	Strukturní vzorec 2,3-butandionu.....	15
Obr. 5	Grafický vzorec 2,3-butandionu.....	15
Obr. 6	Metabolismus 2,3-butandionu.....	16
Obr. 7	Schématické znázornění plynového chromatografu	31
Obr. 8	Coulochemu III.....	34
Obr. 9	Schématický náčrt kapalinového chromatografu.....	35
Obr. 10	Kolony Amniox.....	40
Obr. 11	Destilační aparatura dle Parnas-Wagnera.....	42
Obr. 12	A) Hydrodynamický HPLC-ECD voltamogram 2,3-butandionu. B) Závislost výšky píku na aplikovaném potenciálu za podmínek	44
Obr. 13	Závislost výšky píku na koncentraci 2,3-butandionu v rozmezí 10-100 µg/l a 100-1000 µg/l.....	45



SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Hodnot aplikovaného potenciálu a nárůstu odpovědi.....	43
Tab. 2 Hodnot aplikovaného potenciálu a výšky píku.....	43
Tab. 3 Obsah 2,3-butandionu ve vzorcích vína	47



SEZNAM PŘÍLOH

- P I Potraviny a nápoje obsahující 2,3-butandion
- P II Přístroje a pomůcky použité při výrobě vína
- P III Instrumentální přístroje

PŘÍLOHA I : POTRAVINY A NÁPOJE OBSAHUJÍCÍ 2,3-BUTANDION



Sýry – niva, eidam, ementál



Máslo „ Zlatá Haná“



Červené víno



Jihočeské mléko



Ovocný jogurt

PŘÍLOHA P II: PŘÍSTROJE A POMŮCKY POUŽITÉ PŘI VÝROBĚ VÍNA



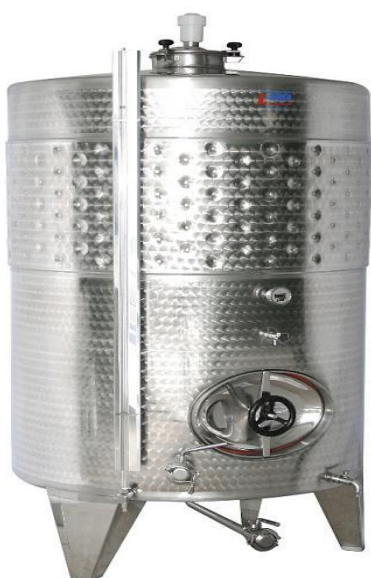
Elektrický odzrňovač



Sirné knoty



Pneumatický lis



Nerezová fermentační nádoba



Moštoměr

PŘÍLOHA P III: INSTRUMENTÁLNÍ PŘÍSTROJE



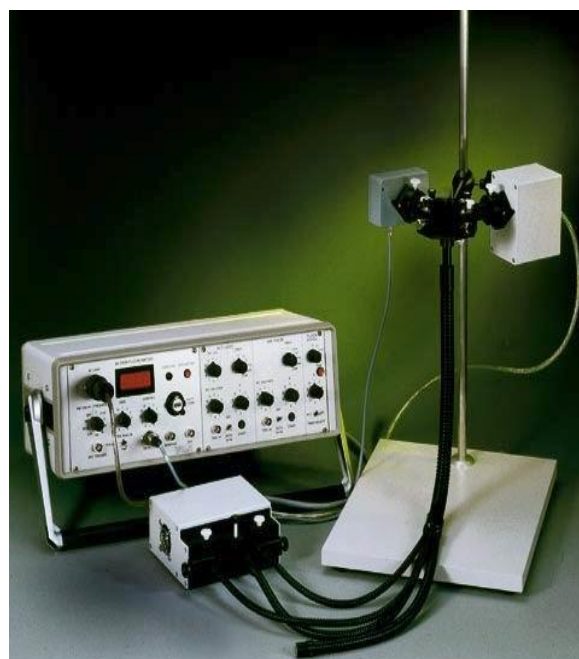
Kapesní kolorimetr



Spektrofotometr



Moderní polarograf



Fluorimetr